

Profil Mutasi H-RAS Ekson 2, 3, 4 pada Karsinoma Urotelial Buli dan *Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential* di RSHS Bandung Periode 2010-2015

Ris Kristiana, Bethy S. Hernowo, Sri Suryanti*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran Bandung***ABSTRAK****Latar belakang**

Karsinoma urotelial adalah tumor ganas dari epitel transisional buli yang terbagi menjadi karsinoma urotelial infiltratif dan karsinoma urotelial papiler non invasif. Pada buli, karsinoma urotelial merupakan jenis keganasan terbanyak (90%) dan merupakan keganasan yang menjadi penyebab kematian ketiga dari tumor urogenital. H-RAS adalah bagian dari keluarga RAS yang berperan dalam proliferasi sel, diferensiasi dan maturasi. Mutasi H-RAS pertama kali ditemukan pada karsinoma urotelial dan dapat terjadi pada setiap derajat dan stadium. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil mutasi H-RAS ekson 2, 3 dan 4 pada karsinoma urotelial buli.

Metode

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif retrospektif pada 40 sampel blok parafin yang memenuhi kriteria inklusi dan telah didiagnosis sebagai karsinoma urotelial pada tahun 2010-2015 di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Hasan Sadikin Bandung. Pada semua sampel dilakukan pemeriksaan PCR dengan menggunakan *Gene Amp PCR System 9700* kemudian dilakukan pemeriksaan sekuensing DNA pada ekson 2, 3 dan 4 dengan menggunakan metoda Sanger. Variabel lain yang diteliti adalah tipe histopatologik karsinoma urotelial buli yang dibagi menjadi karsinoma urotelial infiltratif dan karsinoma urotelial papiler non invasif.

Hasil

Dari 40 sampel blok parafin yang diperiksa hanya 13 yang dapat dilakukan sekuensing. Sebanyak 4 (30,7%) dari 13 sampel yang dapat di sekuensing mengalami mutasi pada ekson 3 dan sisanya adalah *wild type*. Mutasinya berupa substitusi T>A dan A>C sehingga terjadi perubahan protein metionin menjadi lysin dan serin menjadi arginin. Mutasi H-RAS lebih banyak terjadi pada PUNLMP.

Kesimpulan

Tidak terdapat mutasi H-RAS pada ekson 2 dan 4 pada 13 sampel yang dilakukan sekuensing. Mutasi H-RAS terjadi pada ekson 3, satu mutasi terjadi pada IUC pT3 dan sisanya terjadi pada PUNLMP.

Kata kunci : H-RAS, karsinoma urotelial, mutasi, PUNLMP.

ABSTRACT**Background**

Urothelial carcinoma is a malignant tumor of the bladder transitional epithelium which is divided into infiltrating urothelial carcinoma and non invasive papillary urothelial carcinoma. In the bladder, urothelial carcinoma is the most common malignancy (90%) and became the third cause of death due to urogenital malignancy. H-RAS is the part of RAS family that plays a role in cell proliferation, differentiation and maturation. H-RAS mutation was first discovered in urothelial carcinoma and can occur at any grade and stage. The purpose of this study is to determine the profile of H-RAS mutations in exons 2, 3 and 4 in bladder urothelial carcinoma.

Methods

This research use a descriptive retrospective design on 40 samples of paraffin embeded tissue (PET) that meet inclusion criteria and had been diagnosed as urothelial carcinoma in 2010-2015 at Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung. All of the samples were examined with PCR by using PCR System 9700 then examined the DNA sequencing of exons 2, 3 and 4 using the Sanger method. Other variables studied were histopathological type of urothelial carcinoma of the bladder, divided into infiltrative urothelial carcinoma and non invasive papillary urothelial carcinoma.

Results

There were 13 samples of PET from 40 samples that could be examined by sequencing, among which 4 or 30.7% (from 13 sequenced samples) showed mutation in exon 3 and the rest is wild type. The mutations were substitution T>A and A>C resulting in protein change of methionine into lysine and serine into arginine.

Conclusion

There were no H- RAS mutations in exons 2 and 4. H-RAS mutation occurred in exon 3, one mutation occurred in urothelial carcinoma inftrating pT3 and the rest occurred in PUNLMP .

Key words : H-RAS, mutation, PUNLMP, urothelial carcinoma.

