

Metilasi DNA dan Peranannya Pada Kanker Payudara Sporadik

Wirnsma Arif Harahap

Pendahuluan

Karsinoma payudara (selanjutnya disingkat KPD) saat ini merupakan jenis kanker yang paling sering terjadi pada wanita dan merupakan peringkat kedua kanker yang paling sering terjadi pada manusia (10,9 % dari seluruh kanker) (Globocan, 2008). Menurut laporan WHO (2008), diperkirakan diseluruh dunia terdapat kasus KPD baru sebesar 1,38 juta kasus dan merupakan 23,8% dari seluruh jenis kanker yang terjadi pada wanita. Di Amerika Serikat, insiden KPD didapatkan 130 per 100.000, Inggris 126 per 100.000 dan pada negara Asia didapatkan angka yang lebih rendah seperti Jepang 30-40 / 100.000, India 17 /100.000 (Globocan,2008). Di Indonesia, setiap tahun terdapat 39.831 kasus baru KPD. Laporan dari Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) pada tahun 2007 menunjukkan angka kejadian 26 kasus per 100.000 wanita. Pada tahun 2009 menunjukkan bahwa KPD merupakan penyebab terbanyak kematian akibat penyakit kanker pada wanita yang dirawat di rumah sakit (Depkes RI, 2010).

Perubahan pada tingkat biologi molekular / gen pada KPD sangat kompleks karena banyak faktor yang berperanan. Perubahan gen yang terjadi dan mendasari timbulnya KPD dapat digolongkan menjadi 3 kelompok gen yaitu *oncogene*, *DNA repair gene* dan *tumor suppressor gene (TSG)*. Salah satu TSG yang memiliki peranan penting dalam karsinogenesis KPD adalah *BRCA1 (Breast CAncer gene 1)*. Protein BRCA 1 memiliki peranan dalam mempertahankan stabilitas genome melalui fungsi selular seperti pada transkripsi gen, respon terhadap kerusakan DNA, regulasi siklus sel dan ubiquitinisasi. In-aktifasi gen BRCA 1 mengganggu stabilitas gen dan terutama sekali terjadi pada KPD dan kanker ovarium (Miki *et al.*, 1996; Bar Sade *et al.*,1998; Ashworth *et al.*, 2010).

KPD yang berhubungan dengan mutasi BRCA1 dapat berupa mutasi *germline* ataupun sporadik. Mutasi gen BRCA1 secara *germline* sering terjadi pada bangsa Askenazi dan Kaukasia. Pada kulit berwarna lebih sering mutasi gen terjadi secara sporadik. Mutasi BRCA1 secara sporadik ternyata menurunkan ekspresi protein BRCA 1 sebesar 34,3 % pada KPD sporadik. Penemuan ini menunjukkan bahwa fungsi BRCA1 yang berkurang berperan penting dalam timbulnya KPD sporadik. (Gerald *et al.*,1996 ; Ashworth *et al.*, 2010). Disamping akibat mutasi, penyebab lain tidak diekspresikannya protein BRCA1 yang terjadi secara sporadik adalah akibat proses epigenetik (Butcher *et al.*,2007).

Terdapat beberapa proses epigenetik yaitu metilasi DNA, modifikasi histon dan *chromosome rearrangement* serta peranan *Micro RNA* (Feigenberg *et al.*,2013). Metilasi DNA paling sering terjadi dan merupakan salah satu mekanisma kontrol epigenetik terhadap ekspresi gen yang herediter namun tidak merubah struktur dari susunan basa DNA dan bersifat spesifik untuk jaringan tertentu. Hipermetilasi memainkan peranan dalam *genomic imprinting* pada saat dimana salah satu dari alel gen parental harus dinonaktifkan dengan tujuan stabilisasi ekspresi salah satu alel. (Parrella *et al.*,2010).

Perubahan epigenetik dapat mempengaruhi ekspresi gen melalui penambahan satu gugus metil pada posisi karbon ke 5 dari sitosin pada dinukleotida CpG. Pada genom vetebrata, sekuen dinukleotida CpG telah berkurang sampai 20 % dari yang diduga sebelumnya akibat proses evolusi. Dari jumlah tersebut, lebih dari 70 %-nya telah mengalami metilasi. Penelitian pada manusia menunjukkan distribusi CpG pada gen manusia tidak bersifat random dan pada beberapa lokasi gen menunjukkan adanya kelompok CpG yang berlebihan yang dikenal

dengan *CpG island* yang terutama sekali berlokasi pada daerah promotor gen dan regio ekson 1 (Parella *et al.*,2010).

