

MODULASI JUNCTION ANTAR SEL MENGGUNAKAN PEPTIDA KADHERIN UPAYA MENINGKATKAN PENGHANTARAN OBAT

Ernawati Sinaga¹, Seetharama D.S. Jois², Mike Avery², Irwan Makagiansar²,
Usman S.F. Tambunan³, dan Teruna J. Siahaan²

1. Fakultas Biologi, Universitas Nasional, Jakarta 12520, Indonesia

2. Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Kansas, Lawrence, KS 66047 USA

3. Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

E-mail: ersinaga@centrin.net.id

Abstrak

Banyak senyawa protein, peptida dan peptidomimetik yang ditemukan akhir-akhir ini memiliki potensi terapeutik yang besar, namun terhambat aplikasinya sebagai obat karena mengalami masalah penghantaran ke situs sasarannya (drug delivery). Dalam beberapa tahun belakangan ini telah dikembangkan satu metode baru dalam modulasi *junction* antar sel menggunakan senyawa-senyawa peptida kadherin, yaitu peptida yang sekuensnya diturunkan dari sekuens fragmen peptida yang terdapat pada situs pengikatan kadherin. Dalam penelitian ini telah dievaluasi aktivitas beberapa peptida kadherin dalam memodulasi *junction* antar sel. Hasilnya menunjukkan bahwa peptida-peptida Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10), Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6), Ac-QGADTPPVG-NH₂ (ADT-10), dan Ac-ADTPPV-NH₂ (ADT-6) memiliki aktivitas yang cukup tinggi dalam memodulasi *junction* antar sel-sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*). Hasil penelitian ini telah memberikan sumbangan yang berarti dalam pemantapan suatu metoda baru dalam penghantaran obat melalui modulasi *junction* antar sel menggunakan senyawa-senyawa peptida kadherin.

Abstract

Modulation of Intercellular Junction by Utilization of Cadherin Peptides as an Effort to Improve Drug Delivery. Rapid advances in combinatorial chemistry and molecular biology has influenced the discovery of many proteins, peptides and peptidomimetics as potential therapeutic agents. Unfortunately, the practical application of these potential drugs is often restricted by the difficulties of delivering them to target site(s) due to the presence of biological barriers. Recently, a new method to improve the drug delivery, that is by modulating the intercellular junction, has been evaluated. Modulation of intercellular junction could be achieved by modulating the proteins which play important role in establishing the intercellular junction, one of which is cadherin. In the present work we have demonstrated the ability of several cadherin peptides, i.e. Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10), Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6), Ac-QGADTPPVG-NH₂ (ADT-10), and Ac-ADTPPV-NH₂ (ADT-6) to modulate the intercellular junction of MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) cells, this finding is a contribution to the establishment of a new method to improve the drug delivery by utilization of cadherin peptides by modulating the intercellular junction.

Keywords: Intercellular junction, peptide, cadherin, drug delivery, MDCK cells.

1. Pendahuluan

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kimia kombinatorial dan biologi molekuler yang sangat pesat dewasa ini telah mendorong penemuan berbagai senyawa makromolekul yang memiliki potensi terapeutik. Berbagai senyawa protein, peptida dan peptidomimetika baru ditemukan, namun pengembangan

senyawa-senyawa ini sebagai obat seringkali terbentur pada kesulitan transpor atau penghantaran molekul-molekul senyawa tersebut ke situs sasarannya. Salah satu faktor yang menyebabkan hal ini ialah adanya berbagai sawar biologis dalam tubuh yang menghambat senyawa-senyawa xenobiotik untuk memasuki organ atau jaringan tertentu.

Senyawa-senyawa protein, peptida dan peptidomimetik pada umumnya memiliki hidrofilisitas cukup tinggi. Oleh sebab itu jalur transpor yang mungkin untuk senyawa-senyawa semacam ini adalah melalui jalur paraseluler. Namun, ukuran molekulnya yang relatif besar membatasi transpor senyawa-senyawa ini. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran pori atau saluran paraseluler umumnya sangat kecil, sehingga hanya molekul-molekul dengan radius lebih kecil dari 11 Å yang dapat melalui jalur paraseluler tersebut [1]. Untuk mencapai efek farmakologis yang diharapkan, suatu molekul bioaktif tentu saja harus mencapai situs sasarannya. Dengan demikian perlu dicari cara-cara tertentu yang dapat digunakan untuk meningkatkan transpor senyawa-senyawa hidrofilik bermolekul besar melintasi sawar biologis, agar senyawa-senyawa kandidat obat bermolekul besar yang telah banyak ditemukan saat ini dan yang akan lebih banyak lagi ditemukan pada masa-masa mendatang, dapat dimanfaatkan secara optimal.

Untuk mengatasi masalah penghantaran makromolekul terapeutik ini berbagai upaya telah dilakukan, antara lain dengan mengubah molekul obat menjadi *prodrug* yang lebih mudah ditransportkan (*transportable*) [2]. Mengingat tidak semua molekul obat dapat dikonstruksikan menjadi *prodrug* yang sesuai, maka akhir-akhir ini para peneliti mulai menjajagi cara lain untuk meningkatkan penghantaran obat (*drug delivery*), yaitu dengan melakukan modulasi terhadap *junction* antar sel. Salah satu cara yang cukup prospektif adalah dengan melakukan modulasi terhadap kadherin, suatu glikoprotein yang mempunyai peran penting dalam pembentukan *junction* antar sel [3-7].

