



# Peranan Hipermetilasi DNA pada Kanker

Putri Y. Suyanto, Ahmad R. Utomo, Ferry Sandra

Cancer Division, Stem Cell and Cancer Institute,  
Kalbe Pharmaceutical Company, Jakarta, Indonesia

## ABSTRAK

Studi berkelanjutan mengenai sejumlah gen yang diduga menjadi inaktif pada kanker membawa pemahaman baru tentang konsep hipermetilasi yang terjadi pada promotor *tumor suppressor genes* seperti *cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, *E-cadherin (CDH1)*, *human mismatch repair gene (MLH1)*, dan *retinoblastoma1 (Rb1)*. Metilasi merupakan salah satu proses epigenetik yang memungkinkan terjadinya perubahan ekspresi gen tanpa merubah sekuens DNA sehingga DNA termetilasi dapat digunakan sebagai penanda kondisi dan tahap dari kanker dengan gabungan pemeriksaan menggunakan teknik IHC. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa hipermetilasi pada promotor *tumor suppressor genes* berkorelasi dengan aggresivitas dan buruknya prognosis dari sejumlah kanker. Sejumlah senyawa kimia agen demetilasi yang bekerja sebagai analogi nukleosida seperti 5-Azacytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine, dan Zebularin terbukti mampu menghambat enzim DNMTs dan mengaktifasi kembali gen – gen yang inaktif karena hipermetilasi pada kanker.

**Kata-kata kunci** : hipermetilasi, kanker, inaktivasi, *tumor suppressor gene*

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan proses yang melibatkan banyak faktor baik faktor genetik maupun faktor lingkungan yang multi-kompleks. Perubahan dari sel normal menjadi sel kanker (proses transformasi) diakibatkan oleh perubahan struktur/mutasi DNA, ekspresi/transkripsi mRNA, dan fungsi protein yang melibatkan beberapa gen. Gen – gen pencetus kanker sebagai faktor penting yang mengatur kondisi dalam tubuh secara internal mulai dipelajari mendalam. Kanker dapat dipicu oleh ekspresi onkogen (gen pendukung transformasi sel normal menjadi sel kanker), atau tidak aktifnya gen yang berperan sebagai penghalang atau penekan pertumbuhan kanker (*tumor suppressor genes*), serta kelainan pada gen yang berperan pada perbaikan DNA (*DNA repair genes*)<sup>(1, 2)</sup>.

## METILASI DNA DAN EKSPRESI GEN

Sejumlah penelitian mulai mempelajari bahwa aktivasi dan inaktivasi gen yang berperan dalam kanker, salah satunya akibat proses metilasi DNA pada gen tersebut. Metilasi sebagai proses

epigenetik tidak mengubah sekuens DNA bila dibandingkan dengan mutasi yang menyebabkan terjadinya perubahan struktur DNA. Metilasi merupakan salah satu modifikasi pada DNA dengan cara penambahan gugus metil pada posisi ke -5 dari basa sitosin oleh enzim DNA metiltransferase (DNMTs) dengan menggunakan donor dari S-adenosil M-metionin (SAM)<sup>(1)</sup>. Proses ini umumnya terjadi pada Sitosin (C) dari CpG dinukleotida di daerah CpG island. CpG nukleotida adalah untaian pendek DNA yang banyak mengandung basa sitosin (C) dan basa guanin (G). Bila persentase CpG dinukleotida lebih dari atau sama dengan 55 % maka disebut sebagai CpG island. Metilasi pada CpG island terjadi selama fase embrionik dan akan dikontrol secara teliti setelah memasuki fase pertumbuhan<sup>(3)</sup>.

Ada kalanya, metilasi DNA juga ikut berperan dalam mutasi di suatu untaian DNA. Proses deaminasi menyebabkan sitosin berubah menjadi urasil (C → U). Perubahan atau mutasi pada DNA ini dapat diperbaiki oleh agen perbaikan

DNA. Pada kasus metilasi DNA, sitosin termetilasi (me5C) akan berubah menjadi timin (me5C → T) dengan adanya deaminasi. Mesin – mesin untuk perbaikan DNA tidak dapat mengenali timin sehingga secara tidak langsung mutasi yang terjadi pada sekuens DNA tersebut tidak dapat diperbaiki<sup>(1)</sup>.