Pada sel normal, gen yang aktif dalam ekspresinya adalah gen yang tidak mengalami metilasi pada CpG, sebaliknya pada penyakit keganasan, terdapat hipermetilasi fokal pada daerah ujung 5'*CpG island* yang menyebabkan gen tersebut tidak dapat ditranskripsikan. Jadi perubahan profil metilasi DNA merupakan salah satu *hallmark* dari seluruh kanker pada manusia (Szyf *et al.*,2010). Metilasi DNA dimediasi oleh DNA methyltransferase (DNMTs) yang mengkatalis pemindahan grup metil dari S-adenosyl-methionin (SAM) ke sitosin pada dinucleotida CpG. Metilasi promotor gen sangat penting dalam mengatur ekspresi dan merupakan kunci faktor epigenetik dalam karsinogenesis. DNMTs terdapat 3 bentuk aktif yang sudah diidentifikasi yaitu DNMT1, DNMT3A dan DNMT3B. Mediasi metilasi oleh DNMTs ternyata juga bersifat spesifik pada masing masing organ seperti pada payudara contohnya, mediasi metilasi hanya dilakukan oleh DNMT3B (Szyf *et al.*, 2010).

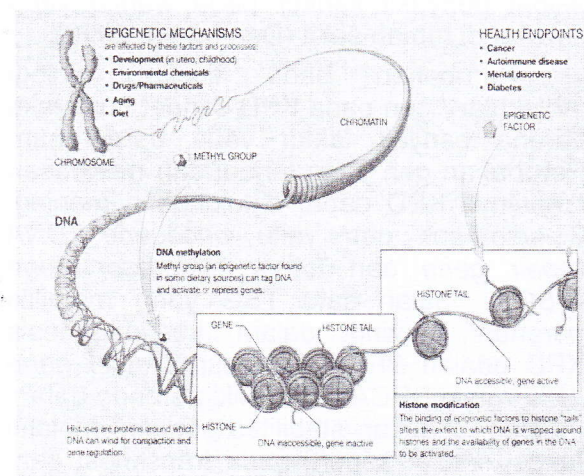
Epigenetik dan KPD

Proses epigenetik merupakan suatu proses dimana suatu ekspresi gen dapat dimodulasi tanpa gangguan pada sekuen nukleotida dari gen tersebut (Herman *et al.*, 2003). Regulasi epigenetik berperan penting pada pertumbuhan dan perkembangan dan memberikan suatu batasan kontrol transkripsi dari ekspresi gen. Stabilitas struktur DNA memerlukan replikasi DNA yang akurat dan gangguan pada hal ini dapat menimbulkan penyakit autoimun, gangguan genetik dan kanker. Komponen kunci regulasi transkripsi epigenetik meliputi manajemen yang akurat pada metilasi gen dan mempertahankan struktur kromatin (Bird *et al.*,2002).

Silencing gen atau inaktifasi TSG tidak hanya disebabkan oleh mutasi tapi juga disebabkan oleh inhibisi dan translokasi. Inaktifasi gen yang mengatur proliferasi sel dan kematian sel merupakan bagian yang kritis dari proses neoplastik. Salah satu proses yang penting adalah mekanisme yang menghambat transkripsi gen melalui hambatan pada gen promotor melalui mekanisme epigenetik. Aktifasi onkogen

dapat merupakan hasil dari perubahan epigenetik melalui proses modifikasi translasi dalam histon asetilasi ataupun konformasi DNA. Hasil dari proses ini adalah perubahan dari pola ekspresi gen yang memiliki implikasi dalam proliferasi seluler, kesintasan dan diferensiasi sel (Lo *et al.*,2008 ; Qinghua *et al.*,2009). Jadi, modifikasi epigenetik didefinisikan sebagai perubahan herediter pada ekspresi gen yang terjadi tanpa perubahan dalam sekuen DNA (Paili *et al.*,2007). Data yang berasal dari penelitian terakhir menguatkan hubungan antara neoplasia dan gangguan proses epigenetik. Kanker payudara sama dengan kanker yang lain, juga terjadi gangguan epigenetik, dimana proses epigenetik berperan dalam timbulnya karsinogenesis.

Epigenetik didefinisikan sebagai perubahan ekspresi gen tanpa perubahan dalam sekuen DNA. Dalam perubahan epigenetik ini melibatkan 3 mekanisme yaitu : proses metilasi DNA, modifikasi histon dan remodeling nukleosom. (Passarge *et al.*,2001.Paili *et al.*, 2007). Gangguan yang dapat terjadi pada metilasi DNA yaitu hipometilasi global dan hipermetilasi fokal. Hipometilasi global akan lebih sering ditemukan dengan peningkatan usia dan berhubungan dengan instabilitas genomik dan aktifasi ekspresi onkogen. Hipermetilasi fokal yang terjadi pada lokus yang spesifik akan menghambat transkripsi gen tumor supresor (Paili *et al.*, 2007).



