

**ANALISIS HUBUNGAN ANEMIA TERHADAP HIPOKSIA JARINGAN SERTA
HUBUNGANNYA DENGAN REGULASI TRANSKRIPSI GEN ERITROPOIETIN
(EPO)**

TESIS

**oleh
FIRLI RAHMAH PRIMULA DEWI
116090117011003**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**ANALISIS HUBUNGAN ANEMIA TERHADAP HIPOKSIA JARINGAN SERTA
HUBUNGANNYA DENGAN REGULASI TRANSKRIPSI GEN ERITROPOIETIN
(EPO)**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
FIRLI RAHMAH PRIMULA DEWI
116090117011003**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

**ANALISIS HUBUNGAN ANEMIA TERHADAP HIPOKSIA JARINGAN SERTA
HUBUNGANNYA DENGAN REGULASI TRANSKRIPSI GEN ERITROPOIETIN
(EPO)**

**FIRLI RAHMAH PRIMULA DEWI
116090117011003**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Juli 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D
NIP 19631127 198903 2 001

Dr.dr. M. Darwin P, Sp.PD., KHOM
NIP 19600118 198601 1 001

Mengetahui
Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
NIP 19671213 199103 2 001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

ANALISIS HUBUNGAN ANEMIA TERHADAP HIPOKSIA JARINGAN SERTA HUBUNGANNYA DENGAN REGULASI TRANSKRIPSI GEN ERITROPOIETIN (EPO)

Nama : Firli Rahmah Primula Dewi

NIM : 116090117011003

KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Prof. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D.

Anggota : Dr. dr. Muhammad Darwin Prenggono, Sp.PD., KHOM

TIM DOSEN PENGUJI :

Dosen Penguji I : Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS

Dosen Penguji II : Muhaimin Rifa'i Ph.D

Tanggal Ujian : 25 Juli 2013

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 25 Juli 2013

Nama : Firli Rahmah Primula Dewi
NIM : 116090117011003

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini telah dipublikasikan ke dalam satu jurnal ilmiah internasional namun tesis ini terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis dan pemilik proyek selaku penyandang dana penelitian. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RIWAYAT HIDUP

Firli Rahmah Primula Dewi di lahirkan di Lamongan, 12 Desember 1990 anak dari ayah M. Imam, M.Pd dan ibu Yaumi, SD sampai SMA di kota Lamongan, lulus SMA tahun 2008, selanjutnya melanjutkan studi di jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai tahun 2008 dan menyelesaikan studi pada tahun 2012 dengan tugas akhir berjudul “Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (Epo) dengan Peningkatan Jumlah Sel pada Jaringan Kanker Payudara”. Pengalaman kerja sebagai asisten praktikum Biologi sel untuk jurusan Biologi, FMIPA, UB dan praktikum Biologi Dasar untuk Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, UB, dan menjadi guru privat untuk anak SD, SMP dan SMA mata pelajaran IPA dan Biologi dari tahun 2011 sampai sekarang.

Malang, Juli 2013

Penulis

RINGKASAN

Analisis Hubungan Anemia Terhadap Hipoksia Jaringan serta Hubungannya dengan Regulasi Transkripsi Gen Eritropoietin (Epo)

Firli Rahmah PD¹, M. Darwin Prenggono², Fatchiyah¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

² Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin
2013

Anemia merupakan kondisi dimana level Hb seseorang kurang dari 12 g/dL. Kondisi anemia pada pasien kanker ditambah dengan tingginya tingkat proliferasi sel kanker diduga merupakan faktor utama terjadinya kondisi hipoksia pada jaringan kanker. Kondisi hipoksia merupakan kondisi dimana level pO₂ jaringan sangat rendah. Pada kondisi hipoksia, sel kanker mampu mensintesis protein Eritropoietin (EPO) dibawah kontrol oleh faktor transkripsi *hypoxia inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α). EPO merupakan protein yang berfungsi untuk meningkatkan pertahanan diri sel. Persentase metilasi yang berbeda-beda pada region promotor dan enhancer gen EPO diduga berpengaruh terhadap aktivitas HIF1 α . Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap penelitian. Penelitian tahap pertama dilakukan dengan pewarnaan HE dan imunofluoresen untuk mengamati proliferasi sel, serta ekspresi EPO dan reseptornya (EPOR) pada jaringan kanker payudara pasien anemia dan non-anemia. Penelitian tahap kedua dilakukan secara *in silico* untuk mengetahui pengaruh metilasi pada region regulator gen EPO terhadap aktivitas HIF1. Persentase metilasi yang dianalisis adalah 0% (kondisi hipoksia), 46% (sel kanker kondisi normoksia), dan 8% (sel normal). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok anemia, ekspresi EPO dan EPOR lebih tinggi dibandingkan pada kelompok non-anemia, sehingga diduga bahwa pada kelompok anemia, kondisi jaringan kanker adalah lebih hipoksik dibandingkan dengan kelompok non-anemia. Hasil penelitian secara *in silico* menunjukkan bahwa energi paling kecil yang dibutuhkan untuk proses interaksi dengan HIF1 adalah pada enhancer gen EPO yang tidak termetilasi (kondisi hipoksia). Kecilnya energi yang dibutuhkan untuk proses interaksi menyebabkan ikatan yang terbentuk adalah lebih stabil, sehingga kemungkinan HIF1 dalam mentranskripsi gen EPO adalah lebih besar. Hasil tersebut mendukung hasil penelitian tahap pertama, dimana kondisi hipoksia akan menyebabkan HIF1 lebih aktif dalam mentranskripsi gen EPO, sehingga ekspresi EPO menjadi lebih tinggi pada jaringan yang mengalami kondisi hipoksia.

SUMMARY

Analysis Impact of Anemia to Hypoxia Condition and it's Correlation with Transcription Regulation of Erythropoietin Gene

Firli Rahmah PD¹, M. Darwin Prenggono², Fatchiyah¹

¹Biology Department, Faculty of Mathematics and natural Science, Brawijaya University, Malang.