Hambatan ekspresi gen akan terjadi bila metilasi terjadi di bagian promotor gen tersebut. Metilasi yang terjadi di daerah selain promotor tidak akan menghentikan transkripsi gen walaupun di daerah tersebut banyak mengandung CpG Island. Inaktivasi juga tidak terjadi secara langsung akibat metilasi melainkan karena adanya penempelan sejumlah protein di bagian promotor gen tersebut<sup>(4, 5)</sup>. Pada sel yang normal, sebagian besar daerah di sekitar CpG islands dimetilasi sedangkan bagian CpG islands di bagian promotor gen tidak dimetilasi sehingga memungkinkan proses transkripsi tetap berjalan. Pada sel kanker terjadi hal yang sebaliknya, CpG islands pada promotor gen dimetilasi sehingga terjadi inaktivasi gen<sup>(1)</sup>.



### Hipermetilasi promotor DNA dan Inaktivasi Tumor Suppressor Genes pada Kanker

Metilasi DNA pada *tumor suppressor genes* di sel normal dapat menyebabkan transformasi sel ke arah sifat *malignant* karena hilangnya sifat alami untuk kontrol pertumbuhan. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa peningkatan mRNA dan biosintesis protein DNMT1 dan DNMT3B pada sejumlah tipe kanker berkorelasi dengan hipermetilasi CpG Island yang berlokasi pada bagian promotor dari beberapa *tumor suppressor genes* seperti *cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, *E-cadherin (CDH1)*, *human mismatch repair gene (MLH1)*, dan *retinoblastoma1 (Rb1)*<sup>(6)</sup>. Overekspresi DNMT1 dan DNMT3B pada kanker payudara di manusia berkorelasi dengan peningkatan agresivitas dari kanker payudara<sup>(7)</sup>. Mekanisme inaktivasi *tumor suppressor genes* yang dikenal dengan *Knudson's two-hit hypothesis* menyatakan bahwa tidak berfungsinya *tumor suppressor genes* membutuhkan (1) *first hit* dengan hilangnya fungsi gen tersebut di salah satu kopi kromosom melalui mutasi yang diturunkan (*hereditary, or germline mutation*), (2) *second hit* dengan hilangnya daerah kromosom di sel somatik yang mengandung kopi yang lain dari gen tersebut (*Loss of Heterozygosity or LOH*)<sup>(1, 3)</sup>. Dengan ditemukannya proses metilasi di *tumor suppressor gene*, maka metilasi pun bisa menjadi faktor *second hit*. Dengan demikian, syarat *Knudson Hypothesis* terpenuhi dalam menginaktivasi gen tersebut, ketika salah satu dari kopi kromosom sudah termutasi atau sudah mengalami LOH.

Ada dua dugaan mekanisme penghambatan transkripsi melalui metilasi pada promotor DNA<sup>(1, 7)</sup>. Mekanisme pertama menyatakan bahwa metilasi DNA menghambat secara langsung melalui pengikatan faktor transkripsi seperti AP-2, c-Myc, E2F dan NFkB pada *binding site* dalam sekuen promotor. Pada mekanisme ini, CpG Island berada di dalam sekuen promotor. Mekanisme represi yang kedua menyatakan terjadi pengikatan pro-

tein spesifik untuk metilasi DNA pada m<sup>5</sup>CpG dinukleotida. Metilasi DNA membutuhkan protein m<sup>5</sup>CpG-binding (MeCP) dan m<sup>5</sup>CpG-binding domain (MBD) yang akan menempel pada DNA termetilasi dan akan mencegah terjadinya transkripsi<sup>(7)</sup>.