PENDAHULUAN

Karsinoma urotelial adalah keganasan yang berasal dari sel epitel transisional buli. Karsinoma urotelial merupakan keganasan paling banyak pada buli (90%) dan menjadi penyebab kematian nomor tiga pada pasien akibat tumor urogenital. Di seluruh dunia, karsinoma urotelial menempati urutan ke empat dari seluruh jenis karsinoma dengan insiden sekitar 336.000 kasus setiap tahun. Karsinoma urotelial paling banyak terjadi pada laki-laki daripada wanita dengan rentang usia di atas 50 tahun.¹⁻³

Tumor urotelial dibagi menjadi karsinoma urotelial infiltratif dengan variannya dan neoplasma urotelial non invasif (yang diteliti pada penelitian ini adalah PUNLMP, karsinoma urotelial papiler non invasif derajat rendah dan tinggi). Karsinoma urotelial infiltratif merupakan karsinoma urotelial yang telah mengadakan invasi sampai ke bawah membrana basalis. Berdasarkan kedalaman invasi sel-sel tumor, karsinoma urotelial infiltratif dibagi menjadi 4 stadium patologi. PUNLMP merupakan tumor papilari urotelial yang menunjukkan adanya proliferasi selular yang ditandai dengan meningkatnya ketebalan sel urotelial. Karsinoma urotelial papilari non invasif merupakan karsinoma urotelial papilari yang belum mengadakan invasi ke bawah membrana basalis dengan berbagai tingkat inti yang atipik. Berdasarkan derajat inti yang atipik, karsinoma urotelial papilari non invasif dibagi menjadi karsinoma urotelial papilari non invasif derajat rendah (*non invasive papillary urothelial carcinoma low grade*), dan karsinoma urotelial papilari non invasif derajat tinggi (*non invasive papillary urothelial carcinoma high grade*).¹⁻⁵

Lebih dari 70% karsinoma urotelial pada umumnya adalah tipe non invasif dengan tingkat rekurensi yang tinggi sekitar 50-70%, serta dapat berubah menjadi karsinoma invasif derajat tinggi (10-20%), dua puluh persen karsinoma urotelial saat diagnosis berupa karsinoma urotelial infiltratif dengan angka kesintasan hidup 5 tahun kurang dari 50%.¹⁻³

Pada karsinoma urotelial, H-RAS (Harvey-RAS) memiliki peranan penting dalam karsinogenesis terutama pada karsinoma urotelial derajat rendah. Prevalensi aktivasi H-RAS pada karsinoma urotelial derajat rendah sangat tinggi (lebih dari 90%). Pada karsinoma urotelial infiltratif prevalensinya lebih rendah (kurang dari 20%).⁶⁻¹⁰

Lokasi mutasi H-RAS dapat terjadi pada ekson 2, 3 dan 4 pada berbagai derajat dan stadium. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui profil mutasi H-RAS ekson 2, 3 dan 4 pada karsinoma urotelial infiltratif, non invasif dan PUNLMP. Dengan mengetahui profil genetik pada karsinoma urotelial diharapkan dapat digunakan untuk membantu penatalaksanaan karsinoma urotelial buli dengan menggunakan terapi target.⁸⁻¹⁰

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan desain deskriptif retrospektif untuk melihat profil mutasi H-RAS ekson 2, 3 dan 4 pada berbagai tipe histopatologi karsinoma urotelial buli di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Hasan Sadikin Bandung dalam kurun waktu Januari 2010-30 Agustus 2015. Jumlah sampel didapat sebanyak 40 sampel yang memenuhi kriteria inklusi, yaitu blok parafin yang mengandung cukup sel tumor.

Pada semua sampel dilakukan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran dengan menggunakan alat PCR System 9700 GeneAmp dengan reagen yang telah tersedia dalam bentuk *kit* Qiagen lalu dilakukan pemeriksaan sekuensing dengan metoda Sanger. Elektroforgram hasil sekuensing kemudian dianalisis untuk mengetahui status mutasi dengan menggunakan *software Bioedit* dan *Mutation Taster*.

Data yang diperoleh pada penelitian ini dicatat dalam formulir khusus dan hasil penelitian disajikan secara deskriptif dalam bentuk 3 buah tabel.

HASIL

Pada penelitian ini, pada 40 sampel yang diperiksa diperoleh data karakteristik seperti yang dijelaskan pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 2, dari 40 sampel terdapat 13 sampel yang berhasil disekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa pada ekson 2 terdapat 3 *wild type* (WT), pada ekson 3 terdapat 4 mutasi dan 9 WT, pada ekson 4 terdapat 4 WT. Sampel dengan hasil negatif menunjukkan bahwa sampel tidak dapat disekuensing.

Berdasarkan Tabel 3, terdapat 3 sampel yang mengalami mutasi pada ekson 3. Satu sampel mengalami mutasi ganda sehingga secara keseluruhan terdapat 4 mutasi pada ekson 3.

