

HIPERMETILASI PROMOTER GENA *BRCA1* PADA DNA PLASMA KANKER PAYUDARA DAN LESI JINAK PAYUDARA

HYPERMETHYLATION *BRCA1* PROMOTER IN PLASMA DNA OF BREAST CANCER AND BENIGN LESION

Ulfah Dian Indrayani¹, Dewajani Purnomosari², Irianiwati³

¹Bagian Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

²Bagian Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

³Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Hipermetilasi promotor gena supresor tumor merupakan perubahan epigenetik terbanyak pada kanker dan mungkin dapat menjadi alternatif biomarker untuk mendeteksi kanker. Hipermetilasi *BRCA1* spesifik untuk kanker payudara dan berkorelasi dengan stadium dini kanker payudara. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui perbedaan proporsi hipermetilasi promotor gena *BRCA1* pada DNA plasma pasien kanker payudara dan lesi jinak payudara. Tiga puluh tiga sampel DNA plasma dari pasien kanker payudara, lesi fibrokistik dan fibroadenoma mammae diperiksa status hipermetilasinya dengan Methylation-specific PCR (MSP). Isolasi DNA menggunakan metode Natrium Iodide. Masing-masing kelompok terdiri atas 11 sampel. Uji Fisher digunakan untuk analisis statistik. Proporsi hipermetilasi pada kelompok kanker payudara, fibroadenoma mammae, dan lesi fibrokistik untuk *BRCA1* masing-masing sebesar 55%, 91%, dan 100%. Proporsi hipermetilasi promotor *BRCA1* tidak berbeda bermakna antara kanker payudara dan lesi jinak payudara.

Kata kunci: hipermetilasi promotor, *BRCA1*, DNA plasma, kanker payudara, lesi jinak, individu sehat

ABSTRACT

Hypermethylation of tumor suppressor genes promoter are frequently observed in cancer and have possibility as alternative biomarker for cancer detection. BRCA1 hypermethylation is specific for breast cancer and correlated with early stage of breast cancer. The aim of this research is to evaluate the difference hypermethylation proportion of BRCA1 promoter in plasma DNA of breast cancer and benign lesion. Thirty three DNA plasma from breast cancer, fibrocystic lesion and fibroadenoma mammae were subjected to sodium bisulfite treated DNA followed by MSP. DNA Isolation was used Natrium Iodide method. Each group consists of 11 samples. Fisher test was used for statistical analysis. Hypermethylation proportion of BRCA1 promoter of breast cancer, fibroadenoma mammae and fibrocystic lesion groups were 55%, 91%, 100%. Hypermethylation proportion of BRCA1 promoter were no significant different among groups.

Keywords *hypermethylation of BRCA1 gene promoter, plasma DNA, breast cancer, fibrocystic lesion, fibroadenoma mammae group.*

PENDAHULUAN

Kanker payudara masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia karena insidensi dan mortalitasnya paling tinggi (Globocan, 2008). Perkembangan biologi molekuler saat ini membuka peluang penggunaan biomarker untuk menilai risiko kanker, deteksi dini dan pemantauan prognosis kanker payudara secara individual. Hipermetilasi promotor gena supresor tumor merupakan perubahan epigenetik

terbanyak pada kanker dan mungkin dapat menjadi biomarker kanker (Srinivas *et al.*, 2001).

Metilasi adalah proses penambahan gugus metil pada sitosin di CpG dinukleotid. Metilasi pada promotor gena supresor tumor disebut hipermetilasi. Salah satu metode untuk mendeteksi hipermetilasi secara kualitatif adalah *methylation-specific PCR* (MSP) (Herman and Graff, 1996) dengan sumber *deoxyribosa nucleic acid* (DNA) (Laird, 2003; Lactionoy *et al.*, 2004); dapat berasal dari plasma. DNA dalam plasma berasal dari sel tumor yang mengalami apoptosis dan nekrosis Jahr *et al.*, 2001).