Gambar 2.4 Proses epigenetik yang menjelaskan mekanisme, dampak dan proses metilasi DNA serta modifikasi Histon (Robetson *et al.*,2005)

Metilasi DNA

Metilasi DNA menunjukkan pentingnya peranan epigenetik pada manusia. Hal ini terutama terjadi pada residu 5' methylcytosine pada dinukleotida 5'-CpG-3'. Lokasi CpG ini letaknya selalu berkelompok membentuk semacam pulau yang dikenal dengan *CpG island* yang mengandung sekitar 0,2 sampai beberapa kilobasa. *CpG island* secara signifikan ditemukan pada regio promotor dalam suatu gen. Sementara hampir semua CpG terdistribusi pada sepanjang genom dalam keadaan termetilasi, namun CpG island biasanya berada dalam keadaan tidak termetilasi pada jaringan normal dewasa. Non metilasi CpG island berkaitan dengan adanya ekspresi dari gen yang terdekat.

Pada metilasi DNA terjadi penambahan gugus metil dari cytosine pada posisi C5 pada dinucleotida CpG (Bird *et al.*, 2002. Montgomery *et al.*, 2004). Dinukleotida ini tidak terdistribusi pada seluruh genom, sebagian besar berkelompok yang dinamakan dengan *CpG island* dimana terentang pada daerah promotor dan sedikit pada exon pertama dari hampir sebagian besar dari gen house keeping dan gen supresor tumor (Esteler *et al.*, 2002). Sebagian besar dinukleotida CpG berlokasi pada *CpG island* pada jaringan normal tidak mengalami metilasi sementara yang berlokasi diluar *CpG island* biasanya berada dalam kondisi termetilasi (Montgomery *et al.*, 2004).

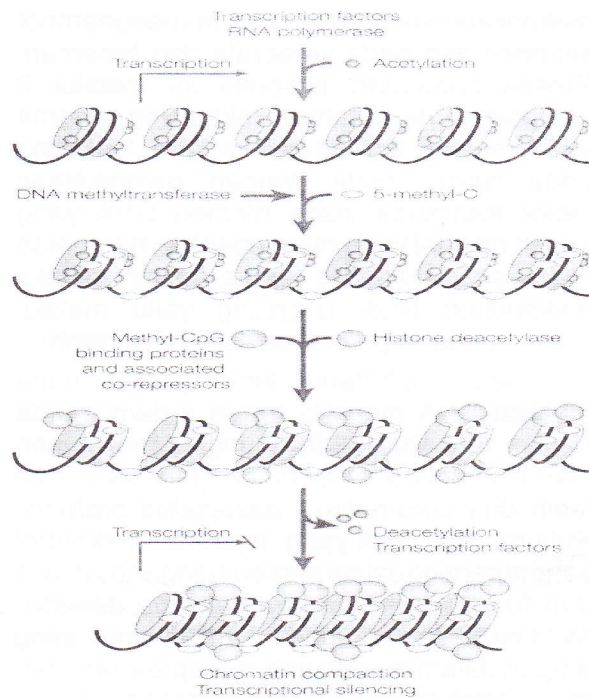
Lebih kurang 3-5 % residu cytosine pada *human genome* termetilasi. Tujuh puluh sampai delapan puluh persen dari 5-methylcytosine terletak pada daerah dinukleotida CpG yang dikenal dengan nama *CpG islands*, khususnya pada daerah promotor 5' dan ekson pertama gen. Modifikasi metilasi ini sangat penting tidak hanya untuk perkembangan mamalia namun juga bagi regulasi epigenetik ekspresi gen termasuk pencetakan gen dan inaktivasi kromosom X (Adams *et al.*, 2003)

Metilasi DNA akan menghambat terjadinya transkripsi secara langsung dengan menghambat proses pengikatan faktor transkripsi spesifik dan secara tidak langsung melibatkan *methyl-CpG binding proteins* dan hubungannya dengan penekanan pada aktifitas *remodelling* kromatin (Robetson *et al.*, 2005). Metilasi DNA merupakan

mekanisme yang efektif dalam menghambat ekspresi gen pada vertebrata dan tanaman. Proses hambatan ekspresi ini melalui 2 mekanisme yang utama. Mekanisme pertama yaitu melalui interferensi secara langsung pada residu metil dengan mengikatkan faktor transkripsi pada elemen DNA yang sudah dikenal yang menyebabkan hambatan ekspresi. Mekanisme kedua adalah melalui mekanisme tidak langsung yaitu melalui proses meiosis pada metilasi DNA tertentu.

Sedikit diketahui tentang bagaimana metilasi DNA memiliki target tertentu pada bagian tertentu, hal ini mungkin melibatkan interaksi antara DNMTs dengan satu atau lebih dari *chromatin – associated proteins*. Pola metilasi DNA yang tepat dan terkontrol sangat penting dalam perkembangan mamalia dan fungsi organ pada organisme dewasa. Metilasi DNA merupakan mekanisme yang ampuh dalam menghambat ekspresi gen dan mempertahankan stabilitas genom dalam menghadapi jumlah pengulangan DNA yang banyak dan dapat menimbulkan kesalahan dalam rekombinan dan menyebabkan deregulasi transkripsi gen yang berdekatan. Sel punca pada embrio yang mengalami defisiensi DNMTs tidak bertahan hidup lama. Hal ini menunjukkan bahwa gangguan pada metilasi DNA normal akan menyebabkan kegagalan pertumbuhan.