Kadherin adalah sekelompok glikoprotein transmembran yang banyak ditemukan pada *zonula adheren*, yaitu salah satu bagian *junction* antar sel yang berada di antara *zonula occluden* (*junction* ketat) dan *macula adheren* (desmosom) [6-9]. Dalam pembentukan *junction* antar sel, molekul-molekul kadherin pada satu sel akan berinteraksi secara homofilik dengan molekul-molekul kadherin pada sel yang berada di dekatnya membentuk *zonula adheren*. Sampai saat ini belum jelas benar bagaimana mekanisme dan struktur kompleks kadherin yang terbentuk pada *junction* antar sel tersebut. Akan tetapi dari analisis struktur kristal maupun dari struktur larutan kadherin diketahui bahwa domain ekstraseluler dari molekul-molekul kadherin yang terdapat pada sel-sel yang bersebelahan akan membentuk dimer secara antiparalel (*trans-dimer*); dimer ini disebut sebagai dimer adhesi (*adhesion dimer*). Di samping itu juga ditemukan adanya struktur dimer paralel (*cis-dimer*) yang terbentuk antara molekul-molekul kadherin yang terletak pada sebuah sel yang sama, yang disebut sebagai dimer serabut (*strand dimer*). Interaksi molekul-molekul kadherin ini umumnya berlangsung secara homofilik, dan ini merupakan kekuatan utama yang menjaga keutuhan *junction* antar sel [10-13]. Gangguan pada fungsi kadherin akan berakibat pada keutuhan *junction* antar sel. Modulasi terhadap interaksi molekul-molekul kadherin pada sel-sel yang bersebelahan diharapkan akan dapat menjadi jalan untuk mengatur keketatan *junction* antar sel. Pemikiran inilah yang mendasari upaya modulasi fungsi kadherin sebagai salah satu usaha untuk meningkatkan transpor paraseluler dari senyawa-senyawa hidrofilik bermolekul besar seperti protein, peptida dan peptidomimetik.

Modulasi terhadap fungsi kadherin dapat dilakukan dengan berbagai cara. Salah satu cara yang saat ini sedang dirintis oleh beberapa kelompok peneliti adalah dengan menggunakan senyawa-senyawa peptida sintetik yang diturunkan dari sekuens molekul kadherin itu sendiri [3-6,14,15]. Senyawa-senyawa peptida ini dinamakan „peptida kadherin“. Diharapkan, peptida kadherin akan menempati situs pengikatan (*binding site*) pada molekul kadherin, sehingga dapat menghalangi terjadinya interaksi antar molekul-molekul kadherin yang terdapat pada sel-sel yang bersebelahan, sehingga keketatan *junction* antar sel dapat diatur.

Agar modulasi ini dapat berlangsung efektif, sekuens peptida sintetik harus komplementer dengan sekuens situs pengikatan pada interaksi kadherin-kadherin. Lutz dan kawan-kawan [16,17] telah mencoba mengidentifikasi beberapa sekuens pada molekul kadherin yang diperkirakan berperan pada interaksi kadherin-kadherin dengan menggunakan antibodi monoklonal anti-kadherin sebagai alat pengenalan. Mereka mengungkapkan sekuens beberapa fragmen peptida yang memiliki afinitas cukup tinggi dengan antibodi yang digunakan, diantaranya adalah peptida-peptida yang mengandung sekuens HAV (*histidin-alanin-valin*). Sebelumnya, Blaschuk dan kawan-kawan [18] telah pula berhasil mendemonstrasikan penghambatan kompaksi embrio mencit dan pertumbuhan sel-sel neurit pada astrosit dengan menggunakan senyawa-senyawa peptida sintetik yang mengandung sekuens HAV (*histidin-alanin-valin*). Sebagaimana yang diketahui, kedua proses biologi yang dihambat tersebut, yaitu kompaksi embrio mencit dan pertumbuhan sel-sel neurit pada astrosit, dimediasi oleh kadherin. Hasil-hasil penelitian ini menimbulkan dugaan bahwa salah satu situs pengikatan (*binding sites*) pada interaksi antar molekul-molekul kadherin adalah sekuens yang mengandung sekuens HAV tersebut. Dugaan ini melahirkan pemikiran bahwa besar kemungkinan peptida-peptida yang

mengandung sekuens yang sama dengan bagian protein kadherin yang mengandung HAV akan dapat menduduki sekuens komplemen atau *counter sequence* dari bagian protein tersebut, yang pada akhirnya akan dapat menghambat interaksi antar molekul-molekul kadherin pada sel-sel yang bersebelahan. Penghambatan interaksi kadherin-kadherin ini diharapkan akan dapat memodulasi *junction* antar sel, memperbesar pori atau celah paraseluler, sehingga akhirnya dapat meningkatkan transpor molekul melintasi sawar-sawar biologis.

