

LOSS OF HETEROZYGOSITY ANALYSIS OF RAR β_2 GENE IN THE PATHOGENESIS OF BREAST CANCER

ANALISIS LOSS OF HETEROZYGOSITY GEN RAR β_2 PADA PATOGENESIS KANKER PAYUDARA

I Ketut Gede Muliarta*, Wibi Riawan**, Asnah Hidayati*, Fitri Armania**

* Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

** Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the event of loss of heterozygosity of retinoid acid receptor (RAR β_2) gene on the chromosom 3p24 in the pathogenesis of breast cancer. The breast cancer is the most malignant tumor that leads the second cause of death among the female. The recent concept of the theory of pathogenesis breast cancer is molecular genetic approaches such as apoptosis gene, oncogen, suppressor gene, and growth promoting factor gene. However, the diagnostic and therapy of breast cancer are still not satisfied. The lost or decreased in the expression of RAR β_2 gene on 3p24 chromosome via loss of heterozygosity (LOH) mechanism are the role of pathogenesis of breast cancer. Design of the research is by experimental and observational. Human female breast cancer and blood samples were gained from public hospital RSUD dr. Saiful Anwar, Malang. DNA was extracted from lymphocyte and tissue using Macherey-Nagel system kit. Loss of heterozygosity (LOH) incident in 3p24 chromosome was detected by PCR and Chromogenic in situ Hybridization (CISH) method. Result showed that LOH event has detected in chromosome 3p24 with the absence of several band of DNA by PCR. The LOH event also expressed in breast cancer tissues through the reduction of RAR β_2 expression as the grade of breast cancer increase. RAR β_2 gene is located at chromosome 3p24, and LOH event in chromosome 3p24 is common in breast cancer.

Key words : RAR β_2 gene, breast cancer, LOH

PENDAHULUAN

Kanker payudara menjadi penyebab kematian nomer dua pada wanita sampai saat ini. Pengobatan dan diagnosis kanker payudara belum memuaskan. Teori tentang peranan gen p53 dan pRb (Retinoblastomata) sudah banyak diungkap, akan tetapi pendekatan epigenetik misalnya pada gen reseptor asam retinoat β_2 (RAR β_2) sebagai gen supresor tumor belum banyak diungkap. Hilangnya aktifitas gen RAR β_2 disebabkan oleh banyak faktor antara lain oleh modifikasi epigenetik dan hilangnya heterozigositas sehingga disebut sebagai *silence suppressor gene* (1,2).

Retinoat adalah sekelompok bahan yang secara struktural maupun fungsional analog dengan vitamin A. Vitamin A ada 3 bentuk, salah satu bentuk yang masih belum banyak diteliti adalah asam retinoat. Retinoat merupakan mediator penanda yang tepat bagi morfogenesis embrional, pertumbuhan dan diferensiasi sel. Penggunaan retinoat sebagai supresor tumor telah dievaluasi pada beberapa hewan model kanker. Model tersebut antara lain

kanker kulit, kanker payudara, kanker rongga mulut, paru, hati, saluran cerna, prostat dan kandung kemih. Laporan klinis membuktikan retinoat dapat menyembuhkan lesi premalignant dan menghambat perkembangan tumor primer. (3,4,5).

Retinoat merangsang reseptor gen RAR β_2 untuk bereksresi, secara langsung maupun tidak langsung, untuk mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel normal, sel premalignant atau sel malignant. Reseptor yang dimaksud antara lain reseptor asam retinoat, (RARS) dan reseptor x retinoid (RXRS). Reseptor tersebut merupakan faktor transkripsi dan masih termasuk anggota superfamili reseptor hormon steroid. Reseptor ini aktif karena berikatan dengan ligan. Reseptor retinoat terdiri atas tiga subtype yaitu subtype α , β , dan χ . Dalam mengaktifkan fungsi transkripsi retinoat harus berikatan dengan RAR/RAR heterodimer atau RXR homodimer dengan mengikat daerah promoter pada gen target yang merespon retinoat (1). Salah satu target gen reseptor adalah RAR β_2 yang dipetakan dalam kromosom 3p24 (paling banyak 45%) yaitu daerah yang paling banyak menghapus heterozigositas (LOH) pada kasus tumor payudara primer. Pada kultur *cell line* tumor payudara, ekspresi RAR β_2 mampu menghambat proliferasi sel yang bersangkutan. Selain itu telah dilaporkan bahwa RAR