Metilasi pada residu cytosine memainkan peranan penting dalam regulasi gen. Metilasi DNA diperlukan dalam perkembangan pada fase embrio normal. Adanya metilasi DNA yang normal diperlukan dalam proses *genomic imprinting*, inaktivasi kromosom X, modifikasi kromatin dan *silencing* retrovirus endogen. Modifikasi epigenetik DNA pada mamalia adalah metilasi cytosine pada posisi C5 pada dinucleotida CpG. Kontras dengan mekanisme epigenetik lainnya yaitu modifikasi post translasi histon yang memperlihatkan kompleksitas dan keragaman yang tinggi. Proses metilasi DNA lebih simpel dimana pada mamalia terdiri dari 2 komponen yaitu pertama adalah grup DNA metiltransferase yang berfungsi dalam mempertahankan pola metilasi DNA dan kedua adalah MBDs (*methyl-CpG binding proteins*) yang berperan dalam membaca tanda metilasi pada DNA (Passarge *et al.*, 2001).



Gambar 2.7. Mekanisme metilasi DNA

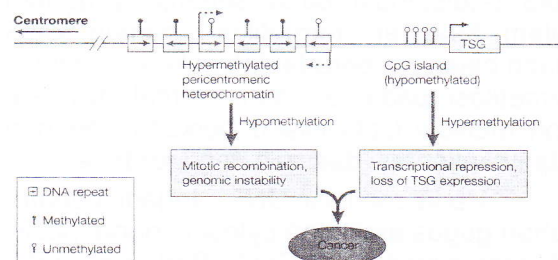
Keterangan gambar : Mekanisme dimana kerjasama antara metilasi DNA dan deasetilasi histon dapat menekan terjadinya transkripsi suatu gen (Robetson *et al.*, 2000)

Hipometilasi global ini juga terlihat dalam hubungannya dengan hipermetilasi regional pada *CpG islands*, dalam hubungannya dengan inaktivasi transkripsi dari peningkatan jumlah gen yang berhubungan dengan kanker. Varias gen gen ini, termasuk TSG, *DNA mismatch repair genes* dan *cell cycle related genes* atau molekul adesi dilaporkan diatur oleh metilasi promoter CpG. Inaktivasi ekspresi gen oleh hipermetilasi *CpG island* didukung dari penelien pemakaian obat demetilasi, 5-azacytidine (5aza) dan 5-aza-2'-deoxycytidine (deoxyC). Pemakaian kedua obat ini pada beberapa *cancer cell line*, memperlihatkan terjadinya demetilasi *CpG island* dan reaktifasi ekspresi gen – gen yang sebelumnya dihambat. Sebagai tambahan, penelitian terakhir menunjukkan bahwa pada hipermetilasi *CpG island* tidak hanya menyebabkan *silencing* gen yang diaturnya, namun juga memfasilitasi gangguan genetik yang mempengaruhi progresi tumor.

Hipermetilasi dan Karsinogenesis.

Hubungan antara metilasi DNA dan

kanker pertama kali ditemukan pada tahun 1983 ketika ditemukan genom sel kanker mengalami hipometilasi jika dibandingkan dengan genom sel normal. Sel sel kanker yang mengalami hipometilasi terutama disebabkan oleh hilangnya metilasi dari bagian genom yang berulang dan menyebabkan instabilitas genom yang merupakan tanda utama (*hallmark*) dari sel kanker (Robetson *et al.*, 2000, 2005. Palii *et al.*, 2007).



Gambar 2.8 Metilasi dan karsinogenesis

Keterangan gambar : Diagram menunjukkan peranan hipermetilasi dan hipometilasi pada karsinogenesis (Robetson, 2005).

Sel kanker memiliki karakteristik berupa ketidak seimbangan metilasi dimana terjadi hipometilasi pada sebagian besar genom dan hipermetilasi pada daerah *CpG island* dan meningkatnya ekspresi dari enzim DNA methyltransferase. Hipermetilasi DNA juga berhubungan dengan *silencing* transkripsi, yang secara potensial dapat merupakan *hit* pertama ataupun kedua dan selanjutnya berhubungan dengan inaktivasi gen tumor supresor (Baylin *et al.*, 2000. Knudson, 2001).

Saat ini sudah terbukti bahwa kejadian KPD merupakan akumulasi gradual dari interaksi epigenetik dan perubahan genetik. Mutasi gen dapat bervariasi diantara pasien, namun perubahan epigenetik seperti metilasi merupakan kejadian yang global pada saat karsinogenesis. Selanjutnya, metilasi berperan dalam perkembangan tumor pada fase awal dan dapat digunakan sebagai deteksi dini keganasan (Suijkerbuijk *et al.*, 2008).