² Medical Faculty, University of Lambung Mangkurat, Banjarmasin
2013

Anemia is a frequent complication of malignant diseases and cancer therapy. In cancer patients, anemia has been hypothesized to lead to tumor hypoxia. Tumor hypoxia might lead to tumor growth and resistance to therapy, because it leads to angiogenesis, genetic mutations, and resistance of apoptosis. Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein hormone which - in the normoxic condition - is produced in adult kidney and the fetal liver that regulates growth, differentiation, and survival of erythroid progenitors. Epo circulates in the blood vessels and binds to Epo receptors (EpoR) to accelerate viability, proliferation and differentiation, resulting in an increased number of erythrocytes. The promoter region of Epo becomes methylated in normoxic (non-hypoxia) condition, but not in hypoxic condition. Methylation of the Epo enhancer region declines the transcription activity of Epo gene. However, the mechanism of this regulation needs more proper examination. This research was conducted in two steps. First step was to investigate the Epo and EpoR expression in anemic and non anemic group of breast cancer tissue by using immunofluorescence methods, and the second was to investigate the effect of different percentage of methylation on HIF1 activity by using *in silico* analysis. From a preliminary study, it's known that in normal cells at non-hypoxic conditions, the promoter and enhancer region of EPO gene become methylated up to 8% (referring to the number of cytosine being able to be methylated), whereas in cancer cells the methylation can reach up to 46%. But at hypoxic condition, the promoter and enhancer region of EPO gene are not methylated. The Epo and EpoR analyzed by immunofluorescence showed a higher expression, especially in anemia group compared to non-anemia. Comparing different signal intensities, we found that Epo and EpoR expression was significantly higher in anemia than in non anemia. There was a negative correlation between cancer cell proliferation with Epo and EpoR expression in anemic group. In contrast to the situation with the anemic group, we found a positive correlation between cancer cell proliferation with Epo and EpoR expression in non-anemic group. In silico analysis show that binding energy in 46% methylated DNA was higher than in unmethylated DNA and 8% methylated DNA. So, we presume that a silencing mechanism of the Epo gene by methylation is correlated with the binding energy, which is required for interaction. A higher methylation percentage correlates with a higher binding energy which can cause an unstable interaction between DNA and transcription factor. In conclusion, methylation of promoter and enhancer region of Epo gene leads to silencing.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Analisis Hubungan Anemia Terhadap Hipoksia Jaringan serta Hubungannya dengan Regulasi Transkripsi Gen Eritropoietin (Epo)". Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammmad SAW. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Magister Sains dalam bidang Biologi. Dalam penyusunan tesis ini penulis mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Prof. Fatchiyah, M.Kes, Ph.D dan Bapak Dr. dr. M. Darwin Prenggono, SpPD. KHOM, selaku dosen pembimbing tesis, atas ilmu dan kesabaran dalam membimbing penyelesaian tesis ini;
2. Bapak Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS. dan Bapak Muhaimin Rifa'i, Ph.D, Med. Sc. selaku penguji tesis, atas nasihat, ilmu dan motivasinya untuk menjadi lebih baik;
3. Bapak, Ibu, Adik, serta keluarga atas segala dukungan, doa dan kesabarannya;
4. Ibu Tri Ardyati, M. Agr., Ph.D selaku Ketua Pascasarjana Jurusan Biologi atas nasehat dan bimbingannya,
5. Ketua Jurusan Biologi, dosen-dosen beserta staf Jurusan Biologi, FMIPA UB;
6. Laboran, Analis, staf administrasi Pascasarjana FMIPA dan Jurusan Biologi, rekan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati dan Laboratorium Biosains UB, serta rekan Pascasarjana Biologi angkatan 2011;
7. Anggun Indah Budiningrum, S.Si, Choirunil Khotimah S.Si serta teman-teman Bioengineering 3 Jurusan Biologi UB;
8. Semua pihak yang telah mendukung dalam kelancaran penelitian serta penulisan tesis ini.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas segala ilmu, dukungan, motivasi, serta pengorbanan yang diberikan kepada penulis demi terselesaikannya tesis ini. Penulisan tesis ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 25 Juli 2013
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
DAFTAR PUBLIKASI ILMIAH	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Anemia pada Kanker	4
2.2 Regulasi Gen Eritropoietin (EPO)	5
2.3 Metilasi Promotor EPO	7
2.4 Reseptor Eritropoietin (EPOR)	9
2.5 Sinyal Transduksi EPO dengan EPOR	11
2.6 Modelling dan Visualisasi Struktur Protein	12
2.7 Software Penunjang Analisis <i>in silico</i>	14
2.8 Kerangka Konseptual	17
BAB 3 METODE PENELITIAN	18
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.2 Kerangka Operasional	18
3.3 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin	19
3.4 Analisis Imunofluoresen	20
3.5 Analisis <i>in silico</i>	20
3.5.1 Modelling struktur 3D protein dan asam amino	20
3.5.2 Metilasi promotor EPO	21
3.5.3 Docking	21
3.6 Analisa Data	22
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Analisis hubungan anemia dengan ekspresi EPO dan EPOR....	23
4.2 Analisis metilasi terhadap regulasi transkripsi gen EPO	27
4.2.1 Pemodelan HIF1 dan enhancer gen EPO	27
4.2.2 Molecular docking HIF1 dengan enhancer <i>EPO</i>	29
4.2.3 Analisis interaksi HIF1 dengan enhancer <i>EPO</i>	33

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1	Data hematopietik pasien kanker payudara.....23
2	Hasil docking HIF1 dengan enhancer gen EPO.....32
3	Molekul yang terlibat dalam proses interaksi.....33

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1	Mekanisme anemia pada kanker 4
2	Struktur gen EPO 7
3	Silencing <i>EPO</i> karena metilasi..... 8
4	Struktur gen EPOR..... 10
5	Bentuk protein EPOR..... 10
6	Persinyalan EPO dan EPOR..... 11
7	Jalur transduksi EPO-EPOR..... 12
8	Kerangka konseptual penelitian 17
9	Kerangka operasional penelitian 19
10	Profil histopatologi jaringan kanker payudara 24
11	Ekspresi EPO dan EPOR..... 25
12	Profil jaringan kanker payudara dengan pewarnaan HE 26
13	Hasil analisis korelasi..... 26
14	Struktur 3D protein HIF1 28
15	Metilasi enhancer gen EPO 29
16	Hasil <i>molecular docking</i> 32
17	Interaksi antara HIF1 dengan enhancer <i>EPO</i> 34

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Publikasi ilmiah	42
2	Keterangan Laik Etik.....	43
3	Ramachandran plot analysis	44
4	Analisis statistika.....	45

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

3D-DART	: 3DNA-Driven DNA Analysis and Rebuilding Tool
bHLH	: basic Helix-Loop-Helix
CAD	: <i>Carboxy-terminal transactivation domain</i>
CLSM	: Confocal Laser Scanning Microscope
CODDD	: Carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain
DIC	: Different Interference Contrast
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
EPO	: Eritropoietin
EPOR	: Eritropoietin Receptor
HE	: Hematoxilin-Eosin
HIF1 α	: <i>Hypoxia Inducible Factor-1</i> subunit α
HIF1 β	: <i>Hypoxia Inducible Factor-1</i> subunit β
GUI	: Grapichal User Interface
JAK2	: <i>Janus family protein kinase 2</i>
KDa	: kilo dalton
MD	: <i>Molecular dynamics</i>
MR/RM	: Medical Record/ Rekam Medis
NAD	: <i>Amino-terminal transactivation domain</i>
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NODDD	: Amino (NH ₂)-terminal oxygen-dependent degradation domain
PBS	: Phospat Buffer Saline
PDB	: Protein Data Bank
PHD	: Prolyl hydroxylase domain
PI3K	: phosphatidylinositol 3-kinase
STAT5	: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
WSXWS	: Members of the cytokine receptor family have a consensus Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser sequence (WS motif) in the extracellular domain.
YASARA	: Yet Another Scientific Artificial Reality Application
Φ	: psi
Ψ	: phi
α	: alpha
β	: beta