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa hipermetilasi dan inaktivasi transkripsi ditemukan pada 33 % kasus kanker payudara, 60 % kanker prostat, 23 % sel karsinoma dari ginjal, dan 92 % *cell line* dari kanker kolon<sup>(8)</sup>. Gen-gen yang mengalami hipermetilasi pada sejumlah kasus kanker dapat dilihat pada tabel 1.<sup>(6, 9, 10)</sup>

### Hipermetilasi DNA dan Deteksi Kanker

Besarnya peranan metilasi pada proses *gene silencing* dari *tumor suppressor genes* di berbagai kasus kanker membawa pada suatu pemikiran, bahwa terjadinya metilasi bisa digunakan untuk mendeteksi kanker. Metilasi DNA terjadi pada tahap awal dari pembentukan kanker dan terlihat di berbagai macam jaringan tumor. Metilasi DNA sendiri digolongkan stabil secara kimia dan relatif mudah didapat sebagai penanda kanker<sup>(1)</sup>. Sumber metilasi DNA dapat diperoleh dari serum yang mengandung banyak DNA di samping dari hasil biopsi jaringan tumor. Sejumlah sampel biologi yang mengandung DNA tumor seperti darah, cairan tubuh, *semen*, urin, dan tinja dari pasien dapat digunakan sebagai sampel untuk analisis<sup>(6)</sup>.

Analisis yang dilakukan untuk kanker prostat, menunjukkan bahwa hipermetilasi 4 panel gen, *GSTP1*, *RARβ*, *TIG1*, *APC* ditemukan berkorelasi 100% dengan kanker tersebut. Gabungan analisis 4 panel gen di atas dengan analisis histologi memberikan ketepatan 97% untuk deteksi kasus *adenocarcinoma* prostat jika dibandingkan dengan analisis histologi saja yang hanya memberikan ketepatan 64%<sup>(6, 11)</sup>.

Metilasi DNA yang diambil dari sekret vagina dapat digunakan untuk deteksi kanker endometrium<sup>(6)</sup>. Deteksi 3 gen, *DAPK1*, *RARβ*, *TWIST1* dari sampel

*cervical neoplasia* memberikan spesifitas hingga 95% bergantung pada tahapan tumornya (74% untuk kanker invasif, dan 52% untuk *cervical intra-epithelial neoplasia* dan *carcinoma in situ*)<sup>(6, 12)</sup>.

Hipermetilasi dapat dijumpai pada tahap awal kasus kanker payudara tetapi tidak dijumpai pada tahap kanker payudara jinak dan pada payudara normal. Gen *DAPK*, *APC*, dan *RASSF1A* ditemukan pada 94 % kasus tumor payudara dan 76 % berkorelasi dengan sampel dari DNA serum<sup>(6, 13, 14)</sup>.

Kasus hipermetilasi berhubungan dalam prognosis beberapa penyakit misalnya metilasi *E-cadherin* berhubungan dengan *disease free survival (DFS)* kanker lambung dan *carcinoma* lidah nodul positif<sup>(6, 15)</sup>. Protein E-cadherin berperan dalam perlekatan sel epitel, hipermetilasi gen ini memacu pada pembentukan tumor dan resiko metastasis. Hipermetilasi gen *ATM* yang berperan untuk perbaikan DNA berkorelasi dengan peningkatan radiosensitivitas pada *cell line* tumor *colorectal*<sup>(6)</sup>.

### AGEN DEMETILASI DNA

Inhibitor metilasi DNA dapat digolongkan menjadi tiga golongan besar berdasarkan mekanisme kerjanya untuk menghambat enzim DNMT yaitu analogi nukleosida, analogi non nukleosida, dan antisense oligonukleosida. Analogi nukleosida misalnya 5-Azacytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine, dan Zebularin, sedangkan analogi non nukleosida seperti Procainamine dan Procain<sup>(16)</sup>. Golongan analogi nukleosida lebih dulu dikembangkan sehingga lebih banyak diteliti dibandingkan dengan golongan analogi non nukleosida. Mekanisme kerja secara detail golongan analogi non nukleosida belum banyak diketahui pasti<sup>(17)</sup>.