Atas dasar pemikiran yang telah diuraikan tersebut, maka dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas biologis beberapa senyawa peptida sintetik yang diperkirakan dapat memodulasi *junction* antar sel. Senyawa-senyawa peptida sintetik tersebut sekuensnya diturunkan dari domain EC-1 E-kadherin, yaitu dari bagian yang mengandung sekuens HAV dan dari bagian yang diperkirakan merupakan komplemen atau *counter sequence* dari bagian HAV tersebut, yaitu yang mengandung sekuens ADT [19]. Diharapkan dari penelitian ini akan ditemukan beberapa peptida sintetik yang dapat memodulasi *junction* antar sel, yang kelak akan dapat dimanfaatkan dalam upaya meningkatkan penghantaran obat (drug delivery) dari senyawa-senyawa makromolekul bersifat hidrofilik seperti senyawa-senyawa protein, peptida atau peptidomimetik.

2. Metode Penelitian

2.1. Sintesis dan pemurnian peptida

Dalam penelitian ini disintesis 4 senyawa peptida yang akan diuji, yaitu Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10), Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6), Ac-QGADTPPVG-NH₂ (ADT-10), dan Ac-ADTPPV-NH₂ (ADT-6), disamping peptida VVA sebagai kontrol inaktif. Sintesis peptida dilakukan secara otomatis menggunakan Automated Solid Phase Peptide Synthesizer PS3 (Protein Technologies Inc. – Rainin Instruments Co. Inc.), dengan metoda Sintesis Peptida Fasa Padat (SPPS) *Fast Fmoc chemistry* [20]. Sintesis peptida dilakukan pada fasa padat resin aminometil-alanil (DOD resin) yang memiliki gugus Fmoc-4-metoksi-4-(γ -karboksi-propiloksi)-benzhidrilamin yang terikat pada resin melalui gugus alanil-aminometil tersebut.

Setelah sintesis, peptida dimurnikan menggunakan metoda HPLC preparatif. Pengujian kemurnian setiap fraksi peptida dilakukan dengan HPLC analitik. Fraksi-fraksi peptida yang dianggap cukup murni (kemurnian minimal 95%) dikumpulkan, dipakatkan dengan rotavaporator, lalu diliofilisasi. Peptida yang diperoleh dianalisis kembali kemurniannya dengan HPLC analitik dan kemudian disimpan pada suhu -20° C sebelum dikonfirmasi dengan spektrometer massa dan NMR, dan digunakan dalam percobaan selanjutnya.

2.2. Kultur Sel

Kultur sel MDCK pasasi ke 24 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dengan nomor kode CCL-34. Sel dikultur dalam flask khusus untuk kultur sel dalam media khusus untuk MDCK, dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37° C, RH 95-97%, dan konsentrasi CO₂ 5%. Media diganti sehari setelah inokulasi, dan sekali dua hari sesudahnya sampai dilakukan tripsinasi.

Untuk percobaan pengukuran resistansi listrik trans epitel (TEER, transepithelial electrical resistance), sel dikultur dalam *transwell* berdiameter 1,2 mm dengan membran polikarbonat diameter 1 cm ukuran pori 0,4 μ m. Inokulasi dilakukan dengan kepadatan 50.000 sel per *well*. Media dalam *transwell* diganti sehari setelah inkubasi, dan sesudah itu sekali dua hari pada minggu pertama. Pada minggu-minggu selanjutnya, media dalam *transwell* diganti sekali sehari. Kultur sel dalam *transwell* siap untuk digunakan dalam percobaan setelah berumur 8 hari.

Seluruh pekerjaan yang menyangkut kultur sel dilakukan secara aseptik di dalam *biohazard hood* yang dilengkapi dengan *laminar air flow*, lampu ultra-violet, pipetor dan pompa hampa. Seluruh bahan dan alat yang digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan jalan diotoklaf selama 20 menit pada 121° C; untuk bahan-bahan yang mudah rusak karena pemanasan, sterilisasi dilakukan dengan jalan penyaringan menggunakan botol penyaring Nalgene.

2.3. Analisis efek peptida terhadap resistansi listrik transepitel (TEER)

Kultur sel dalam *transwell* yang siap untuk digunakan diobservasi terlebih dahulu melalui mikroskop cahaya untuk memastikan kondisi lapis tunggal (monolayer) penuh sebagaimana yang diharapkan. Walaupun sangat jarang terjadi, tetapi apabila dalam observasi terlihat lapis sel tidak merata dan penuh di seluruh membran, maka *transwell* yang berisi lapis sel tersebut tidak digunakan selanjutnya dalam eksperimen.

Mula-mula media kultur, baik di kompartemen atas (bagian apikal lapis sel) maupun di kompartemen bawah (bagian basolateral lapis sel) diganti dengan larutan garam Hank's Balanced (HBSS) pH 7,4 (Mediatech Cellgro, nomor katalog 21-021-cv) yang didapar dengan 10 mM HEPES, serta mengandung 2 mM CaCl_2 dan 0,74 mM MgSO_4 . Kemudian dilakukan pengukuran nilai TEER terhadap seluruh lapis tunggal sel percobaan untuk mendapatkan nilai TEER awal sebelum perlakuan. Pengukuran dilakukan dengan *Evom Epithelial Tissue Voltometer* yang telah dilengkapi dengan *Chopstick Electrode Set*. Pengukuran dilakukan secara berkala, 15 menit, 30 menit, dan selanjutnya sekali 30 menit selama 1 atau 2 jam sampai diperoleh nilai TEER yang stabil. Pengukuran nilai TEER awal juga dimaksudkan untuk melakukan eksklusi terhadap lapis tunggal sel yang akan dipergunakan. Lapis tunggal sel yang digunakan dalam percobaan selanjutnya adalah yang menunjukkan nilai TEER 100-200 ohm.cm^2 (setelah dikoreksi dengan resistensi membran sebesar 70 ohm.cm^2).