DAFTAR PUBLIKASI ILMIAH

1. Erythropoietin (Epo) expression related with the cell proliferation in breast cancer tissue. Telah dipresentasikan dalam seminar internasional dan masuk ke dalam *proceeding* 2nd International Conference of Life Sciences, yang dilaksanakan di Batu, Malang, Jawa Timur, Indonesia. 2012.
2. Impact of anemia on erythropoietin (EPO) and erythropoietin receptor (EPOR) expression: correlation with the proliferation of breast cancer cells (J Exp Integr Med. year: 2013, volume: 3, issue: 3, halaman 199-204)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Anemia adalah kondisi yang banyak terjadi akibat dari terapi kanker. Berdasarkan WHO dan National Cancer Institute, anemia dapat dibagi menjadi anemia minor (Hb 10-11,9 g/dL), moderate (8-10 g/dL) dan akut (6,5-7,9 g/dL) (Varlotta, 2005). Anemia pada pasien kanker diduga dapat menyebabkan terjadinya kondisi hipoksia pada tumor, selain itu proses dari progresifitas tumor yang ditandai dengan pertumbuhan seluler yang sangat cepat juga dapat menyebabkan perubahan lingkungan mikro tumor sehingga akhirnya menyebabkan terjadinya kondisi hipoksia. Hipoksia merupakan kondisi dimana kurangnya suplai oksigen pada jaringan sehingga kadar oksigen pada jaringan sangat rendah. Kondisi hipoksia menyebabkan terjadinya aktivasi dari faktor transkripsi *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF1 α) yang kemudian akan berasosiasi dengan HIF-1 β dan mentranskripsi beberapa gen target.

Protein eritropoietin (EPO) adalah suatu hormon glikoprotein berukuran 30,4 kDa yang pada kondisi normal di produksi oleh ginjal dan hati serta merupakan regulator utama untuk produksi sel darah merah sebagai respon penurunan konsentrasi oksigen jaringan (Jelkmann, 2002). Pada kondisi lingkungan hipoksia, sel kanker dapat mengekspresikan EPO melalui regulasi dari faktor transkripsi HIF1. Protein EPO bekerja melalui ikatan dengan reseptornya yaitu eritropoietin reseptor (EPOR). Aktivasi EPOR/JAK2 akan mengaktifkan beberapa protein intraseluler salah satunya yaitu fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang meningkatkan pertahanan hidup sel eritrosit (Weiss, 2003). Aktivasi jalur fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) menyebabkan fosforilasi protein kinase B (PKB atau AKT) yang memfosforilasi dan menginaktivasi regulator proapoptotik dan memfosforilasi I κ B dan menyebabkan lepasnya *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan translokasinya ke nukleus di mana NF- κ B dapat memerantarai transkripsi gen-gen anti-apoptosis (Moore, 2011). Aktivasi EPOR/JAK2 juga mengaktifkan beberapa protein intraseluler yang lainnya, termasuk Shc yang akan aktif dan mengaktifkan jalur persinyalan Raf1-Ras1-MEK-ERK yang akan menginduksi terjadinya proliferasi sel (Burcombe dkk., 2006), dimana semua efek tersebut secara keseluruhan mengakibatkan peningkatan ketahanan hidup sel (Pajonk dkk., 2004).

Penelitian yang dilakukan oleh Dewi dkk., (2012) menunjukkan bahwa ekspresi EPO pada masing-masing stadium kanker payudara tidak mempunyai perbedaan yang signifikan, akan tetapi pada penelitian tersebut pengambilan sampel dilakukan secara acak

tanpa melihat status anemia dan non-anemia dari pasien kanker payudara sehingga perlu dilakukan analisis ekspresi EPO pada kelompok kanker payudara pasien anemia dan pada pasien kanker payudara non-anemia. Penelitian lain yang dilakukan Prenggono, dkk (2012) dengan menggunakan sampel payudara anemia dan non-anemia pasien kanker payudara yang dilihat berdasarkan data klinis pasien menunjukkan bahwa kondisi anemia tidak menyebabkan terjadinya perubahan ekspresi faktor transkripsi dari gen EPO (HIF-1), akan tetapi kondisi anemia tersebut memberikan pengaruh yang berbeda terhadap beberapa gen target transkripsi dari HIF-1. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan tersebut belum bisa menjawab secara jelas pengaruh dari anemia terhadap ekspresi dari protein EPO karena induksi dari faktor transkripsi HIF-1.

Region promotor dari gen EPO pada sel normal dan sel kanker akan termetilasi dengan persentase yang berbeda-beda. Penelitian yang dilakukan oleh Wenger, dkk (1998) menunjukkan bahwa hipermetilasi pada enhancer gen EPO mengurangi aktivitas transkripsi gen tersebut. Penelitian tersebut didukung oleh penelitian lain yang dilakukan oleh Yin dan Blanchard (2000) yang menunjukkan bahwa metilasi pada promotor gen EPO menyebabkan penurunan ekspresi EPO dengan menghambat aktivitas faktor transkripsi HIF-1. Penelitian-penelitian tersebut masih belum bisa menjelaskan mengapa metilasi menyebabkan perubahan regulasi dari aktivitas faktor transkripsi HIF-1, sehingga analisis secara *in-silico* dibutuhkan untuk memahami mekanisme tersebut. Analisis ini dapat memberikan kontribusi informasi visual bersifat fisika-kimia serta molekul-molekul yang berperan dalam proses tersebut. Kelebihan analisis ini akan membantu memperjelas pengaruh metilasi terhadap perubahan aktivitas faktor transkripsi HIF-1 dan ekspresi dari protein EPO.

1.2 Rumusan Masalah

- Apakah anemia berperan dalam menginduksi hipoksia pada jaringan kanker payudara yang ditandai dengan peningkatan ekspresi EPO dan EPOR?
- Bagaimana aktivitas HIF-1 ketika terjadi metilasi pada promotor gen EPO yang dianalisis secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

- Menjelaskan pengaruh anemia terhadap hipoksia pada jaringan kanker payudara yang ditandai dengan adanya peningkatan ekspresi protein EPO dan EPOR.

- Eskplorasi pengaruh metilasi terhadap aktivitas HIF1 dalam mentranskripsi gen EPO.