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No. 2, Agustus 2008
Korespondensi: I Ketut Gede Muliarta,
Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas
Brawijaya; Telp: (0341) 569117

β_2 dapat menurunkan atau menekan pertumbuhan sejumlah tumor malignant seperti, karsinoma paru, karsinoma sel squamosa pada daerah kepala dan leher serta kanker payudara. (6,7).

Penemuan ini membuktikan bahwa RAR β_2 mempunyai peran penting dalam proses penghambatan pertumbuhan beberapa jenis sel kanker dan hilangnya aktifitas pengatur tumorigenesis. Untuk menjawab mengapa RAR β_2 mampu menekan bahkan menghilangkan tumor malignan, maka usaha keras telah dilakukan untuk mengidentifikasi langsung kemungkinan perubahan yang terjadi akibat kerja promotor RAR β_2 disamping faktor-faktor yang mengatur mekanisme tersebut. Penelitian terakhir mengemukakan bahwa pada kanker payudara memperlihatkan adanya mekanisme metilasi pada region promotor RAR β_2 .

Pada kultur *cell line* kanker payudara, retinoat tidak mampu menginduksi ekspresi gen RAR β_2 , meskipun dalam sel tumor mampu mentransaktivkan RARE β_2 . Hal ini juga teramati pada kultur kanker sel HeLa. Ketidakkampuan ini disebabkan adanya mekanisme yang menghambat ekspresi gen RAR β_2 . Beberapa penelitian mengamati adanya bukti metilasi pada daerah promotor gen RAR β_2 dan bukan kejadian mutasi. Gote *et al.* 1998, pertama kali mengatakan bahwa dalam *cell line* kanker kolon, kejadian metilasi mungkin sebagai respon terhadap menurunnya ekspresi gen RAR β_2 (8). Data ini menunjukkan bahwa *epigenetic silencing* promotor gen RAR β_2 diduga merupakan kejadian penting dalam kanker payudara dan mekanisme *epigenetic silencing* berkaitan dengan metilasi gen promotor RAR β_2 (8,9,10).

Kejadian LOH dapat disebabkan oleh inaktivasi mutasi sebuah alel karena delesi. Inaktivasi bialel telah diamati pada gen supresor seperti p53 dan APC. Sedangkan pada gen RAR β_2 belum diketahui mekanismenya. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa metilasi region promotor RAR β_2 berhubungan dengan *epigenetic silencing gene* dan mekanisme *silencing* menyebabkan inaktivasi bialel gen RAR β_2 . Pengetahuan mengenai perubahan epigenetik pada RAR β_2 mempunyai implikasi pada terapi dan pencegahan kanker. Represi transkripsi karena metilasi DNA diperantarai oleh proses sequence bebas yang melibatkan perubahan tingkat struktur DNA termetilasi diikuti oleh sesuatu yang kompleks yang berisi korepresor transkripsional dan histon deasetilasi. Diasetilasi histon berkaitan dengan berkurangnya tingkat transkripsi yang barangkali berkaitan dengan ikatan nucleosomal packing. Pada ikatan RXR=RAR heterodimer dengan RARE, struktur kromatin berubah secara dinamis dan mengelilingi promotor gen RAR β_2 . Oleh karena itu penjelasan mengenai mekanisme epigenetik RAR β_2 mungkin sesuai untuk mengerti berbagai jenis kanker. (11,12).