Hampir seluruh kanker terjadi dari gangguan genetik dan epigenetik yang multipel yang mengubah sel normal menjadi sel tumor yang memiliki kemampuan invasi dan metastasis. Proses ini termasuk terjadinya gangguan pola metilasi DNA dimulai

dengan hipometilasi global dan kemudian terjadi hipermetilasi yang terlokalisir yang kemudian mengganggu ekspresi *tumor suppressor gene* pada kanker payudara sporadik terutama pada promotor gen BRCA 1 yang dilaporkan terjadi sebanyak 20 % yang berhubungan dengan pengurangan transkripsi BRCA 1. (Butcher *et al.*, 2007)

Mekanisme yang jelas tentang bagaimana gangguan metilasi yang normal pada promotor dalam penghambatan transkripsi *tumor suppressor genes* dalam karsinogenesis masih belum jelas. Mengetahui reaksi molekular ini dimana kita dapat mengeksploitasi perubahan epigenetik dapat menjadi terapi terbaru dalam menstabilkan kembali metilasi DNA dan pola ekspresi gen. Metilasi DNA diatur oleh mekanisme yang kompleks yang melibatkan DNA *Methyltransferase (DNMTs)* dan *methyl binding domain proteins (MBDs)* (Butcher *et al.*, 2007). DNMT1, 3A dan 3B, sangat esensial dalam perkembangan normal dan fungsi sel somatik. Gangguan hal ini terlihat dari over ekspresi DNMTs yang terjadi pada kanker kolon, ginjal, pankreas dan payudara. Peningkatan mRNA DNMT3B pada kanker payudara yang mengalami polimorfisme pada DNMT3B dan selanjutnya dapat meningkatkan insiden kanker payudara.

Over ekspresi pada DNMT3B dan metilasi promotor BRCA1 terjadi pada kanker payudara. Butcher dan Rodenhiser (2007) menunjukkan bawa gangguan pada DNMT3B dan ekspresi CTCF memainkan peranan dalam metilasi yang tidak tepat pada promotor BRCA1. Sebagai konsekuensi hilangnya ekspresi BRCA1 menyebabkan disregulasi fungsi sel payudara dan ketidakstabilan kromosom dan progresi kanker payudara sporadik.

Hipermetilasi BRCA 1 pada KPD Sporadik

KPD merupakan manifestasi dari abnormalitas baik genetik maupun epigenetik (Russo *et al.*, 1998). Seperti yang diketahui bahwa gen BRCA1 mengkode protein multifungsi yang terlibat dalam *repair DNA*, kontrol siklus sel, ubiquitinilasi dan remodeling protein. Fungsi ini pada payudara dan ovarium hanya dijalankan oleh protein ini. Mutasi pada gen BRCA1 terjadi pada 45% dengan kasus kanker payudara familial dan terjadi hanya 1% pada kanker payudara

sporadik. Namun demikian hambatan pada ekspresi BRCA1 sangat sering terjadi pada kanker payudara dan berhubungan dengan progresi penyakit.

Hampir semua *housekeeping genes* dan 40% dari gen jaringan spesifik (*tissue specific genes*) mengandung *CpG island* pada daerah transkripsinya. Metilasi pada daerah *CpG island* ini secara epigenetik dapat menghambat transkripsi gen. Metilasi aberan pada gen tumor supresor seperti pada BRCA 1 ini memainkan peranan penting dalam proses karsinogenesis. Telah dilaporkan bahwa metilasi BRCA1 ini merupakan penyebab utama pada proses transkripsi gen dengan angka kejadian sekitar 13-40% pada kasus kanker payudara sporadik (Chen *et al.*, 2009).

Pada karier dengan mutasi BRCA1 terdapat inaktivasi somatik pada alel kedua yang normal, biasanya berupa LOH (*loss of heterozygosity*) yang berakibat hilangnya bentuk lengkap protein BRCA1 dan mRNA. Penelitian yang berkelanjutan membuktikan peranan BRCA1 dalam *double-strand DNA break repair* yang berhubungan dengan protein RAD 51 dan protein Fanconi's anemia. Gen BRCA1, terletak pada kromosom 17q21, mengkode protein multifungsi yang berperan dalam repair DNA, kontrol siklus sel (*cell cycle checkpoint*), ubiquitinasi protein dan remodeling protein (Ralhan *et al.*, 2007). Fungsi lainnya adalah sebagai sensor jika terjadi kerusakan DNA dan sebagai koordinator pada *cell cycle checkpoint*, *repair DNA* dan apoptosis sebagai respon terhadap kerusakan DNA. BRCA 1 juga memiliki fungsi sebagai faktor transkripsi yang terlibat dalam represi atau aktivasi reseptor hormonal yang diatur oleh gen (Llomas *et al.*, 2008).