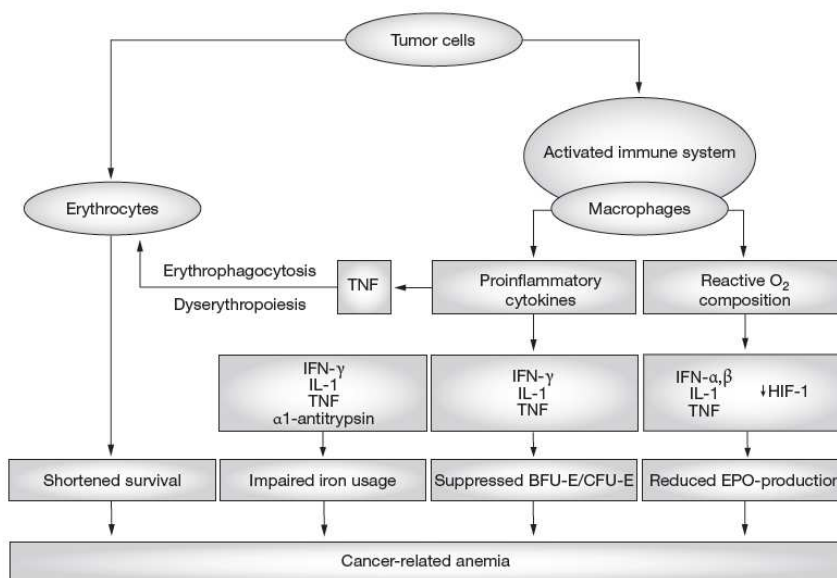
1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah didapatkannya informasi pengaruh metilasi terhadap aktivitas transkripsi gen EPO. Selain itu, didapatkan juga informasi pengaruh anemia pada pasien kanker payudara terhadap ekspresi EPO dan EPOR sehingga bisa dijadikan sebagai pertimbangan dalam pemberian terapi pasien kanker payudara dengan menggunakan ESA (*erythropoietin stimulating agent*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anemia pada Kanker

Anemia merupakan masalah medis yang berpotensi besar mempengaruhi luaran klinis pasien kanker. Anemia dapat mencapai 60% pada penderita limfoma, kanker paru, kanker ginekologik atau saluran kemih (Groopman & Itri, 1999). Prevalensi anemia juga berkaitan dengan stadium kanker. Pada pasien kanker kolon, anemia terjadi pada 40% penderita stadium dini dan hampir 80% pada penderita stadium lanjut (Knight, dkk., 2004). Insiden anemia dilaporkan lebih tinggi (70-90%) pada pasien yang menjalani kemoterapi myelosupresif, radiasi, atau keduanya (Groopman & Itri, 1999). Anemia juga dikaitkan dengan luaran klinis dan respons terapi yang lebih buruk (Harper & Littewood, 2005). Anemia merupakan faktor prognostik independen untuk ketahanan hidup seorang penderita kanker (Caro, dkk., 2001). Salah satu penyebabnya adalah karena penderita kanker yang mengalami anemia mungkin tidak menjalani kemoterapi secara lengkap sehingga menjadi faktor prognostik yang buruk (Van Belle & Cocquyt, 2003). Penurunan kapasitas oksigen darah juga dapat memicu hipoksia tumor, sehingga menyebabkan resistensi terhadap radiasi dan kemoterapi tertentu, instabilitas genetik dan peningkatan angiogenesis yang semuanya mempercepat perburukan penyakit (Vaupel, dkk., 2001).



(Bohlius, dkk., 2006).

Gambar 1 Mekanisme yang menyebabkan anemia pada kanker

Anemia dapat terjadi akibat penurunan produksi sel darah merah, peningkatan destruksi sel darah merah, berkurangnya sel darah merah di sirkulasi, atau kombinasi faktor-faktor tersebut (Hurter & Bush, 2007). Anemia pada kanker juga dapat disebabkan karena teraktivasinya sistem imun sehingga menginduksi sel T dan sel makrofag untuk melepaskan sitokin proinflamasi dan *reactive oxygen species* (ROS). Sitokin proinflamasi yang dilepaskan antara lain interferon gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-1, dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α). Produksi berlebihan sitokin proinflamasi tersebut dapat menyebabkan kelainan metabolisme besi, produksi EPO yang tidak mencukupi, tidak adanya respons progenitor eritroid terhadap EPO, penurunan lama hidup eritrosit, serta gangguan proliferasi serta diferensiasi sel-sel progenitor eritroid (Bohlius, dkk., 2006).

Anemia juga dapat terjadi sebagai efek langsung dari kemoterapi, radiasi, atau keduanya pada fungsi sumsum tulang (myelosupresi) atau fungsi ginjal (nefrotoksitas) yang menghambat sintesis EPO (Moliterno & Spivak, 1996). Selain itu, tumor yang bermetastasis ke sumsum tulang juga dapat mengganggu proses hematopoiesis sehingga mengakibatkan fibrosis yang menyebabkan jaringan sumsum normal akan diganti oleh jaringan fibrosis dan sel-sel tumor. Defisiensi folat, vitamin B12 atau besi juga dapat menyebabkan terjadinya anemia, yang mana ketika suplai nutrisi yang tidak mencukupi, khususnya besi, dapat memperberat disfungsi eritropoiesis dan menyebabkan tidak efektifnya proses eritropoiesis (Mercadante, dkk., 2000).

2.2 Regulasi Gen Eritropoietin (EPO)

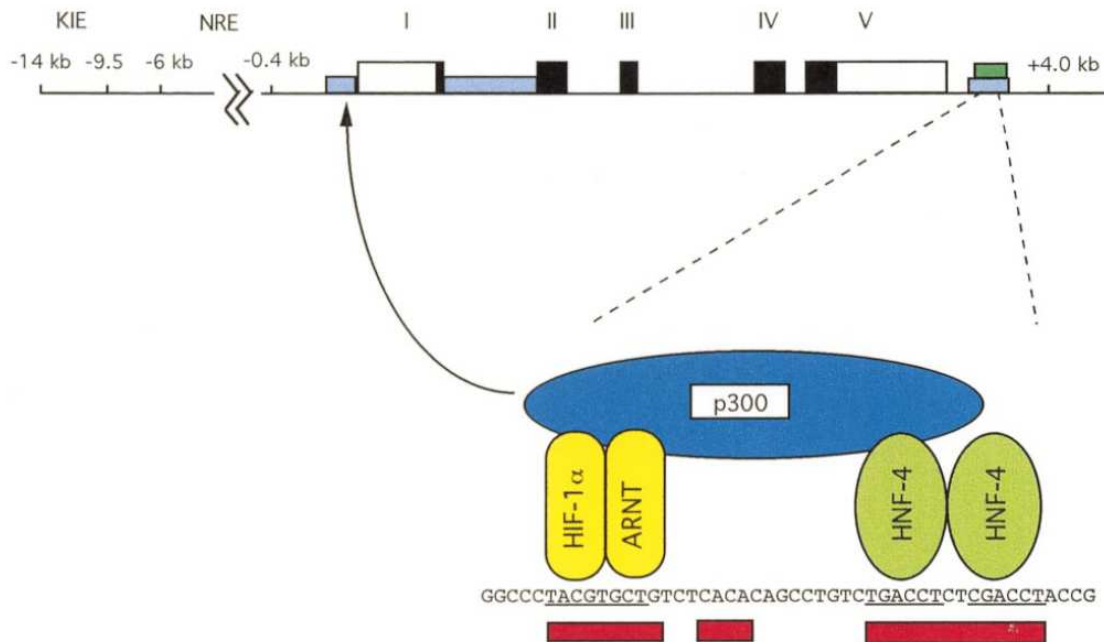
Eritropoietin (EPO) adalah suatu hormon glikoprotein berukuran 30,4 kDa yang merupakan regulator utama produksi sel darah merah sebagai respon akibat penurunan konsentrasi oksigen pada jaringan (Jelkmann, 2002). Protein EPO tersusun atas 193 asam amino, dimana hanya 165 asam amino yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptor (Wasley, dkk., 1991). EPO pada fase fetus diproduksi terutama oleh sel-sel hati, dan setelah kelahiran hampir semua EPO yang bersirkulasi di pembuluh darah berasal dari sel peritubular fibroblast yang berada pada korteks ginjal (Maxwell dkk., 1997). Faktor transkripsi dari famili GATA diduga penting untuk mengontrol waktu dan jaringan spesifik yang akan mengekspresikan gen EPO (Dame dkk., 2004). Ekspresi gen EPO bukan hanya di stimulasi ketika kapasitas O₂ pada darah menurun, tetapi juga ketika pO₂ arteri menurun maupun ketika afinitas O₂ darah meningkat (Sohmiya dan Kato, 2000). Terdapat fluktuasi