Pemeriksaan hipermetilasi menggunakan DNA plasma merupakan pemeriksaan yang kurang invasif, sehingga cocok digunakan untuk pemeriksaan rutin. Hipermetilasi pada plasma berpeluang menjadi biomarker penilaian risiko dan deteksi dini kanker payudara karena a) adanya hipermetilasi pada epitel yang tampak normal sudah terdeteksi beberapa tahun sebelum terdiagnosis kanker (Shi *et al.*, 2007; Herman and Baylin, 2003), b) pola hipermetilasi berbeda pada setiap jenis kanker (Esteller, 2008), c) status metilasi pada plasma sama dengan status metilasi pada jaringan (Dulaimi, 2004) dan d) pada individu sehat tidak didapatkan hipermetilasi (Skvortsova *et al.*, 2006).

Hipermetilasi *BRCA1* didapatkan sejak awal tumorigenesis (Duffy *et al.*, 2009; Widschwendter and Jones, 2002), secara spesifik didapatkan pada kanker payudara dan ovarium (Esteller, 2005). Berdasarkan hasil penelitian Purnomosari *et al.* (2006) pada DNA jaringan kanker payudara pasien di RS Dr. Sardjito didapatkan frekuensi hipermetilasi *RASSF1A*, *RAR 2*, dan *BRCA1* masing-masing sebesar 89% , 33 % dan 17%, serta adanya korelasi signifikan antara hipermetilasi *BRCA1* dengan tumor stadium awal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proporsi hipermetilasi promotor *BRCA1* pada DNA plasma pasien kanker payudara dan lesi jinak payudara.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian analitik yang membandingkan proporsi hipermetilasi promotor gena *BRCA1* pada DNA plasma pasien kanker payudara dan lesi jinak payudara. Lesi jinak payudara pada penelitian ini adalah fibroadenoma mammae dan lesi fibrokistik. Sampel penelitian berjumlah 33, tiap kelompok terdiri atas 11 sampel. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Dilakukan beberapa kali penggantian metode isolasi DNA karena hasil MSP yang didapatkan banyak yang tidak terdeteksi pada *band methylated* maupun *unmethylated*. Penggantian metode ini meliputi penggantian kit dan jumlah plasma yang digunakan. Dari metode-metode tersebut, hasil isolasi DNA plasma menggunakan 500µl plasma dengan metode Natrium iodide (NaI) (Fong *et al.*, 2009) memiliki konsentrasi lebih tinggi dibandingkan metode yang lain dan hasil MSP dari DNA dengan metode isolasi NaI menunjukkan proporsi status tidak terdeteksi lebih sedikit jika dibandingkan 2 metode yang lain. Karena itu, penelitian ini selanjutnya menggunakan metode NaI.

Modifikasi bisulfit dilakukan untuk mengkonversi sitosin yang tidak termetilasi menjadi urasil dan sitosin yang termetilasi tetap menjadi sitosin, menggunakan *methyl-easy* dengan prosedur sesuai kit dan dilanjutkan PCR. Primer *BRCA1* (Invitrogen) tampak pada tabel 1. PCR menggunakan suhu denaturasi 95⁰C, *annealing* 62⁰C, dengan 38 siklus amplifikasi. Elektroforesis dilakukan dengan gel agarose 2%. Kontrol positif metilasi (*methylated*) adalah DNA jaringan dengan metilasi positif atau DNA yang dibuat menjadi hipermetilasi dengan *SssI methyltransferase*. Kontrol positif tidak termetilasi (*unmethylated*) adalah DNA jaringan dengan metilasi negatif untuk masing-masing gena. Air digunakan sebagai kontrol negatif. Analisis perbedaan proporsi hipermetilasi *BRCA1* antar kelompok dilakukan uji Fisher dengan interval kepercayaan 95%.