Terdapat perbedaan respon terapi pada KPD dengan mutasi BRCA1 dengan KPD sporadik. Kultur sel KPD dengan defisit protein BRCA1 ternyata lebih sensitif terhadap radiasi dan cisplatin dan kurang sensitif terhadap obat lainnya. KPD yang terjadi pada karier BRCA1 memiliki kesamaan dengan KPD sporadik tipe basal yang memiliki fenotip khas berupa high grade ER, PR dan HER2 negatif, dan mutasi pada P53. Basal keratin diekspresikan baik pada KPD dengan mutasi BRCA1 maupun pada KPD sporadik tipe basal (Bianco *et al.*, 2000).

Walaupun mutasi BRCA1 jarang

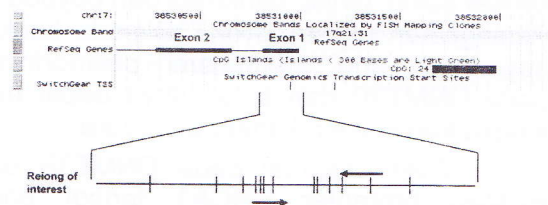
didapatkan pada KPD sporadik, namun transkripsi BRCA1 berkurang pada KPD sporadik menunjukkan peranan hal ini dalam karsinogenesis KPD sporadik. Ekspresi protein BRCA1 berkurang pada 21-60% KPD sporadik. Penjelasan yang paling mungkin pada penurunan ekspresi BRCA1 adalah terjadinya metilasi pada daerah promotor BRCA1 pada 10-30% KPD sporadik. Metilasi yang terjadi ini berkorelasi juga dengan penurunan mRNA BRCA1. Pada penelitian ini memfokuskan hubungan antara ekspresi protein BRCA1 yang diperiksa secara imunohistokimia dan inaktivasi promotor BRCA 1 secara epigenetik dan hubungannya dengan tampilan fenotip serta faktor prognostik pada KPD sporadik (Martos *et al.*,2005)

Hipermetilasi promotor BRCA1- *CpG island*, berkaitan dengan hipometilasi global yang terjadi pada sel kanker (Baylin *et al.*, 2000). Gen ini bertanggung jawab dalam terjadinya KPD familial. Sekitar 5-50% KPD familial diturunkan melalui mutasi gen BRCA 1 pada populasi yang berbeda (Hopper *et al.*,2001). Mutasi somatik gen BRCA1 sangat jarang walaupun tingginya tingkat *loss of heterozygosity* pada lokus ini. Karena itu, terdapat mekanisme lain hilangnya fungsi gen ini. Salah satu mekanisme yang paling mungkin hilangnya aktifitas gen ini adalah metilasi DNA. Deteksi adanya hipermetilasi pada promotor gen BRCA1 terdapat pada 9-44% dari jaringan KPD (Birgisdottir *et al.*,2006). Metilasi promotor BRCA1 terjadi hampir 20% dari pasien KPD sporadik. Metilasi ini juga menyebabkan ekspresi ER dan PR menjadi negatif, suatu keadaan yang sama pada KPD akibat mutasi herediter BRCA1. Selanjutnya hipermetilasi pada gen BRCA1 memiliki profil yang mirip dengan mutasi BRCA1 herediter (Snell *et al.*,2007).

Metilasi pada daerah promotor BRCA1 menunjukkan adanya hipermetilasi yang meluas pada *CpG island*. Hal ini juga membuat ekspresi ER dan PR menjadi negatif. Hipermetilasi ini juga membuat alel normal menjadi inaktif pada individu dengan mutasi herediter dimana tumor tidak menunjukkan *loss of heterozygosity* (Snell *et al.*,2007). Butcher dkk pada tahun 2007, memeriksa ekspresi BRCA pada 54 jaringan pasien KPD sporadik melalui metilasi pada promotor BRCA untuk melihat adanya inaktivasi BRCA 1 pada KPD

sporadik. Ekspresi BRCA 1 dilihat dengan pemeriksaan IHC pada jaringan KPD sedangkan pemeriksaan metilasinya dengan memakai teknik *methylation specific PCR* ternyata 87,5 % ekspresi BRCA1 rendah. Dari tumor yang ekspresi rendah tersebut, ternyata 86% didapatkan hipermetilasi pada BRCA1 (Butcher *et al.*,2007)

Status BRCA1 memiliki potensi sebagai faktor prognostik karena KPD dengan mutasi atau hilangnya protein ini menunjukkan fenotip yang berdiferensiasi buruk, proliferasi tinggi, ER(-) dan PR(-) serta mutasi p53. Mutasi BRCA1 juga berhubungan dengan survival yang lebih pendek pada beberapa penelitian. Metabolisme 1 karbon yang terjadi pada proses metilasi DNA yang memberikan donor universal, S-adenosylmethionine (SAM). Folat, metionin dan kolin merupakan sumber grup metil pada makanan. Terdapat bukti bahwa diet yang mengandung donor metil dapat mempengaruhi bentuk metilasi baik pada hewan, maupun pada manusia (Xu *et al.*, 2009)



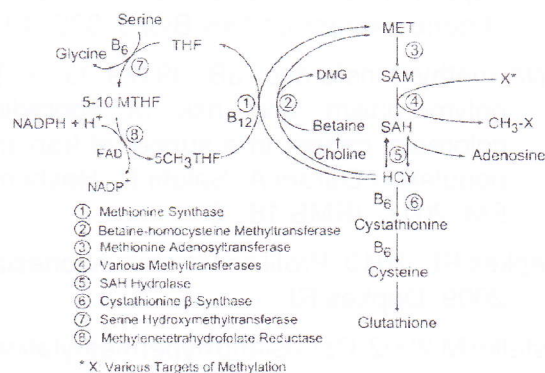
Gambar 2.11. Diagram gen BRCA1 dan lokasi promotor.