harian konsentrasi EPO yang bersirkulasi di pembuluh darah, dimana konsentrasi EPO 40% lebih tinggi pada waktu malam dibandingkan pada waktu pagi (Wide dkk., 1989).

Terdapat beberapa sekuen DNA regulator pada gen EPO. Sekuen kunci terletak pada *Hypoxia Responsive Element* (HRE) yang tersusun dari nukleotida (A/G)CGTG di setiap daerah enhancer gen-gen target *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). Aktivasi gen EPO oleh protein HIF-1 diawali dengan terikatnya HIF-1 pada *hypoxia-responsive element* (HRE) yang berfungsi sebagai tempat pengikatan (*binding site*) dengan HIF-1 dan aktivasi transkripsi gen-gen target HIF-1. Kompleks HIF tersusun atas subunit α dan subunit β (Lu, dkk., 2006). Subunit HIF- α terdiri atas 3 subtipe, yaitu -1 α , -2 α , dan -3 α . HIF1- α/β diketahui berfungsi sebagai mediator utama untuk aktivasi gen-gen yang terkait dengan hipoksia. Peran HIF2- α/β hingga saat ini belum diketahui secara pasti, dan HIF3- α/β diduga berfungsi sebagai supresor induksi gen yang terkait hipoksia (Hara dkk., 2001).

Terdapat 4 domain aktif pada molekul HIF-1 α yaitu domain bHLH untuk berikatan dengan DNA, domain PAS untuk dimerisasi, domain *amino (NH₂)-terminal oxygen-dependent degradation domain* (NODDD) dan *carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain* (CODDD) untuk degradasi, serta *amino-terminal transactivation domain* (NAD) dan *carboxy-terminal transactivation domain* (CAD) yang merupakan domain transaktivasi. HIF-1 β memiliki domain bHLH, PAS dan domain transaktivasi, tetapi tidak memiliki domain degradasi (NODDD/ CODDD) sehingga terekspresi secara terus menerus di semua jaringan dalam kondisi aerobik (Whitelaw dkk., 2004).

Enhancer gen EPO terletak pada 3' *flanking region* (Hu, dkk., 1997). Aktifitas dari enhancer gen EPO tidak bergantung pada orientasi dan jarak dari promoter, serta menunjukkan respon yang sama terhadap induksi dari hipoksia, kobalt klorida dan besi. Enhancer gen EPO terkarakterisasi menjadi tiga bagian. *Site* pertama, pada ujung 5' dari gen EPO terdapat sekuen TACGTGCT yang merupakan elemen tempat pengikatan dengan faktor transkripsi HIF-1 karena induksi hipoksia sel. Faktor transkripsi ATF-1 dan CREB-1 diketahui juga terlibat dalam kompleks tersebut, tetapi masih belum diketahui secara pasti apakah faktor-faktor tersebut mempunyai peran fungsional untuk enhancer *EPO*. *Site* kedua yaitu sekuen CACA pada ujung 3' dengan panjang 7 bp pada gen EPO. Tidak ada protein yang diketahui berikatan dengan sekuen ini, akan tetapi mutasi pada sekuen ini dapat mengganggu aktivitas dari enhancer. *Site* ketiga pada enhancer gen EPO adalah sekuen repeat dari 2 *steroid hormone receptor* (DR-2) yang dipisahkan oleh 2 basa nitrogen (Benjamin, dkk., 1999).



(Benjamin, dkk., 1999)

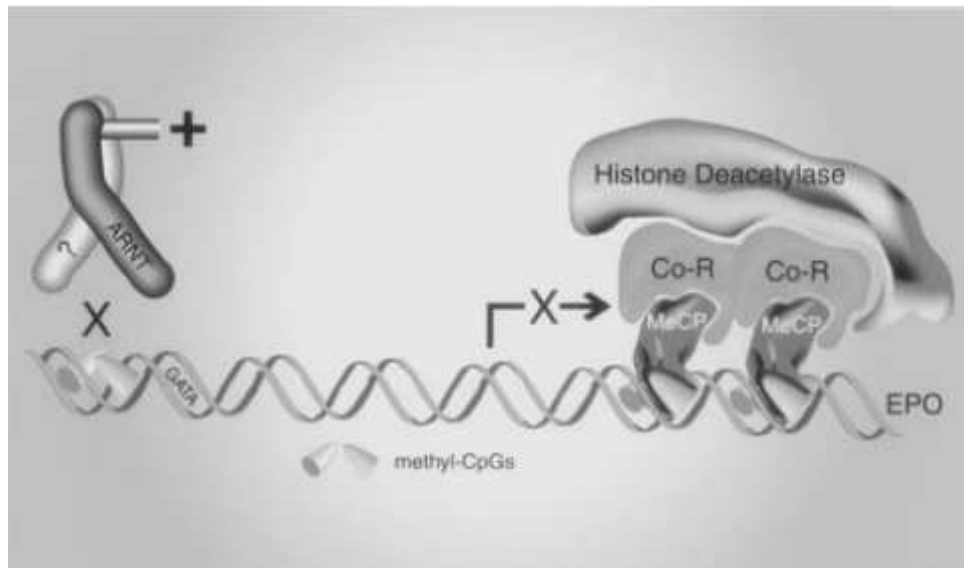
Gambar 2 Struktur gen EPO pada manusia.