Tabel 1 : Karakteristik subyek penelitian

Variabel	Jumlah (%)
Usia	
≤50 tahun	5 (12,5)
>50 tahun	35 (87,5)
Jenis Kelamin	
Laki-laki	35 (87,5)
Perempuan	5 (12,5)
Tipe histopatologik Karsinoma urotelial infiltratif :	
pT1	1 (2,5)
pT2	6 (15)
pT3	8 (20)
pT4	6 (15)
Neoplasma urotelial Non Invasif :	
PUNLMP	7 (17,5)
Derajat Rendah	11 (27,5)
Derajat Tinggi	1 (2,5)

Tabel 2 : Hasil Sekuensing H-RAS.

Sampel	Ekson 2	Ekson 3	Ekson 4	Histopatologi
007	WT	Mutan	WT	Infiltratif pT3
097	WT	WT	WT	Infiltratif pT3
997	WT	WT	WT	Non invasif der. rendah
678	-	-	WT	Non invasif der. rendah PUNLMP
243	-	Mutan	-	PUNLMP
824	-	Mutan ganda	-	PUNLMP
458	-	WT	-	Infiltratif pT4
178	-	WT	-	linfiltratif pT3
045	-	WT	-	Non invasif der. rendah
305	-	WT	-	Non invasif der. rendah PUNLMP
146	-	WT	-	Non invasif der. rendah
375	-	WT	-	Non invasif der. rendah
225	-	WT	-	Non invasif der. rendah

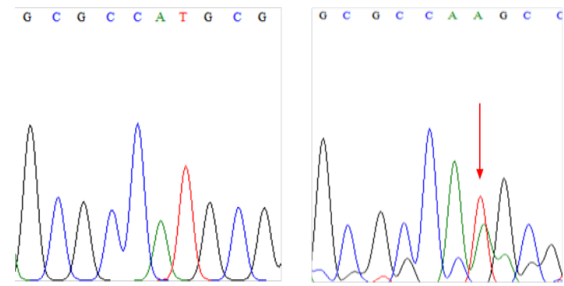
Ket : WT : *Wild Type*

Tiga mutasi terjadi pada PUNLMP berupa substitusi nukleotida T>A sehingga terjadi perubahan protein metonin menjadi lysin. Satu mutasi lainnya terjadi pada IUC pT3 berupa substitusi nukleotida A>C sehingga terjadi perubahan protein serin menjadi arginin.

Hasil sekuensing berupa elektroforogram (Gambar 1). Tanda anak panah merah menunjukkan bahwa mutasi pada ekson 3 berupa substitusi T>A yang ditandai dengan adanya gelombang yang bertumpuk pada satu titik urutan nukleotida sehingga terjadi perubahan metionin menjadi lysin.

Tabel 3 : Mutasi H-RAS Ekson 3.

Sam-pel	Perubahan nukleotida	Perubahan protein	Varian mutasi	Histopatologi
007	c.200T>A	p.Met67Lys	Missense	IUC pT3
824	c.200T>A	p.Met67Lys	Missense	PUNLMP
	c.193A>C	p.Ser56Arg	Missense	PUNLMP
243	c.200T>A	p.Met67Lys	Missense	PUNLMP



Gambar 1. Mutasi c.200T>A/p.Met67>Lys

DISKUSI

Pada penelitian ini, terdapat 52,5% karsinoma urotelial infiltratif dan 47,5% karsinoma urotelial papiler non invasif, dengan insidensi terbanyak adalah pT3 yang ditandai dengan adanya sel-sel tumor yang menginvasi sampai ke jaringan lemak sekitar buli. Karsinoma urotelial infiltratif pT1 ditandai dengan adanya sel-sel tumor pada lamina propia, pT2 apabila sel-sel tumor telah menginvasi sampai ke tunika muskularis propia dan pT4 apabila sel-sel tumor telah menginvasi sampai ke organ lain di sekitar buli. Karsinoma urotelial papiler non invasif apabila sel-sel tumor belum menginvasi lamina propia dan lapisan-lapisan di bawahnya. Derajat histopatologi karsinoma non invasif ditandai dengan perbedaan morfologi sel-sel tumor.