Setelah nilai TEER cukup stabil, umumnya dicapai setelah 1 – 2 jam, larutan dalam *well* diganti dengan larutan peptida uji atau kontrol pelarut (HBSS pH 7,4 yang mengandung 10 mM Hepes, 2 mM CaCl_2 dan 0,74 mM MgSO_4). Untuk perlakuan peptida melalui bagian apikal, larutan peptida diisi sebanyak 0,5 mL pada kompartemen atas *well*, sedangkan kompartemen bawah *well* diisi dengan 1,5 mL pelarut. Untuk perlakuan peptida melalui bagian basolateral, kompartemen atas *well* diisi dengan pelarut sebanyak 0,5 mL dan kompartemen bawah *well* diisi dengan larutan peptida uji sebanyak 1,5 mL. Untuk perlakuan peptida dari kedua sisi, apikal dan basolateral, baik bagian atas maupun bawah *well* diisi dengan larutan peptida uji, masing-masing sebanyak 0,5 mL dan 1,5 mL.

Nilai TEER diukur secara berkala pada 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam dan 5 jam masa inkubasi. Untuk setiap perlakuan, pengukuran nilai TEER dilakukan secara triplo pada *well* yang berbeda.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil pengukuran TEER yang dilakukan menunjukkan bahwa keempat peptida yang diuji memiliki kemampuan untuk menurunkan resistansi transepitel lapis tunggal sel-sel MDCK, walaupun dengan kekuatan yang berbeda-beda. Gambar 1 dan 2 menunjukkan aktivitas peptida HAV-10 dan ADT-10 dalam menurunkan nilai TEER sel MDCK ketika diaplikasikan melalui sisi apikal, basolateral dan sekaligus melalui kedua sisi apikal dan basolateral.

Untuk membuktikan bahwa ukuran molekul berpengaruh terhadap aktivitas peptida dalam memodulasi *junction* antar sel, maka dilakukan pengujian terhadap turunan kedua deka-peptida tersebut, yang telah direduksi menjadi heksapeptida HAV-6 dan ADT-6. Hasil pengujian kemampuan kedua heksapeptida tersebut dalam menurunkan nilai TEER sel-sel MDCK disajikan dalam Gambar 3 dan 4.

Keempat peptida yang diuji menunjukkan kemampuan dapat menurunkan nilai TEER sel-sel MDCK sebagaimana yang diharapkan. Peptida yang aktivitasnya paling kuat adalah heksapeptida ADT-6, diikuti oleh deka-peptida HAV-10, ADT-10 dan HAV-6. Pengujian aktivitas senyawa-senyawa peptida dalam menurunkan nilai TEER lapis tunggal sel ini dilakukan dengan menggunakan model percobaan berupa lapis tunggal sel MDCK yang sudah umum digunakan dalam studi penghantaran molekul melintasi sawar biologis, sebagaimana yang dilakukan oleh banyak peneliti sebelumnya [21-25].

Dari Gambar 1 terlihat jelas bahwa perlakuan peptida dari sisi basolateral lapis sel memberikan pengaruh yang berarti. Sejak 3 jam perlakuan, nilai TEER lapis sel menurun dan menunjukkan perbedaan yang cukup berarti dibandingkan dengan nilai TEER lapis sel kontrol blanko dan lapis sel yang diperlakukan dengan peptida kontrol VVA. Perlakuan peptida dari kedua sisi lapis sel, yaitu dari sisi apikal dan basolateral sekaligus lebih memperkuat efek modulasi peptida terhadap integritas *junction* antar sel. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan nilai TEER yang sangat berarti, yaitu sampai menjadi 73% dari TEER semula pada masa perlakuan 5 jam. Penurunan nilai TEER ini bahkan sudah mencapai 75% sejak 3 jam perlakuan.

Walaupun efek pemberian peptida HAV-10 dari sisi basolateral ataupun dari kedua sisi lapis sel sebagaimana yang diuraikan di atas cukup mengesankan, namun pemberian peptida HAV-10 dari sisi apikal ternyata tidak memberikan pengaruh yang berarti. Nilai TEER lapis tunggal sel MDCK yang diperlakukan dengan peptida HAV-10 dari sisi apikal tidak berbeda dengan nilai TEER dari lapis tunggal sel yang tidak diberi perlakuan peptida (blanko) ataupun yang diberi perlakuan peptida kontrol (VVA). Hasil ini membawa pada pemikiran bahwa walaupun sebenarnya peptida HAV-10 ini memiliki aktivitas yang dapat mengganggu integritas *junction* antar sel pada sel MDCK, namun pemberian peptida melalui sisi apikal, karena sesuatu hal, tidak efektif. Salah satu kemungkinan yang diperkirakan menyebabkan hal ini