Promotor gen EPO manusia tidak mempunyai konsensus elemen TATA atau CAAT dan mempunyai panjang 17 bp (-61 sampai -45) yang bertanggung jawab terhadap stimulus hipoksia yang diterima. Pada gen *Epo* elemen-elemen regulator transkripsi utama adalah *hypoxia responsive element* (HRE) untuk pengikatan HIF-1/2 α/β dan faktor transkripsi lain (misalnya *hepatic nuclear factor* [HNF]-4) Elemen regulator DNA lainnya adalah *kidney inducible element* (KIE), *negative regulatory element* (NRE), *liver-inducible element* (LIE), dan *negative regulatory liver element* (NRLE) (Stoctman & Fandrey, 2006). Terdapat tiga daerah *non-coding* dari gen EPO yang terkonservasi, yaitu daerah promotor, intron pertama dan *region* 120 bp dari ujung 3' hingga *site* poliadenilase (Benjamin, dkk., 1999). Metilasi CpG island pada promotor gen EPO bervariasi antara sel yang memproduksi EPO dengan sel yang tidak memproduksi EPO. Melalui penghambatan pembentukan *DNA-binding complex* atau dengan pengikatan *methyl-CpG binding protein*, metilasi diduga berkontribusi terhadap aktivitas spesifik dari promotor EPO (Yin & Blanchard, 2000).

2.3 Metilasi Promotor EPO

Silencing gen merupakan salah satu karakteristik dari metilasi CpG *island*, selain itu aktivitas transkripsi dari promotor juga berhubungan dengan status metilasinya (Meehan, dkk., 1992). Agen yang menyebabkan demetilasi DNA seringkali menginduksi silencing pada gen tertentu. Terdapat dua mekanisme yang diduga terlibat dalam penekanan aktivitas transkripsi yang disebabkan karena metilasi pada CpG *island*. Pertama, metilasi basa sitosin (C) pada sekuen pengenalan DNA dapat menghalangi pengikatannya dengan *sequence-specific trans-acting protein* (Siegfried & Cedar, 1997). Metilasi DNA juga menyebabkan pengikatan famili protein yang mengganggu secara langsung maupun secara tidak langsung ikatan antara sekuen pengenalan DNA dengan faktor transkripsi (Hendrich & Bird, 1998).

CpG *island* yang berada disekitar site awal transkripsi mengalami hemimetilasi pada keadaan normoksia, akan tetapi tidak termetilasi ketika pada kondisi hipoksia. Hingga saat ini masih belum diketahui apakah metilasi pada site tersebut mempengaruhi aktivitas transkripsi dari promotor atau tidak. Penelitian yang dilakukan oleh Yin & Blanchard (2001) dengan menggunakan kultur sel Hep3B dan HeLa yang diberikan perlakuan normal dan 1% oksigen (hipoksia) menunjukkan bahwa gen EPO mempunyai bentuk yang berbeda pada sel yang mengekspresikan EPO dengan sel yang tidak mengekspresikan EPO. Metilasi CpG *island* pada promotor EPO mengganggu pengikatan sekuen spesifik DNA-binding protein dengan protein faktor transkripsi. CpG *island* termetilasi hanya pada sel yang tidak mengekspresikan EPO, dan metilasi simetris atau hemimetilasi pada CpG menyebabkan penghalangan pembentukan kompleks DNA-protein. Metilasi site HIF1 pada enhancer gen EPO menghalangi pengikatan HIF1 sehingga menyebabkan penurunan aktivitas transkripsi yang distimulasi oleh enhancer (Wenger, dkk., 1998).



(Yin & Blanchard, 2001)

Gambar 3 Model *silencing* gen EPO karena metilasi

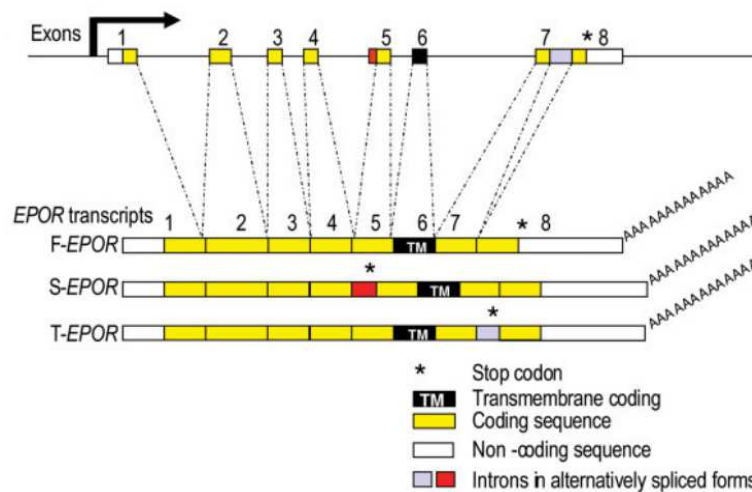
Methyl-CpG binding protein-1 (MeCP1) menekan aktivitas transkripsi pada sekuen CpG yang termetilasi dengan densitas yang tinggi (> 10 metil-CpG) (Boyes & Bird, 1992), sedangkan sekuen CpG yang termetilasi dengan densitas rendah akan menurunkan transkripsi dengan merekrut histon deasetilase pada kromatin melalui interaksi dengan *Methyl-CpG binding protein-2* (MeCP2). (Nan, dkk., 1998). Promotor minimal dari gen EPO pada manusia berada pada 117 bp dari site awal transkripsi (kurang lebih -240 bp dari site awal translasi). Promotor gen EPO kaya akan basa C dan G, serta sedikit mempunyai TATA box. GATA box berada pada 25 – 30 bp upstream dari site awal transkripsi yang merupakan sekuen untuk berikatan dengan TFIID/TBP dan diduga berikatan dengan member famili GATA. Enhancer dan promotor dari gen EPO keduanya berinteraksi dengan faktor transkripsi HIF-1 yang merupakan bentuk heterodimer dari HIF1- α dan ARNT (HIF1- β) (Imagawa, dkk., 1997)

2.4 Reseptor Eritropoietin (EPOR)

Reseptor eritropoietin (EPOR) termasuk dalam superfamili reseptor sitokin. Reseptor dalam kelompok ini memiliki ciri-ciri khusus, yaitu domain pengikat ligan ekstraseluler dengan dua pasang gugus sistein motif WSXWS, satu domain transmembran, dan domain intraseluler tanpa aktivitas katalitik (Brines, dkk., 2004). Protein EPOR tidak memiliki aktivitas tirosin kinase intrinsik untuk mengaktifasi jalur pensinyalannya. Reseptor akan mengalami dimerisasi saat berikatan dengan protein EPO sehingga akan mengaktifasi diferensiasi sel-sel eritroid. Domain sitoplasmik EPOR dapat dibagi menjadi dua bagian.