Pada penelitian ini, tidak ditemukan mutasi H-RAS pada ekson 2 dan 4 (*wild type*), sedangkan pada ekson 3 didapatkan 4 mutasi H-RAS. Satu dari 4 mutasi H-RAS terjadi karsinoma urotelial infiltratif pT3 dan sisanya terjadi pada PUNLMP, sesuai dengan penelitian lain yang menjelaskan bahwa mutasi H-RAS lebih banyak terjadi pada PUNLMP (lebih dari 90%). Pada karsinoma urotelial infiltratif mutasi H-RAS lebih jarang terjadi (kurang dari 20%). Lebih dari 50% karsinoma urotelial infiltratif berhubungan dengan mutasi p53 dan pRb.^{10,11}

Mutasi H-RAS ekson 3 berupa substitusi c.200T>A dengan perubahan protein p.Met67>Lys dan sustitusi c.193A>C dengan perubahan protein p.Ser65Arg.

RAS merupakan salah satu jenis gen yang pertama kali diidentifikasi yang memiliki peranan penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel. Protoonkogen RAS mengkode protein homolog yang berperan dalam sinyal transduksi jalur RAS/RAF/MEK/ERK, berfungsi sebagai regulator pertumbuhan dan pertahanan sel. Gen-gen ini mengontrol transmisi sinyal ekstraselular melalui reseptor membran tirosin kinase dan *epidermal growth factor*

receptor (EGFR). H-RAS merupakan onkogen yang pertama kali ditemukan serta pertama kali diisolasi dari karsinoma urotelial.^{7,10,11}

Mutasi H-RAS terjadi pada 40-90% karsinoma urotelial. Mutasi H-RAS terutama berhubungan dengan karsinoma urotelial derajat rendah dan jarang terlibat dengan stadium yang agresif. Namun dalam beberapa penelitian, mutasi pada H-RAS berhubungan dengan karsinoma urotelial dengan derajat yang tinggi dan tingkat agresifitas.¹²⁻¹⁷

Pada keadaan normal, protein-protein ini (p21 RAS) berada dalam keadaan seimbang antara fase aktif dan nonaktif. Pada keadaan nonaktif p21 RAS berupa guanodin diposfat (GDP) sampai mereka menerima stimulus dari *protein upstream* lain pada jalur transduksinya.

Stimulus ini akan mengakibatkan perubahan dari GDP menjadi GTP yang diikuti dengan perubahan p21 RAS menjadi ras aktif. Protein yang aktif akan mempengaruhi transduksi sinyal tirosin kinase seperti *raf*, *mitogen activated protein kinase (MAPK)* menjadi aktif, kemudian akan menyebabkan GTP mengalami hidrolisis dan kembali lagi menjadi GDP yang inaktif.¹²⁻¹⁷

H-RAS terlibat dalam regulasi pembelahan sel akibat rangsangan faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan berikatan dengan reseptor permukaan sel, setelah diaktifkan terjadi peristiwa transduksi sinyal dalam sitoplasma yaitu suatu proses dimana protein menyampaikan sinyal dari luar sel ke inti sel dan memerintahkan sel untuk tumbuh atau membelah. Protein H-RAS GTPase merupakan pencetus di banyak jalur transduksi sinyal dan biasanya berhubungan dengan membran sel. H-RAS bertindak sebagai molekul *on/off*, setelah dihidupkan akan mengaktifkan protein yang diperlukan untuk sinyal reseptor, seperti c-Raf dan PI3-kinase. H-RAS mengikat GTP yang aktif dan memiliki aktivitas enzimatik intrinsik yang membelah fosfat terminal nukleotida ini mengubahnya menjadi GDP. Setelah konversi GTP terhadap GDP, H-RAS dimatikan. Selanjutnya, untuk dapat aktif H-RAS harus kembali mengikat GTP.¹¹⁻¹⁸

Protoonkogen H-RAS ketika bermutasi memiliki potensi untuk menyebabkan sel-sel normal menjadi kanker. Beberapa mutasi gen yang diperoleh selama hidup seseorang dan hadir hanya dalam sel-sel tertentu disebut mutasi somatik dan tidak diwariskan. Mutasi somatik pada gen H-RAS dalam sel kandung kemih telah dikaitkan dengan karsinoma buli. Satu mutasi tertentu telah diidentifikasi dalam

persentase yang signifikan dari karsinoma buli, mutasi ini menggantikan satu blok bangunan protein (asam amino) dengan asam amino lain dalam protein H-RAS. Secara khusus, mutasi H-RAS paling sering terjadi pada ekson 2 kodon 12 berupa substitusi asam amino glisin dengan valin pada posisi 12 (ditulis sebagai Gly12Val atau G12V). Protein yang terlalu aktif ini mengarahkan sel untuk tumbuh dan membelah yang menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkendali dan membentuk tumor. Mutasi pada gen H-RAS juga telah dikaitkan dengan perkembangan karsinoma buli dan peningkatan risiko kekambuhan tumor setelah pengobatan.^{11,19}