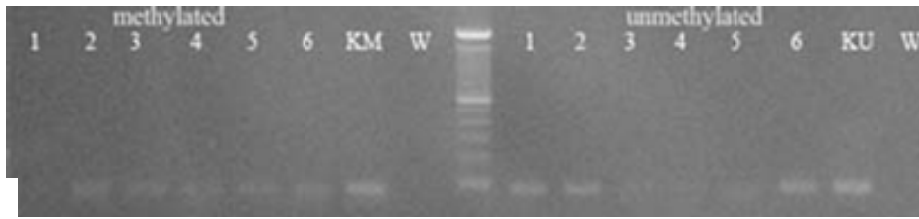
Tabel 1. Primer *BRCA1*

Gena		Sequen (5' - 3')	Size
<i>BRCA1</i>	MF	TCGTGGTAACGGAAAAGCGC	75 bp
	MR	AAATCTCAACGAACTCACGCC	
	UF	TTGGTTTTTGTGGTAATGGAAAAGTGT	86 bp
UR	CAAAAAATCTCAACAAACTCACACCA		

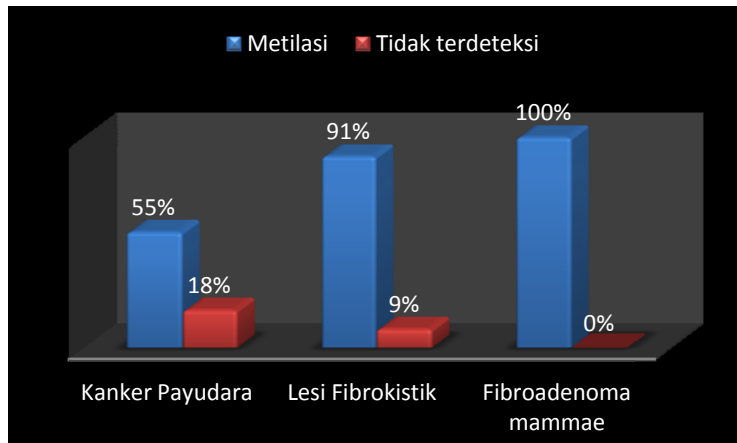
HASIL DAN PEMBAHASAN

Median hasil isolasi DNA plasma memiliki konsentrasi 34,25 µl dengan nilai maksimum 328 µl, minimal 23,5 µl dan merupakan DNA yang terfragmentasi. Hasil MSP DNA dari isolasi dengan metode NaI masih ada yang tidak terdeteksi (tidak didapatkan baik pada band *methylated* maupun *unmethylated*). Hasil MSP dan proporsi hipermetilasi gena *BRCA1* pada tiap kelompok (n=11) tampak pada **Gambar 1** dan **2**.

Hipermetilasi promotor gena *BRCA1* didapatkan pada semua kelompok dengan proporsi yang berbeda tetapi secara statistic tidak bermakna ($p>0,05$).



Gambar 1. Hasil MSP *BRCA1*. No. 1-6: sampel ;KM: kontrol positif termetilasi (M) ;KU: kontrol positif tidak termetilasi (U) ; W: kontrol negatif. Ladder 100 bp.



Gambar 2. Proporsi hipermetilasi *BRCA1* pada kanker payudara, lesi fibrokistik, dan fibroadenoma mammae

Konsentrasi yang didapatkan dari isolasi DNA plasma pada penelitian sangat bervariasi dengan nilai median 34,25 μ l dan merupakan DNA yang terfragmentasi sehingga kemungkinan menyebabkan tidak terdeteksinya hasil PCR pada beberapa sampel. Hipermetilasi promotor gena *BRCA1* didapatkan pada semua kelompok dengan proporsi yang berbeda tetapi secara statistik tidak ada perbedaan bermakna. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang mendapatkan tidak adanya perbedaan status metilasi *BRCA1* pada DNA dari *fine needle aspiration* antara kanker payudara dan fibroadenoma mammae (Jeronimo *et al.*, 2003). Hal ini mungkin disebabkan oleh karena *BRCA1* juga berperan pada inhibisi proliferasi melalui interaksi dengan pRb (Deng, 2006). *BRCA1* berinteraksi dengan pRb untuk mencegah fosforilasi pRb. Protein pRb yang tidak terfosforilasi mengikat E2F, suatu faktor transkripsi untuk protein *cyclin E*, sehingga ikatan *BRCA1* pada pRb mencegah transkripsi *cyclin E*.