Skema ini menggambarkan daerah promotor gen BRCA1 yang digunakan untuk analisis metilasi. *Reverse strand* BRCA 1 juga terlihat. Warna biru menunjukkan exon RefSeq genes dan warna hijau menunjukkan prediksi CpG island pada daerah promotor. Daerah *transcription start* (TSS) juga terlihat. Pada pembesaran daerah yang diperiksa (exon 1 dan daerah sekitarnya) menunjukkan lokasi primer untuk *methylation specific PCR* dan daerah CpG (warna merah / *vertical bar*) (Xu *et al.*, 2009).

Peranan Diet dan Lingkungan Pada Proses Metilasi DNA

Banyak teori yang menjelaskan faktor yang menyebabkan metilasi DNA terutama jenis *de novo* methylation. Faktor tersebut adalah usia, lingkungan, toksin, makanan

dan defek enzim. Kejadian metilasi DNA lebih sering pada orang usia tua membuktikan bahwa peranan lingkungan, makanan dan toksin memegang peranan yang besar.



Agen Anti Metilasi Sebagai Terapi

Sejak diketahui bahwa inhibitor metilasi DNA dapat menginduksi ekspresi *tumor suppressor gene*, maka dapat diduga bahwa obat ini dapat bekerja sebagai obat anti kanker. Induksi obat ini pada sel reseptor estrogen negatif menjadi positif telah memberikan prospek sebagai antagonis pada tumor dengan estrogen negatif (Ferguson *et al.*, 1995). Terdapat 2 kelas DNA methyltransferase inhibitor yang saat ini sedang dalam penelitian klinis yaitu pertama, nucleoside analog 5-aza-CdR yang bekerja sebagai antagonis DNA methyltransferase (Chandler *et al.*, 1985) Kedua, adalah inhibitor yang memblok DNMT1 pada tingkat protein.

Kedua obat ini menunjukkan efek yang berbeda pada replikasi DNA dan metilasi DNA yang merefleksikan mekanisme kerja obat. *Knock down* DNMT1 akan menginduksi beberapa *tumor suppressor genes* dan menghambat replikasi DNA melalui mekanisme metilasi independen. Efek terhadap ekspresi "tumor suppressor" mungkin dimediasi oleh interaksi protein pada DNMT1. Belakangan ditemukan bahwa *knock down antisense* DNMT1 pada sel kanker ER negatif akan menginduksi ekspresi ER (Adams, 2003).

Beberapa penelitian klinis telah dilaksanakan dengan menggunakan inhibitor DNMT seperti 5-azacytidine 5-azaC (DAC) pada beberapa jenis kanker terutama pada kanker hematologi. Respon yang baik dan efek yang dapat ditoleransi didapatkan pada

penyakit *myelodysplastic syndrome* (MDS). Namun demikian efek terapi pada tumor solid ternyata tidak seperti yang diharapkan, diduga hal ini terjadi karena faktor farmakodinamik dan farmakokinetik yang berbeda. Strategi yang lain adalah dengan menggunakan kombinasi 5-azaC dan obat kemoterapi ataupun obat *chromatin modifier* seperti histone deacetylase inhibitors (HDACi) yang saat ini telah dicoba untuk meningkatkan efek terapi terhadap tumor. Beberapa penelitian yang menggunakan inhibitor DNMT yang berbeda pada KPD seperti hidralazine yang kombinasi HDAC inhibitor seperti valproic acid memberikan efek yang menjanjikan (Arce *et al.*, 2006). Tantangan yang harus dihadapi adalah bagaimana menentukan isoform spesifik DNMT yang bertanggung jawab sebagai target tapi tidak terlibat dalam metilasi gen prometastasis (Arce *et al.*, 2006).