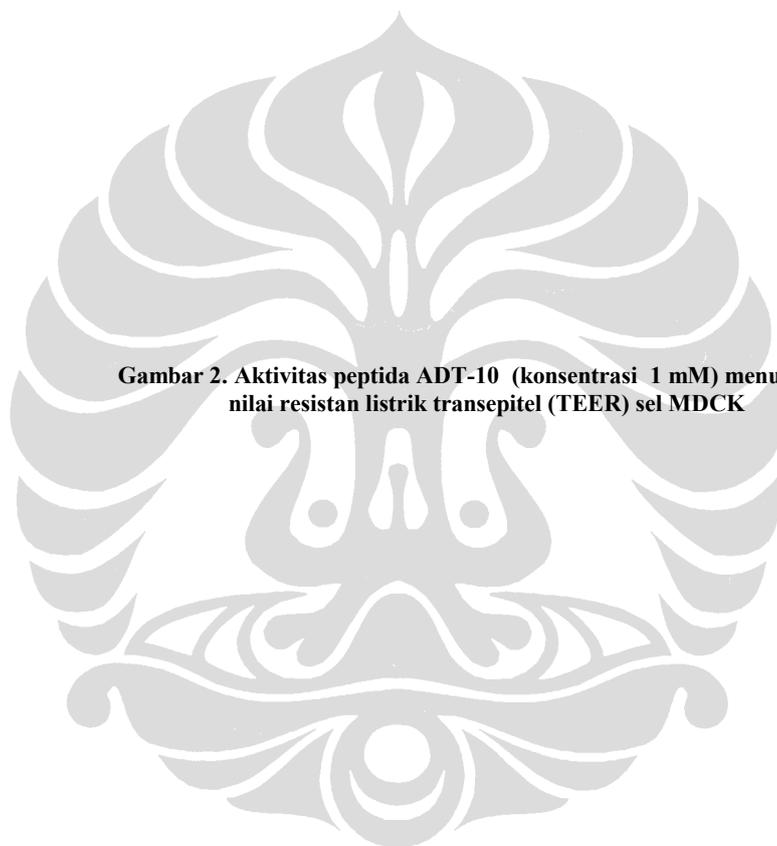
adalah karena molekul-molekul peptida HAV-10 tidak dapat mencapai situs sasaran, dalam hal ini yang dimaksud adalah molekul-molekul kadherin yang terdapat pada *zonula adheren*.

Apabila struktur *junction* antar sel diamati (Gambar 5), tampak bahwa *zonula adheren* terletak pada bagian tengah struktur tersebut. Untuk mencapai *zonula adheren* dari bagian apikal, suatu molekul harus melalui *zonula occluden* atau *tight junction*. Beberapa peneliti melaporkan bahwa *tight junction* merupakan pori yang sangat kecil, yang hanya dapat dilalui oleh molekul berukuran kurang dari 11 Å [1,4]. Kemungkinan molekul HAV-10 berukuran lebih besar dari 11 Å, sehingga tidak dapat melalui celah pada *tight junction* ketika diaplikasikan melalui sisi apikal sel. Faktor lain yang dapat menghambat permeasi paraseluler adalah bentuk dan muatan partikel [1,26,27]. Faktor-faktor inilah yang kemungkinan menghambat aktivitas dekapeptida ini jika diberikan melalui sisi apikal.

Perlakuan peptida sekaligus melalui sisi apikal dan basolateral memberikan efek sinergis. Diperkirakan, molekul peptida yang diberikan melalui sisi basolateral akan mencapai situs sasaran lebih dahulu dan menyebabkan membesarnya celah pada *tight junction*.



Gambar 1. Aktivitas peptida HAV-10 (konsentrasi 1 mM) menurunkan nilai resistansi listrik transepitel (TEER) sel MDCK



Gambar 2. Aktivitas peptida ADT-10 (konsentrasi 1 mM) menurunkan nilai resistansi listrik transepitel (TEER) sel MDCK

Gambar 3. Aktivitas peptida HAV-6 (konsentrasi 1 mM) menurunkan nilai resistansi listrik transepitel (TEER) sel MDCK

Pembesaran celah atau pori ini akan memberikan kesempatan kepada molekul peptida yang berada pada sisi apikal lapis sel untuk melintasi *tight junction* dan mencapai *zonula adheren*. Dengan demikian efek yang diberikan akan lebih besar dibandingkan dengan efek peptida yang diberikan hanya melalui sisi basolateral saja.