Sekitar separuh dari domain sitoplasmik yang berada dekat membran plasma, dibutuhkan untuk membangkitkan sinyal-sinyal transduksi untuk proliferasi dan diferensiasi, sedangkan separuh lainnya dibutuhkan untuk menghentikan sinyal transduksi (Maruyama, dkk., 1994).

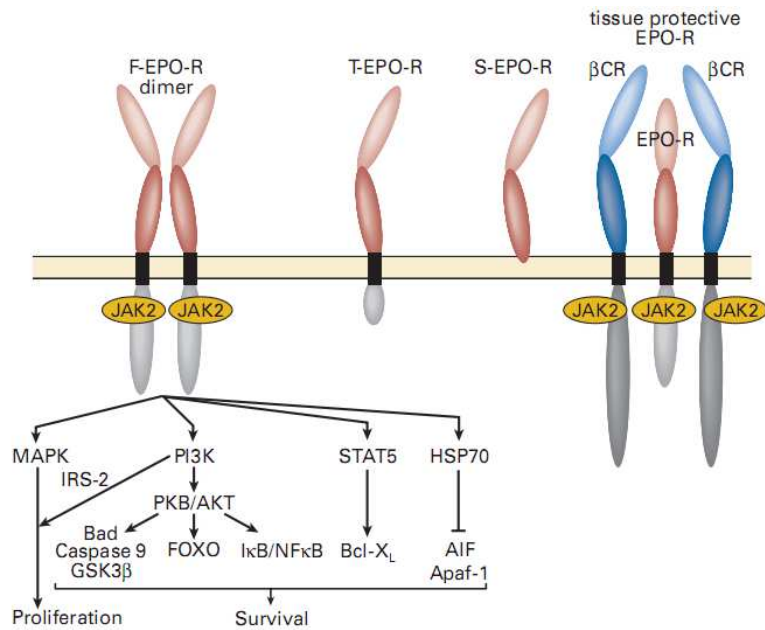
Gen EPOR kurang lebih mempunyai panjang 6 kb dan tersusun atas delapan ekson. Ekson 1-5 mengkode domain ekstraseluler, ekson 6 mengkode domain transmembran, dan ekson 7-8 mengkode domain sitoplasmik (Maouche, dkk., 1991). Protein EPOR dan mRNA EPOR telah diketahui terekspresi pada beberapa jaringan non-hematopoietik, seperti otak, ginjal, plasenta, sel endotel, makrofag, sel retina, sel adrenal korteks, dan pada beberapa jenis sel-sel kanker. Meskipun EPOR di transkripsi secara terus menerus (Wickrema, dkk., 1992), hipoksia dan anemia diduga dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi EPOR pada jaringan hematopoietik dan otak. Pada bagian 5' *flankin region* gen EPOR terdapat elemen regulator GATA1 dan SP1 (Zon dkk., 1991).



(Sinclair AM, dkk., 2007)

Gambar 4 Ilustrasi gen EPOR, stop kodon di tunjukkan dengan (*)

Protein EPOR pada manusia tersusun atas 508 asam amino dengan massa molekul kurang lebih 56kDa. Susunan asam amino pada EPOR antara lain yaitu: 24 asam amino merupakan signal peptide yang akan terpotong selama proses modifikasi, 225 asam amino menyusun domain sitoplasmik, 23 asam amino menyusun domain transmembran, dan 236 asam amino menyusun domain sitoplasmik. Pada domain ekstraseluler terdapat residu sistein yang terkonservasi dan motif “WSXWS” (Ihle dkk., 1998).



(Brandon dkk., 2009).

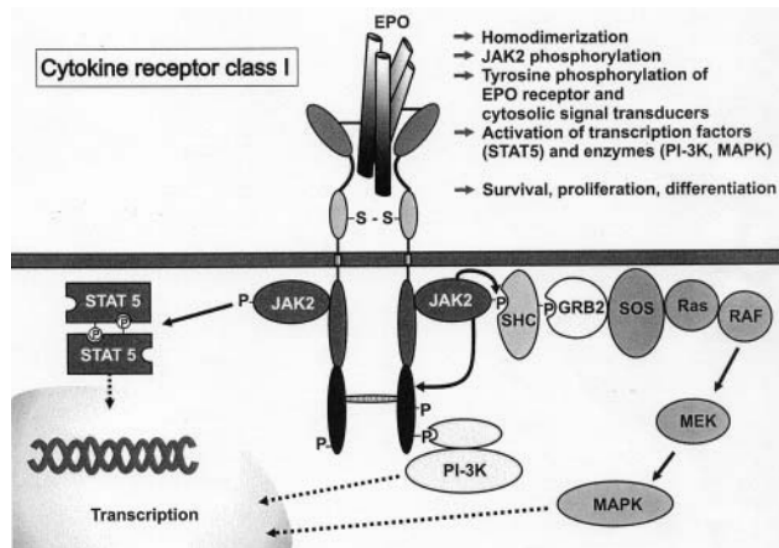
Gambar 5 Berbagai bentuk protein EPOR : EPOR fungsional (F-EPO-R), EPOR yang terpotong (T-EPO-R), EPOR yang disekresi (S-EPO-R)

Sebanyak 225 asam amino yang menyusun domain ekstraseluler EPOR terdiri atas dua domain menyerupai fibronektin tipe-III. Masing-masing domain mempunyai 7 untai beta, dan ketujuh untai tersebut terhubung dengan residu asam amino yang terlibat dalam pengikatan EPO. Studi dengan X-ray kristalografi untuk mempelajari interaksi antara EPO yang termutasi dengan domain ekstraseluler EPOR menunjukkan bahwa satu protein EPO berikatan dengan dua EPOR meskipun afinitas pengikatannya berbeda dibandingkan dengan afinitas ketika EPO normal yang berikatan dengan EPOR. Afinitas masing-masing *binding site* pada EPOR ketika berbentuk dimer dan ketika berada pada plasma membran hingga saat ini masih belum diketahui (Syed, dkk., 1998).