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Penelitian ini dilakukan dengan metode observasional. Jaringan kanker payudara dan sampel darah penderita diperoleh dari RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang. Jaringan telah didiagnosis sebagai *infiltrating ductal carcinoma mammae* oleh patologis menggunakan pewarnaan HE.

Ekstraksi DNA

DNA diekstrak dari jaringan kanker dan sel limfosit penderita juga dari orang normal menggunakan kit Macherey-Nagel System (Germany). DNA total divisualisasi pada gel agarosa 1% yang mengandung ethidium bromida.

Loss of Heterozygosity (LOH) Analysis dengan PCR

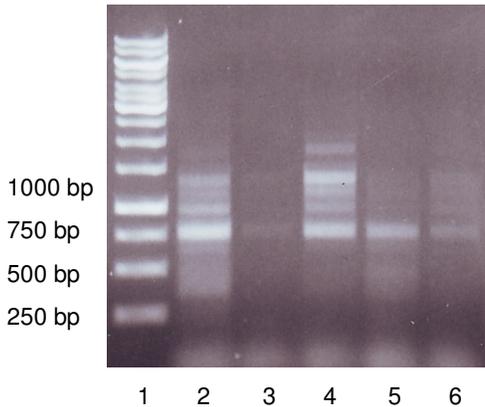
Loss of heterozygosity pada kromosom 3p24 dideteksi menggunakan metode PCR. Reaksi dilakukan menggunakan bahan PCR bead (GE, UK). Primer yang digunakan adalah : primer forward 5'-GTG CCC TTC CAG GAG TT-3' primer reverse 5'-AGT GAG GCA TCC ACT ACC-3' (1st base, Singapore). Siklus PCR terdiri dari predenaturasi 95°C selama 10 menit diikuti dengan 95°C selama 30 detik, 55°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, sebanyak 30 kali. Tahap ini diikuti dengan ekstensi final 72°C selama 10 menit. Produk PCR dikonfirmasi pada gel agarosa 1,2%.

Analisa Loss of Heterozygosity (LOH) dengan Chromogenic *in situ* Hibridization (CISH)

Metode ini digunakan untuk mendeteksi produk mRNA dari gen RAR β_2 . Jaringan kanker payudara pada slide dicuci dengan HEPES kemudian diinkubasi dalam 2x Trisodium Citrate (SSC)0 buffer mengandung DNase selama 1 jam, suhu 37°C. Jaringan kemudian dicuci dalam dH₂O lalu 2x SSC buffer selama 10 minute. Refiksasi dalam 4% formaldehyde, dicuci dengan dH₂O, rehidrasi dalam alkohol berseri 70%-100%. Kemudian LOH *nucleotides-biotin labeled* (1st base, Singapore) ditambahkan diatas jaringan, didenaturasi pada 85°C for 10 min, dan inkubasi pada 37°C semalaman. Jaringan dicuci dalam buffer dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 45 menit. Jaringan kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam 2x SSC buffer, dan 55°C selama 15 menit dalam 0,1x SSC buffer. Jaringan kemudian didehidrasi dalam alkohol berseri 30%-95%, masing-masing mengandung 0,3 M ammonium acetate, dicuci dengan buffer *Tris-NaCL-Tween* (TNT) dan diblok dalam buffer *Tris-NaCL-Containing Blocking* (TNB) semalaman. Jaringan ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxide* (SAB-HRP) lalu diinkubasi dalam *Diamino Benzidine* (DAB) selama 10 menit dan ditetesi Mayer-Hematoxyline. Jaringan siap diamati menggunakan mikroskop.

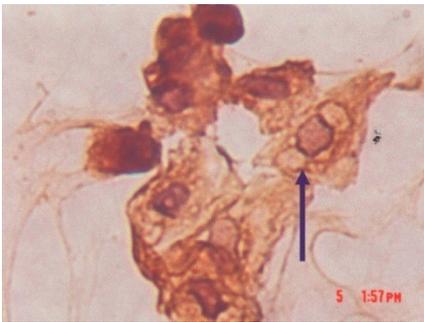
HASIL PENELITIAN

Pada penderita Ca Mammae terjadi penurunan atau hilangnya heterizigositas (LOH) dengan tidak diamplifikasi segmen DNA dengan panjang sekitar 1000 bp, 1100bp, 1300 bp, dan 1900 bp (gambar 1). Kejadian ini teramati pada sampel DNA limfosit dan jaringan. Pada sampel limfosit dan jaringan normal tampak lebih banyak pita DNA.