DNMT inhibitor tidak bekerja langsung dengan memindahkan grup metil dari kromatin yang termetilasi tetapi melalui proses DNA replikasi dengan mencegah metilasi pada DNA anak pada *CpG island*. Ekspresi dan aktifitas DNMT sangat bervariasi diantara berjenis tumor dan juga diantara satu jenis tumor. Inhibitor metiltransferase termasuk inhibitor nucleosida 5-azacytidine (azacitidine), 5-aza-20-deoxycytidine (decitabine) dan zebularine. Obat ini berikatan dengan DNA dan menyebabkan lepasnya metiltransferase dan demetilasi DNA. Obat lain adalah inhibitor nonnucleoside procainamide, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) dan RG108 dengan memblok DNA secara langsung. Azacitidine (Vidaza, Pharmion) merupakan suatu pyrimidine nucleoside analog dengan cytidine. Obat ini sudah disetujui oleh FDA untuk pengobatan sindroma myelodisplastik. Decitabine (Dacogen, MGI Pharma) merupakan analog deoxycytidine merupakan analog prodrug yang akan diaktifkan oleh deoxycytidine kinase yang juga disetujui oleh FDA untuk sindroma myelodisplastik. Sangat sedikit penelitian yang melakukan evaluasi efikasi inhibitor DNMT pada KPD. Hal ini membuka cakrawala baru dalam pengobatan KPD apakah obat ini efektif baik dalam pengobatan KPD dini maupun pada stadium lanjut (Stearns V, Zhou Q, Davidson N.E.

2007).

DAFTAR PUSTAKA

- Adams PD, Cairns P. 2003. Induction of the estrogen receptor by ablation of DNMT1 in ER-negative breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2: 557–8
- Arce C, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Revilla-Vazquez A, et al. 2006. A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PLoS ONE* 1: 98
- Baylin SB, Herman JG, 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16: 168–174
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR *et al.*, 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72:141–196.
- Bianco T, Chenevix TG, Walsh DC, Cooper JE, Dobrovic A, 2000. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21:147-151
- Bird.2002, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes. Dev.*16 : 6–21.
- Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK *et al.*, 2006. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* 8:38
- Butcher DT, Rodenhiser DI. 2007. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *European Journal of Cancer* 43: 210–219
- Chan KY, Liu W, Long JR, Yip SP, Chan SY, Shu XO, et al . 2009. Functional polymorphisms in the BRCA1 promoter influence transcription and are associated with decreased risk for breast cancer in Chinese women. *J.*

Med. Genet. 46(1); 32-9

- Chandler LA, Jones PA, 1985. Hypomethylation of DNA in the regulation of gene expression. *Dev Biol* 5: 335–49
- DNA-methyltransferase 3B 39179 G > T polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in a subset of Iranian population Daraei A, Salehi R, Hashem FM. 2011. *JRMS* 16 ; 6.
- Depkes RI., 2010. Profil kesehatan indonesia 2009. Depkes RI
- Esteller M.2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21:5427-5440
- Feigenberg M I, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. 2013. Basic concepts of epigenetics *Fertility and Sterility* 99 : 3
- Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE, 1995. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor- negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* 55: 2279–83
- Fitz Gerald MG, MacDonald DJ, Krainer M *et al.*, 1996. Germ-line mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med* 334: 143–9
- Herman JG, Baylin SB, 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hyper- methylation. *N Engl J Med* 349: 2042–2054
- Hopper JL, 2001. Genetic epidemiology of female breast cancer. *Semin Cancer Biol* 11:367–374
- Llomas J, Brody LC, 2008. Biology of BRCA1- and BRCA2-Associated Carcinogenesis dalam *Hereditary Breast Cancer ; Isaacs C, Rebbeck TR. (Eds), Informa, New York, 139-150*
- Lo P.K , Sukumar S. 2008, Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics.* December 9(12): 1879–1902
- Matros.E, Wang Z.C , Lodeiro G, Miron.A,

- Iglehart J.D, Richardson A.L. 2005. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles, *Breast Cancer Research and Treatment* . 91: 179–186
- Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T and Nakamura Y .1996. Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat Genet* 13: 245–7
- Palii SS, Robertson KD. 2007. Epigenetic control of tumor suppression.. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 17(4):295–316
- Passarge E. 2001. Atlas of genetics.2nd edition, Thieme, Stuttgart : 328-329
- Ralhan R, Kaur J, Kreienberg R, et al. 2007. Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer Lett* 248:1–17
- Robertson K.D, 2005. DNA methylation and human disease. *Nature* 6 ; 597-610
- Russo J, Yang X, Hu YF *et al.*, 1998. Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci* 3: 944–960
- Snell1 C, Krypuy1 M, Wong EM *et al.*, 2007. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a *BRCA1* tumour phenotype. *Breast Cancer Research* 10: 1
- Stearns V, Zhou Q, Davidson N.E. 2007. Epigenetic Regulation as a New Target for Breast Cancer Therapy in Lyman GN, Burstein HJ ; Breast Cancer Translational Therapeutic Strategies. Informa health care, New York. 285-296
- Suijkerbuijk KPM, Fackler MJ, Sukumar S *et al.*, 2008. Methylation is less abundant in BRCA1-associated compared with sporadic breast cancer. *Annals of Oncology* 19: 1870–1874
- Szyf M.2010. DNA methylation in breast cancer in Breast cancer in the post genomic era, Giordano A, Normanno N, eds. Humana Press, New York : 151-157
- Xinran X, Gammon MD, Zhang Y, Bestor TH, Zeisel S, et al. 2009. BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 115:397–404