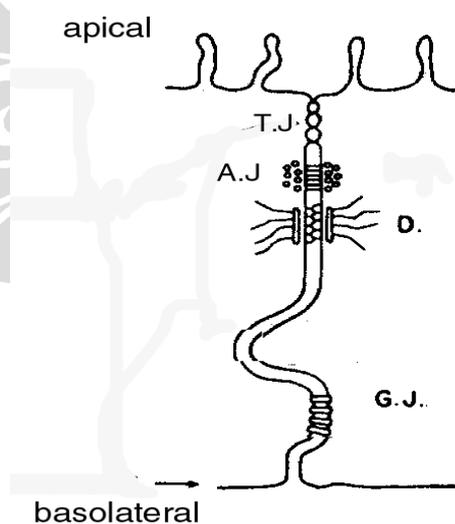
Hal yang serupa tampak pada hasil percobaan perlakuan peptida ADT-10 pada lapis tunggal sel MDCK yang disajikan dalam Gambar 2. Dari kurva ini tampak bahwa peptida ADT-10 memberikan pengaruh yang sangat berarti jika diberikan melalui sisi basolateral ataupun dari kedua sisi lapis sel, namun efeknya sangat jauh berkurang jika diberikan melalui sisi apikal. Agak berbeda dengan efek peptida HAV-10, penurunan nilai TEER lapis sel yang disebabkan oleh pemberian peptida ADT-10 dari sisi apikal masih dapat terlihat, walaupun sangat kecil perbedaannya dengan nilai TEER pada kontrol blanko ataupun yang diberi perlakuan dengan peptida kontrol. Hal ini mungkin disebabkan karena ukuran molekul ADT-10 lebih kecil dari pada peptida HAV-10, yang menyebabkan partikel molekul peptida ADT-10 masih dapat melalui celah *tight junction*.

Jika dilihat konformasi potongan sekuens HAV-10 dan ADT-10 yang diambil dari konformasi E-kadherin dalam larutan [16], tampak bahwa partikel peptida ADT-10 memiliki bentuk yang lebih kompak dibandingkan dengan partikel peptida HAV-10 yang berbentuk lebih terentang (Gambar 6). Perbedaan bentuk ini mungkin menyebabkan partikel peptida ADT-10 lebih mudah melalui celah *tight junction* dibandingkan dengan HAV-10, sehingga perlakuan ADT-10 melalui sisi apikal lapis sel masih dapat memberikan pengaruh terhadap integritas *junction* antar sel sel MDCK.

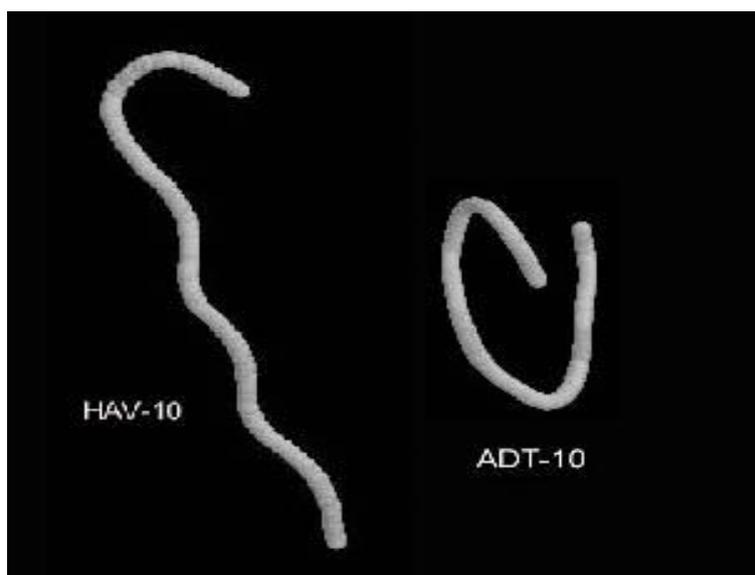
Perlakuan kedua dekapeptida dari sisi basolateral, memberikan hasil yang hampir tidak berbeda. Namun jika diberikan melalui kedua sisi sekaligus, peptida ADT-10 menunjukkan aktivitas modulasi *junction* antar sel yang sedikit lebih kuat dibandingkan dengan peptida HAV-10. Pada 5 jam inkubasi dengan peptida ADT-10, nilai TEER turun hingga 67% dari nilai TEER awal, sedangkan perlakuan dengan peptida HAV-10 hanya menyebabkan penurunan menjadi 73% (Tabel 1). Hal ini diperkirakan ada hubungannya dengan aktivitas peptida melalui sisi apikal lapis sel. Peptida ADT-10 memiliki aktivitas lebih tinggi dari pada peptida HAV-10 jika diberikan melalui sisi apikal. Aktivitas ini akan bersinergi dengan aktivitas basolateral menyebabkan akumulasi aktivitas yang lebih besar pada perlakuan dengan ADT-10 dibandingkan dengan perlakuan dengan HAV-10.

Dalam mengantisipasi penggunaan *in vivo* dari peptida-peptida ini sebagai molekul yang diharapkan dapat meningkatkan penghantaran molekul obat melalui sawar biologis, maka diperlukan senyawa yang efektif melalui sisi apikal. Sebab sebagaimana diketahui, secara *in vivo* penghantaran molekul-molekul peptida ini ke situs sasarannya terutama berlangsung dari bagian apikal menuju bagian basolateral dari lapisan epitel yang membentuk sawar biologis. Jadi sebelum bekerja di situs sasarannya, yaitu pada molekul-molekul kadherin yang terdapat di *zonula adheren*, peptida-peptida sintetik ini terlebih dahulu harus mampu mengatasi rintangan *tight junction*. Untuk itu, dalam penelitian ini

Gambar 4. Aktivitas peptida ADT-6 (konsentrasi 1 mM) menurunkan nilai resistansi listrik transepitel (TEER) sel MDCK