Agen demetilasi 5-Azacytidine dan 5-aza-2'-deoxycytidine dalam dosis rendah tidak menghambat proliferasi sel tetapi mampu menghambat DNMT. 5-Azacytidine dan 5-aza-2'-deoxycytidine telah disetujui penggunaannya oleh FDA untuk pengo-



**Tabel 1.** Gen – gen yang umumnya termetilasi pada kanker di manusia dan peranannya dalam pembentukan tumor<sup>(6, 9, 10)</sup>.

Gen	Peranan dalam Pembentukan Tumor	Jenis Tumor
APC	Proliferasi sel, migrasi sel, reorganisasi sitoskeletal, stabilitas kromosom yang tidak terkontrol	Payudara
		Paru - paru
		Esophageal
BRCA1	Gangguan perbaikan DNA dan aktivasi transkripsi	Payudara
		Ovarium
CDKN2A/p16	Menghambat proliferasi sel	Gastrointestinal
		Kepala dan leher
		Non-Hodgkin lymphoma
		Paru - paru
DAPK1	Menghambat apoptosis	Paru - paru
E-cadherin	Meningkatkan proliferasi, invasi dan metastasis	Payudara
		Tiroid
		Lambung
ER	Resistensi untuk estrogen	Payudara
		Prostat
GSTP1	Hilangnya kemampuan detoksifikasi metabolit dari bahan - bahan karsinogen	Prostat
		Payudara
		Renal
hMLH1	Gangguan perbaikan DNA dan mutasi gen	Kolon
		Lambung
		Endometrium
		Ovarium
MGMT	Gangguan perbaikan DNA dan resistensi obat	Paru - paru
		Otak
p15	Proliferasi sel yang tidak terkendali	Leukemia
		Lymphoma
		Sel karsinoma squamosa paru - paru
RASSF1A	Hilangnya regulator negatif untuk kontrol proliferasi sel melalui fase G1-S	Paru - paru
		Ovarium
		Ginjal
		Nasofaring
Rb	Kegagalan menghambat transkripsi gen - gen untuk replikasi DNA dan pembelahan sel	Retinoblastoma
VHL	Gangguan stabilitas RNA melalui degradasi RNA yang berikatan protein	Renal

Keterangan: APC, adenomatous polyposis coli; BRCA1, breast cancer 1; CDKN2A/p16, cyclin dependent kinase 2A; DAPK1, death associated protein kinase 1; ER, estrogen receptor; GSTP1, glutathione S-transferase P1; hMLH1, Mut L homologue 1; MGMT, O-6 methylguanine-DNA methyltransferase; RASSF1A, Ras association domain family member 1; Rb,retinoblastoma; VHL, von Hippel-Lindau.



batan neoplasma (*myelodysplastic syndrome*). Limitasi dari analog nukleosida ini adalah memerlukan inkorporasi DNA dan sintesis DNA aktif, jadi terbatas pada sel yang hipo-proliferasi (termasuk yang berpotensi sebagai *cancer stem cell*)<sup>(17)</sup>, tidak stabil dalam bentuk larutan dan harus diberikan secara parenteral atau subkutan, serta berefek samping myelosupresi<sup>(1)</sup>, atau menimbulkan efek hipometilasi pada beberapa gen pertumbuhan<sup>(18)</sup>. Secara *in vitro* obat di atas terbukti mampu mengurangi aktivitas DNMT1, DNMT3A dan DNMT3B pada konsentrasi mikromolar dan menginduksi demetilasi dari *CDKN2A*, *RB1*, *MLH1*, dan *tumor suppressor gene* lainnya pada sel kanker. 5-Azacytidine akan difosforilasi oleh uridin-sitidin nukleotida kinase menjadi 5-Azacytidine difosfat yang dapat direduksi oleh ribonukleotida reduktase menjadi 5-aza-deoxy-5-azacytidine difosfat yang akan inkorporasi dengan DNA. 5-aza-deoxy-5-azacytidine nukleosida dari DNA membentuk ikatan kovalen dengan DNMT sehingga terjadi inaktivasi enzim ini. Perlakuan 5-aza-deoxy-5-azacytidine pada HCT116 sel kanker kolon manusia menunjukkan adanya penurunan aktivitas DNMT1 sehingga menginduksi ekspresi *MLH1* dan menyebabkan penghentian pertumbuhan sel<sup>(7)</sup>.