Protein *cyclin E* merupakan protein yang diperlukan untuk masuk ke fase S. Dengan demikian ikatan BRCA1 pada pRb mencegah fosforilasi pRb dan pada akhirnya sel tetap dalam fase G1 (Deng, 2006). Hipermetilasi *BRCA1* memungkinkan sel untuk terus berproliferasi.

Penelitian pada demografi yang berbeda menunjukkan proporsi hipermetilasi gena supresor tumor pada lesi jinak payudara lebih sedikit daripada kanker payudara (Dulaimi, 2004; Lewis *et al.*, 2005). Hal ini diduga disebabkan karena hipermetilasi gena supresor tumor dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti paparan kronis karsinogenik dari lingkungan, penuaan, penyakit lain, makanan maupun gaya hidup (Shi *et al.*, 2007). Berdasarkan hal-hal tersebut maka hipermetilasi *BRCA1* pada DNA plasma secara kualitatif saja tidak dapat digunakan sebagai biomarker untuk membedakan lesi ganas atau lesi jinak payudara, sehingga tidak dapat digunakan untuk deteksi risiko kanker payudara.

KESIMPULAN

Tidak didapatkan perbedaan bermakna proporsi hipermetilasi *BRCA1* DNA plasma yang diperiksa secara kualitatif antara kanker payudara dan lesi jinak payudara.

DAFTAR PUSTAKA

- Deng C, BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution, *Nucleic Acids Res*, 2006,34(5):1416-26.
- Duffy MJ, Napieralski R, Martens JWM, Span PN, Spyrtos F, Sweep FCGJ, Brunner N, Foekens JA, Schmitt M, Methylated genes as new cancer biomarker, *Eur J cancer*, 2009, 45:335-46.
- Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P, Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients, *Clin Cancer Res*, 2004,10:6189-93.
- Esteller M, Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 629-56.
- Esteller M, Epigenetics in cancer, *N Engl J Med*, 2008,358:1148-59.
- Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y, Screening for breast cancer', *Clin Chem*, 2009,55(3):587-98.
- Globocan, 2008, Cancer Incidence and mortality worldwide in 2008 <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#WOMEN>
- Herman JG, Baylin SB, Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, *N Engl J Med*, 2003,349:2042-54.
- Herman JG, Graff JR, Myohannan S, Nelkin BD, Baylin SB, Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc Natl Acad Sci*, 1996,93:9821-6.

- Jahr S, Hentz H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R, DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, *Cancer Res*, 2001,61:1659-65.
- Jeronimo C, Costa I, Martins MC, Monteiro P, Lisboa S, Palmeira C, Henrique R, Teixeira MR, Lopes C, Detection of gene hypermethylation in fine needle washings from breast lesions, *Clin Cancer Res*, 2003,9:3413-17.
- Laird PW, The power and promise of DNA methylation markers, *Nat Rev Cancer*, 2003,3:253-66.
- Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients, *Ann NY Acad Sci*, 2004,1022:221-7.
- Lewis CM, Cler LR, Bu D, Zochbauer-Muller S, Milchgrub S, Naftalis EZ, Leitch, AM, Minna JD, Euhus DM, Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk, *Clin Cancer Res*, 2005, 11:166-72.
- Purnomosari D, Irianiwati, Sadiyanto D, Krisnawati D, Wiraaghni I, Setiaji K 2006, CpG methylation of six tumor suppressor genes in breast carcinoma, unpublished.
- Shi H, Wang MX, Caldwell CW, CpG island: their potential as biomarkers for cancer, *Expert Rev. Mol. Diagn*, 2007,7(5):519-531.
- Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova DE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP, Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumors: DNA quantification and analysis of tumor-related gene methylation, *Br J Cancer*, 2006, 94: 1492-5.
- Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S, Trends in biomarker research for cancer detection, *Lancet Oncol*, 2001,2:698-704.
- Widschwendter M, Jones PA, DNA methylation and breast carcinogenesis, *Oncogene*, 2002, 21:5462-82.