Gambar 5. Gambar skematik struktur junction antar sel (T.J. = tight junction, A.J. = adheren junction/zonula adheren, D=desmosom, G.J.= gap junction)



Gambar 6. Konformasi potongan sekuens peptida HAV-10 dan ADT-10

Tabel 1.
Perbandingan aktivitas peptida dalam menurunkan resistan listrik transeptel (TEER) sel MDCK

No.	Peptida*	Persentase penurunan TEER (%)** rata-rata resistalistrik transeptel ** (%)		
		apikal	basolateral jam	ap-ba
1	Ac-LFSHAVSSNG-NH ₂	102	77	73
2	Ac-QGADTPPVG-NH ₂	92	78	67
3.	Ac-SHAVSS-NH ₂	87	90	86
4.	Ac-ADTPPV-NH ₂	77	71	70
5.	Ac-VVA-NH ₂ (Peptida kontrol)	106	106	106
6	Media tanpa peptida (Blanko)	104	104	104

* Peptida uji diberikan dalam bentuk larutan 1 mM dalam HBSS

** Pengamatan dilakukan setelah lapis tunggal sel diinkubasi selama 5 jam dalam larutan peptida uji

dicoba memperkecil partikel peptida dengan mensintesis heksapeptida yang berasal dari kedua dekapeptida tersebut. Diharapkan, heksapeptida yang disintesis ini akan lebih mudah mencapai *zonula* adheren, sehingga lebih efektif dari pada dekapeptida homolognya.

Dari sekuens LFSHAVSSNG dibentuk heksapeptida SHAVSS, mengingat pada sekuens ini bagian yang penting adalah sekuens HAV. Dari sekuens QGADTPPVG dibentuk heksapeptida ADTPPV, sebab dari eksperimen "*molecular docking*", diperoleh kesan bahwa bagian yang penting dari sekuens ini adalah sekuens ADT. Pola reduksi ADT-10 menjadi ADT-6 juga mengikuti pola reduksi HAV-10 menjadi HAV-6, yaitu dengan mereduksi masing-masing 2 residu asam amino baik dari ujung amino maupun ujung karboksil senyawa peptida.

Dari Gambar 3 tampak bahwa aktivitas peptida HAV-6 dapat dikatakan sama, baik diberikan melalui sisi apikal, basolateral, maupun dari kedua sisi sekaligus. Hal ini menunjukkan bahwa molekul peptida HAV-6 dapat mencapai situs sasaran sama mudahnya, baik melalui sisi apikal maupun basolateral lapis sel. Pemberian dari kedua sisi juga

memberikan hasil yang sama, kemungkinan karena pemberian melalui sisi apikal maupun basolateral tersebut sudah memberikan hasil yang maksimal, sehingga tidak ada lagi pengaruh tambahan dari pemberian serentak dari kedua sisi lapis sel.

Dilihat dari sisi peningkatan aktivitas peptida HAV-6 dibandingkan dengan peptida HAV-10 jika diberikan melalui sisi apikal, maka dapat dikatakan tujuan reduksi dekapeptida menjadi heksapeptida tercapai. Namun reduksi peptida HAV-10 menjadi HAV-6 ternyata juga menyebabkan penurunan aktivitas modulasi peptida terhadap *junction* antar sel secara umum. Perlakuan lapis sel MDCK dengan larutan peptida HAV-10 1 mM selama 5 jam dapat menyebabkan penurunan nilai TEER menjadi 73 %, sedangkan perlakuan yang sama dengan peptida HAV-6 hanya menyebabkan penurunan TEER menjadi 86% (Tabel 1). Penurunan aktivitas ini diperkirakan disebabkan oleh hilangnya atau berkurangnya kontribusi residu asam amino yang berada di sekitar situs aktif pengikatan peptida-kadherin. Lebih jauh lagi, dekapeptida ini mungkin memiliki kestabilan konformasi yang lebih baik dibandingkan dengan heksapeptida homolognya. Secara umum dapat dikatakan, makin pendek rantai peptida, konformasinya cenderung makin bersifat random (acak). Namun hal ini masih merupakan dugaan yang harus dibuktikan kebenarannya melalui penelitian yang lebih mendalam.

Pengaruh perlakuan peptida ADT-6 terhadap nilai TEER lapis sel MDCK disajikan dalam Gambar 4. Sebagaimana halnya pada peptida-peptida HAV, reduksi ADT-10 menjadi ADT-6 meningkatkan aktivitas peptida tersebut melalui aplikasi apikal, yaitu penurunan nilai TEER menjadi sebesar 92% pada perlakuan dengan ADT-10 dan penurunan menjadi 77% pada perlakuan dengan ADT-6 (Tabel 1). Namun berlainan dengan peptida-peptida HAV, reduksi jumlah asam amino pada peptida-peptida ADT tidak menurunkan aktivitas basolateralnya. Boleh jadi, pada sekuens ini kontribusi residu asam amino sekitar gugus aktif tidak banyak mempengaruhi kestabilan dan afinitas peptida terhadap kadherin.