Zebularine merupakan alternatif kedua setelah 5-Azacytidine dan 5-aza-2'-deoxy-5-azacytidine<sup>(19)</sup>. Obat ini relatif lebih stabil dan memiliki waktu paruh kurang lebih 44 jam pada 37°C di PBS pada pH 1.0 dan kurang lebih 508 jam pada pH 7.0 sehingga memungkinkan untuk dibuat sediaan oral. Penelitian menunjukkan pemberian obat ini secara oral pada *nude mice* yang ditransplan dengan sel tumor manusia dapat menyebabkan demetilasi dan reaktivasi gen *p16*. Zebularine juga memiliki efek sitotoksik yang lebih rendah baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pemberian Zebularine sebagai terapi lanjutan setelah 5-aza-deoxy-5-azacytidine dapat mencegah terjadinya remetilasi DNA<sup>(19)</sup>. Perlakuan Zebularine *in vitro* pada sel kanker T24, HCT-15, CFPAC-1, SW48, dan HT-29 menunjukkan adanya penurunan level DNMT,

serta hanya mempengaruhi rata-rata 6 macam gen dari 13.300 gen yang terdemetilasi dibandingkan pada sel fibroblast normal<sup>(20)</sup>.

DAFTAR PUSTAKA

- Herman J, Baylin S. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054.
- Baylin S. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.*, 2005; 2: S4-11,
- Yang X, Yan L, Davidson N. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 115-127,
- Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Muller-Holzner E, Marth C, Laird PW, Widschwendter M. Breast Cancer DNA Methylation Profiles in Cancer Cells and Tumor Stroma: Association with HER-2/neu Status in Primary Breast Cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 29-33,
- Krueger KE, Srivastava S. Posttranslational Protein Modifications: Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics. *Mol Cell Proteomics* 2006;5: 1799-1810,
- Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet* 2006; 47: 365-375,
- Luczak M, Jagodzinski P. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 143-154,
- Gilbert J, Gore S D, Herman JG, Carducci MA. The Clinical Application of Targeting Cancer through Histone Acetylation and Hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2004;10: 4589-4596.
- Das PM, Singal R. DNA Methylation and Cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4632-4642,
- Robertson K. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20: 3139-3155,
- Tokumar Y, Harden SV, Sun D.-I, Yamashita K, Epstein JI, Sidransky D. Optimal Use of a Panel of Methylation Markers with GSTP1 Hypermethylation in the Diagnosis of Prostate Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 5518-5522,
- Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, Toure P, Sow PS, Dem A, Dembele B, Critchlow CW, X, L, Lu H, McIntosh MW, Young AM, Kiviat NB. Detection of Hypermethylated Genes in Women with and Without Cervical Neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005; 97: 273-282,
- Dulaimi E, Hillinck J, de Caceres II, Al-Saleem T, Cairns P. Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 6189-6193
- Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J, Yu M, Trink B, Kiviat NB, Sidransky D. Detection of Aberrant Methylation of Four Genes in Plasma DNA for the Detection of Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24: 4262-4269,
- Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter Methylation Status of E-Cadherin, hMLH1, and p16 Genes in Nonneoplastic Gastric Epithelia. *Am J Pathol.* 2002;161: 399-403.
- Peedicayil J. Epigenetic therapy--a new development in pharmacology. *Indian J Med Res.*, 2006;123: 17-24,
- Issa J.-P. J. DNA Methylation as a Therapeutic Target in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 1634-1637,
- Dowell JE, Minna JD. Cancer Chemotherapy Targeted at Reactivating the Expression of Epigenetically Inactivated Genes. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1353-1355,
- Yoo CB, Cheng JC, Jones PA. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32: 910-912,
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004; 6: 151-158