Perubahan genetik H-RAS pada karsinoma urotelial terutama pada karsinoma urotelial derajat rendah. Mutasi H-RAS akan mengkonversi H-RAS menjadi onkogen. Mutasi RAS menyebabkan hilangnya kemampuan untuk mengikat GTPase sehingga menjaga H-RAS terus dalam bentuk RAS guanodin trifosfat (RAS-GTP) yang aktif.¹⁷

Mutasi H-RAS selanjutnya akan mengaktifkan siklin yang akan mengawali terjadinya siklus sel. Sel-sel mutan akan memasuki siklus sel dan lolos dari fase *check point* sehingga akan terjadi proliferasi secara terus menerus dan kemudian menyebabkan gagalnya aktivitas inhibitor siklin, menurunnya aktivitas p53, pRB serta faktor inhibisi lain, bahkan dapat menyebabkan faktor inhibisi tersebut menjadi tidak aktif. Gagalnya aktivitas inhibitor siklin dan tumor supresor akan menyebabkan siklus sel terjadi terus menerus dan sel mutan akan terus berproliferasi dan berkembang menjadi tumor dengan derajat yang lebih tinggi.^{14,16}

Bersama FGFR3, PIK3CA, mutasi pada gen RAS merupakan mutasi yang paling sering ditemukan pada karsinoma buli dan lebih dari 90% karsinoma buli mengalami mutasi H-RAS. Namun data mengenai ketiga mutasi onkogenik ini masih sangat terbatas.¹⁶

KESIMPULAN

Mutasi H-RAS ekson 3 lebih banyak terjadi pada PUNLMP.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Ann Rev Pathol.* 2009; 4: 251-85.
2. Beltran AL, Cheng L, Mazzucchelli R, Bianconi M, Blanca A, Scarpelli M, *et al.* Morphological and molecular profiles and

- pathways in bladder neoplasms. *Anticancer Res.* 2008; 28: 2893-900.
3. Ehdaie B, Theodorescu D. Molecular markers in transitional cell carcinoma of the bladder: New insights into mechanisms and prognosis. *Indian J Urol.* 2008; 24: 61-7.
 4. Halachmi S, Madeb R, Kravtsov A, Moskovitz B, Halachmi N, Nativ O. Bladder cancer-genetic overview. *Med Sci Monit.* 2001; 7: 164-8.
 5. Van der Heijden MS, Van Rhijn BWG. The molecular background of urothelial cancer: Ready for action? *Eur Urol.* 2015; 67: 202-3.
 6. Alberto Fernández MaES. Ras in cancer and developmental diseases. *SAGE J.* 2011; 3: 344-58.
 7. B Przybojewska AJ, P Jalmuzna. H-RAS, K-RAS and N-RAS Gene activity in human bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet Elsevier Sci Inc.* 2000; 121: 73-7.
 8. Beukers W, Hercegovac A, Zwarthoff EC. H-RAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. *Eur J Human Genetics* 2014; 22: 837-9.
 9. Boulalas I, Zaravinos A, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. *J Urol.* 2009; 181: 2312-9.
 10. Burchill S, Neal D, Lunec J. Frequency of H-ras mutations in human bladder cancer detected by direct sequencing. *Br J Urol.* 1994; 73: 516-21.
 11. Navaz K PM, Taghi M. Mutations of RAS gene family in specimens of bladder cancer. *Urol J.* 2008; 5: 237-42.
 12. Pandith AA, Shah Z, Rasool R, Dil-Afroze1, Yousuf A. Activated H-ras gene mutations in transitional cell carcinoma of urinary bladder in a Kashmiri population. *Res Gate.* 2010; 96: 993-8.
 13. Rajasekharan SK, Raman T. Ras and Ras mutations in cancer. *Cent Eur J Biol.* 2013; 8: 609-24.
 14. Schulz WA. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer.* 2006; 119: 1513-8.
 15. Beukers W, Hercegovac A, Zwarthoff EC. H-RAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. *Eur J Human Genetics.* 2014; 22: 837-9.
 16. Zhengjun Kang, Yuhui Li YY, Guo Z. Research progress on bladder cancer molecular genetics. *J Cancer Res Ther.* 2015; 10: 89-94.
 17. Zhou H, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Huang WC, Mohammadi M. *et al.* Urothelial tumor initiation requires deregulation of multiple signaling pathways: Implications in target-based therapies. *Oxford J Carcinogen.* 2012; 33: 770-80.
 18. Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: Confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res.* 1993; 53: 133-9.
 19. McCormick F. Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42: 500-6.