4. Kesimpulan

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa keempat peptida kadherin yang diuji dalam penelitian ini, yaitu Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10), Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6), Ac-QGADTPPVGV-NH₂ (ADT-10), dan Ac-ADTPPV-NH₂ (ADT-6) memiliki aktivitas modulasi terhadap *junction* antar sel yang ditunjukkan dengan kemampuan untuk menurunkan nilai resistansi listrik trans epitel (TEER) lapis tunggal sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*). Dengan demikian, keempat senyawa peptida kadherin ini potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) dalam mengkonstruksi senyawa modulator *junction* antar sel dalam penghantaran molekul obat (*drug delivery*) melintasi sawar biologis.

Dari hasil penelitian ini juga terungkap bahwa heksapeptida, HAV-6 dan ADT-6, memiliki kekuatan yang lebih besar dibandingkan dengan dekapeptida homolognya dalam menunjukkan aktivitasnya pada aplikasi melalui sisi apikal, kemungkinan disebabkan ukuran molekulnya yang lebih kecil sehingga lebih mudah melintasi *tight junction*.

Hasil penelitian ini memberikan sumbangan yang berarti dalam pemantapan suatu metoda baru dalam penghantaran obat (*drug delivery*) melalui modulasi *junction* antar sel menggunakan senyawa-senyawa peptida kadherin.

Ucapan Terima Kasih

Para penulis mengucapkan terima kasih kepada Kansas University, Lawrence KS USA, yang telah memberikan dana dan fasilitas penelitian lainnya dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Acuan

- [1] B. Gumbiner, *Am. J. Physiol.* 253 (1987) 749.
- [2] G.M. Pauletti, S. Gangwar, T.J. Siahaan, J. Aube, R.T. Borchardt, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 27 (1997) 235.
- [3] K.L. Lutz, T.J. Siahaan, *Drug Delivery* 4 (1997) 187.
- [4] D. Pal, K.L. Audus, T.J. Siahaan, *Brain Research* 747 (1997) 103.
- [5] I.T. Makagiansar, K.L. Lutz, K.L. Audus, T.J. Siahaan, 16th American Peptide Symposium, Minnesota, USA, 1999, pA527.
- [6] T.J. Siahaan, I.T. Makagiansar, H. Yusuf-Makagiansar, E. Sinaga, K.L. Audus. In: G.B. Fields, J.P. Tam, G. Barany (Eds.), *Peptides for the Millenium*, Kluwer Academic Publisher, Boston, 2000, p.209.

- [7] L.L. Rubin, J.M. Staddon. *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 11.
- [8] K.L. Lutz, T.J. Siahaan. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 977.
- [9] C. Kirkpatrick, M. Peifer, *Curr. Op. Gen. Dev.* 5 (1995) 56.
- [10] M. Overduin, T.S. Harvey, S. Bagby, I.T. Kit, P. Yau, M. Takeichi, M. Ikura, *Science* 267 (1995) 172.
- [11] B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J.M. Rini, *Nature* 380 (1996) 360.
- [12] A.W. Koch, S. Pokutta, A. Lustig, J. Engel, *Biochemistry* 36 (1997) 7697.
- [13] J. Alattia, J.B. Ames, T. Porumb, I.T. Kit, M.H. Yew, P. Ottensmeyer, C.M. Kay, M. Ikura, *FEBS Letters* 417 (1997) 405.
- [14] J. Willem, E. Bruyneel, V. Noe, H. Slegers, A. Zweysen, R. Mege, M. Mareel, *FEBS Letter* 363 (1995) 289.
- [15] V. Noe, J. Willems, J. Vandekerckhove, F. van Roy, E. Bruyneel, M. Mareel, *J Cell Sci* 112 (1999) 127.
- [16] K.L. Lutz, T.J. Siahaan, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 211 (1995) 21.
- [17] K.L. Lutz, L.A. Szabo, D.L. Thompsons, T.J. Siahaan, *Peptide Res.* 9 (1996) 233.
- [18] O.W. Blaschuck, R. Sullivan, S. David, Y. Poulliot, *Dev. Biol.* 139 (1990) 227.
- [19] E. Sinaga, S.D.S. Jois, M. Avery, I.T. Makagiansar, U.S.F. Tambunan, K.L. Audus, T.J. Siahaan, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1170.
- [20] G.B. Fields, Z. Tian, G. Barany, Grant GA (Eds.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
- [21] E.L. Boulpaep, J.F. Seely, *Am. J. Physiol.* 221 (1971) 1084.
- [22] E. Stefani, M. Cerejido, *J. Membrane Biol.* 73 (1983) 177.
- [23] L. Gonzales-Mariscal, B. Chavez de Ramirez, M. Cerejido, *J. Membrane Biol.* 86 (1985) 113.
- [24] C.B. Collares-Buzato, M.A. Jepson, G.T.A. McEwan, N.L. Simmons, B.H. Hirst, *Histochemistry* 101 (1994) 185.
- [25] O.N. Kovbasnjuk, U. Szmulowicz, K.R. Spring, *J. Membrane Biol.* 161 (1998) 93.
- [26] F.W. Okumu, G.M. Pauletti, D.G. van der Velde, T.J. Siahaan, R.T. Borchardt, *Pharm. Res.* 14 (1997) 169.
- [27] G.M. Pauletti, F.W. Okumu, R.T. Borchardt, *Pharm. Res.* 14 (1997) 164.