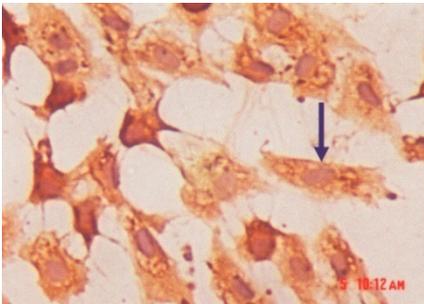


Hasil Deteksi Loss of Heterozygosity pada Kromosom 3p24 menggunakan Metode PCR

Gambar 1. (1) 1 kb DNA ladder (Fermentas), (2 & 4) Hasil PCR DNA limfosit normal, (5) Hasil PCR DNA jaringan normal, (3) Hasil PCR DNA limfosit ca mammae, (6) Hasil PCR DNA jaringan ca mammae



Gambar 2. Penurunan ekspresi RAR β_2 pada kultur sel kanker payudara grade 3 dengan metode CISH (900x)



Gambar 3. Penurunan ekspresi RAR β_2 pada kultur sel kanker payudara grade 4 dengan metode CISH (900X)

Hasil identifikasi ekspresi RAR β_2 pada grade 3 dan 4 tampak gambaran sel-sel ganas kanker payudara dengan penurunan ekspresi RAR β_2 dengan menipisnya warna coklat pada sel kanker

tersebut dari grade yang tinggi dengan pewarnaan teknik immunohistokimia. Pada grade 4 tampak jelas terlihat hilangnya ekspresi RAR β_2 .

DISKUSI

Hasil penelitian ini menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi RAR β_2 penelitian lainnya juga mendapatkan berkurangnya ekspresi mRNA RAR β_2 diamati pada beberapa tumor solid seperti karsinoma paru, karsinoma sel, squamosa. Bukti-bukti mendukung hipotesis bahwa gen RAR β_2 adalah gen supresor tumor. Selain ini mekanisme supresor RAR β_2 pada target lain belum diketahui.

Kejadian LOH dapat disebabkan oleh inaktivasi mutasi sebuah alel karena delesi. Inaktivasi bialel telah diamati pada gen supresor seperti p53 dan APC. Sedangkan pada gen RAR β_2 belum diketahui mekanismenya. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa metilasi region promotor RAR β_2 berhubungan dengan *epigenetic silencing gene* dan mekanisme *silencing* menyebabkan inaktivasi bialel gen RAR β_2 . Pengetahuan mengenai perubahan epigenetik pada RAR β_2 mempunyai implikasi pada terapi dan pencegahan kanker. Represi transkripsi karena metilasi DNA diperantarai oleh proses *sequence* bebas yang melibatkan perubahan tingkat struktur DNA termetilasi diikuti oleh sesuatu yang kompleks yang berisi korepresor transkripsional dan histon deasetilasi. Diasetilasi histon berkaitan dengan berkurangnya tingkat transkripsi yang barangkali berkaitan dengan ikatan nucleosomal packing. Pada ikatan RXR=RAR heterodimer dengan RARE, struktur kromatin berubah secara dinamis dan mengelilingi promotor gen RAR β_2 . Oleh karena itu penjelasan mengenai mekanisme epigenetic RAR β_2 mungkin sesuai untuk mengerti berbagai jenis kanker.(11,12).

Promoter gen RAR β_2 termasuk motif RARE dapat diaktifkan oleh RAR/retinoat X reseptor (R X R) heterodimer. Dalam cell line kanker payudara retinoat tidak mampu menginduksi ekspresi gen RAR β_2 . Meskipun dalam sel tumor mampu mentransaktifkan RARE β_2 . Kenyataan ini mendukung konsep yang menyatakan reseptor endogenus berisi sejumlah mutasi atau polymorphism yang terdiskripsi dalam fungsi. Jadi tampaknya regio promotor RAR β_2 bukan merupakan target mutasi beberapa kanker sehingga adanya mekanisme lain seperti supresi RAR β_2 perlu dipertimbangkan. Beberapa peneliti mengatakan bahwa dalam *cell line* kanker kolon, metilasi mungkin sebagai respon mekanisme akibat kekurangan ekspresi gen RAR β_2 (9). Data ini menunjukkan bahwa *epigenetic silencing* promotor gen RAR β_2 diduga merupakan kejadian penting dalam kanker payudara dan mekanisme silencing epigenetic berkaitan dengan metilasi gen promotor RAR β_2 .

Laporan penelitian ini menemukan hilangnya heterozigositas RAR β 2 dalam kromosom 3P24 dan merupakan hal umum dalam kasus kanker payudara yang belum banyak diungkap.

KESIMPULAN

Pada penderita Ca Mammae terjadi penurunan (hilangnya) heterozigositas. Pada kromosom 3P24 yang terdeteksi sampel DNA darah dan jaringan. Hilangnya 4 fragmen DNA yaitu 1000 bp, 1100bp, 1300 bp, dan 1900 bp .

SARAN

Hasil penelitian ini dapat dikembangkan untuk diagnose dan rencana terapi bagi penderita kanker payudara dengan pendekatan epigenetik dengan menganalisa sekuen asam amino yang mengalami perubahan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Tim peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada kepala proyek program intensif dasar dengan nomor 39/RD/Insentif/PPK/I/2007 yang telah menyetujui dan membiayai penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Deng G, Luy Zionikov G dan AD Smith AS. *Loss of heterozygosity a normal tissue adjacent to breast carcinoma*. Science, 1995; 274:2057-2059
2. Cotran, Robbins, R.L. dan Kumar, V. 1989, *Pathology Basic of Disease: Breast Cancer*, 4th edition, WB Saunders International Edition, Four Edition, 1989; 192-200.
3. Evans TRJ, Kayes. B. *Retinoids present role and future BRJ Cancer*. 1999;80:1-6.
4. Khramer, Digiovanna JJ, Peck GL. *Chemoprevention of skin cancer xerodermal pigmentosom*, J. Dermato. 1992, 1987; 715 – 718.
5. Lippman SM, lee JJ, Sabichi Al. *Cancer chemoprevention progress and promise*. J. Nati Cancer inst; 1998 ;85:1492 – 1498.
6. Liu X, Lee Mo, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, Reed JL, Zhang X. *Retinoic acid by promoting apoptosis human breast cancer cells*. Mo Cell Biol, 1996;6:1188 – 1149
7. Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, Subramayan S, Orlandi R, Sukumar S, Sacchi N. *evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta 2 promoter n breast cancer cell oncogene*. 2000;19:1556 – 1563
8. Gote S, sinrett D, Momparier RL. *Demethylation by 5-aza 2 deoxy cytidine at specific 5-methylcytosine s les in the promoter region on the retinoid acid receptor beta gene in human colon carcinoma cell antitumor drugs*. 19989:743 – 750
9. Kane MF, Loda M, Gaida GM Lipmann J, Mishra, Goldman – fassud JM Kolodner R. *Methylation of the aMLH promoter correlated with lack of expression of VLH a sporadic colon tumor and stomach detective human tumor cell cancer*. res 1997; 57: 5556-5560
10. Knazer K, Vogeisteir B. *Lesson from hereditary colorectal cancer cel*. 1996;87:159-192
11. Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Khotary R, Bradey WE. *Lung tumors in mice expressing an antisense RAR β 2*. Transgene Faseb. 1996; 10 - 09 – 1097.