2.5 Sinyal transduksi EPO dengan EPOR

Kondisi hipoksia pada ginjal akan meningkatkan ekspresi EPO yang di stimulasi oleh protein HIF-1. EPO akan berikatan dengan EPOR dan ikatan antara EPO dengan EPOR ini menyebabkan terjadinya perubahan konformasi yang menyebabkan EPOR berasosiasi dengan molekul *Janus family protein kinase 2* (JAK2) yang menstimulasi autofosforilasi dan aktivasi JAK2. Selanjutnya, molekul JAK2 akan memfosforilasi delapan residu tirosin pada domain sitoplasmik EPOR, yang selanjutnya berfungsi sebagai *docking site* untuk berbagai protein signaling intraseluler. Salah satu protein tersebut adalah *signal transducer*

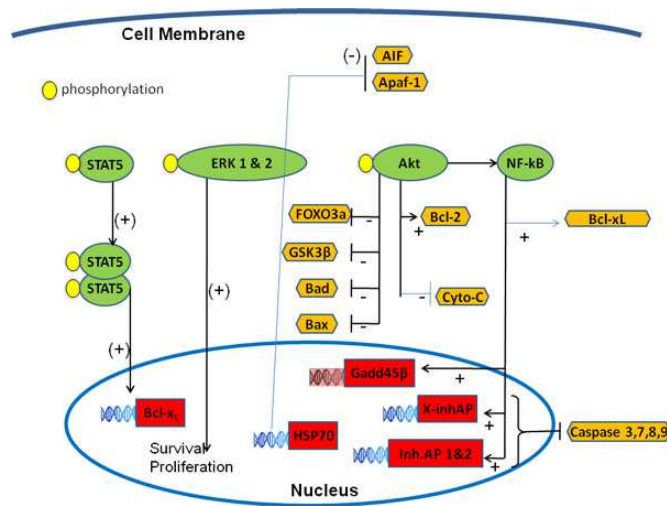
and activator of transcription (STAT5) yang di fosforilasi oleh protein JAK2 sehingga berdisosiasi dari EPOR, membentuk dimer, dan kemudian bertranslokasi menuju nukleus untuk mengaktifkan berbagai gen target (Silva dkk., 1999).



(Jelkmann, 2004)

Gambar 6 Persinyalan EPO dan EPOR

Aktivasi EPOR/JAK2 juga mengaktifkan beberapa protein intraseluler yang lainnya, termasuk Shc yang akan aktif dan mengaktifkan jalur signaling untuk proliferasi sel eritrosit, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang meningkatkan pertahanan hidup sel eritroid, serta phospholipase C- γ 1 yang berperan dalam proliferasi sel eritroid (Weiss, 2003). Aktivasi JAK2 juga mengaktifkan *heat shock protein* (Hsp) 70 yang kemudian mengikat dan meng-inaktifkan faktor-faktor proapoptotik seperti *apoptosis protease activating factor-1* (Apaf-1) dan *apoptosis-inducing factor* (AIF). Aktivasi jalur fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) menyebabkan fosforilasi protein kinase B (PKB atau AKT) yang memfosforilasi dan meng-inaktivasi regulator proapoptotik seperti Bad, caspase 9 dan GSK3 β . PKB/AKT juga memfosforilasi I κ B dan menyebabkan lepasnya *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan translokasinya ke nukleus di mana NF- κ B dapat memerantarai transkripsi gen-gen antiapoptotik. Selain itu, PKB/AKT juga memfosforilasi faktor transkripsi FOXO, menghambat translokasinya ke inti sel dan ligan Fas dan Bim yang pro apoptosis, dimana semua efek tersebut secara keseluruhan mengakibatkan peningkatan ketahanan hidup sel (Pajonk dkk., 2004)



(Moore, 2011)

Gambar 7 Jalur transduksi EPO-EPOR

2.6 Modelling dan Visualisasi Struktur Protein

Prediksi struktur protein bertujuan untuk meramalkan struktur tiga dimensi protein berdasarkan sekuen asam aminonya, dengan kata lain berusaha untuk meramalkan struktur tersier dan struktur sekunder berdasarkan struktur primer protein. Secara umum, metode prediksi struktur protein yang ada saat ini dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok, yaitu metode pemodelan protein komparatif dan metode pemodelan *de novo* (Krane & Raymer, 2003).

Pemodelan protein komparatif (*comparative protein modelling*) yaitu meramalkan struktur suatu protein berdasarkan atas struktur protein lain yang telah diketahui. Salah satu penerapan metode ini adalah *homology modelling*, yaitu prediksi struktur tersier protein berdasarkan atas kesamaan struktur primer protein. Pemodelan homologi didasarkan atas teori bahwa dua protein yang homolog memiliki struktur yang sangat mirip satu sama lain. (Marc, dkk., 2009). Pada metode ini struktur suatu protein yang disebut dengan protein target ditentukan berdasarkan atas struktur protein lain atau protein cetakan/templat (*template protein*) yang telah diketahui dan memiliki kemiripan sekuen dengan protein target. Templat yang digunakan dalam homologi modeling merupakan protein yang strukturnya telah diketahui dengan metode kristalografi sinar-X dan disimpan dalam Protein Data Bank (PDB). Ketika struktur protein dalam satu famili telah diketahui secara eksperimental, maka struktur untuk anggota famili protein yang lain dapat diketahui berdasarkan model dari penyejajaran struktur yang telah diketahui tersebut. Kondisi yang

dibutuhkan agar pemodelan berjalan dengan baik adalah (i) adanya persamaan antara sekuen target dan struktur *template*, dan (ii) penyejajaran yang signifikan antara kedua struktur tersebut (Mount, 2004).

Pemodelan komparatif secara umum terdiri atas lima tahapan yang berurutan. Tahapan awal adalah pencarian protein yang telah diketahui struktur tiga dimensinya yang berhubungan dengan sekuen target, biasanya pencarian dilakukan pada basis Protein Data Bank (PDB). Tahapan kedua yaitu memilih struktur yang akan dijadikan sebagai *template*. Ketiga, penyejajaran sekuen *template* dan sekuen target. Tahap keempat, pembuatan model berdasarkan informasi sekuen target yang telah disejajarkan dengan struktur *template*. Tahap kelima yaitu mengevaluasi model dengan kriteria tertentu (Hill, dkk., 2011)

Penerapan lain pemodelan komparatif ialah *protein threading* yang didasarkan atas kemiripan struktur tanpa kemiripan sekuens primer. Latar belakang *protein threading* ialah bahwa selama proses evolusi struktur protein lebih dikonservasi daripada sekuen proteinnya dimana daerah-daerah yang penting bagi fungsi protein dipertahankan strukturnya. Pada pendekatan ini, struktur yang paling kompatibel untuk suatu sekuen asam amino dipilih dari semua jenis struktur tiga dimensi protein yang ada. Metode-metode yang tergolong dalam *protein threading* berusaha menentukan tingkat kompatibilitas tersebut (Marc, dkk., 2009)

Struktur protein juga dapat ditentukan dari sekuens primernya tanpa membandingkan dengan struktur protein lain berdasarkan pendekatan *de novo* atau *ab initio*. Terdapat banyak kemungkinan dalam pendekatan ini, misalnya dengan menirukan proses pelipatan (*folding*) protein dari struktur primernya menjadi struktur tersiernya (misalnya dengan simulasi dinamika molekular), atau dengan optimisasi global fungsi energi protein. Prinsip dari metode ini didasari pada kenyataan bahwa protein akan mengalami *folding* pada sekuen tertentu yang sama, serta prinsip bahwa protein-protein yang berkerabatan secara evolusi dan memiliki sekuen asam amino yang serupa akan memiliki struktur yang serupa (Mount, 2004).

Visualisasi protein secara virtual dari file PDB dapat dilakukan dengan menggunakan program-program komputer. Selain melihat visualisasi, program-program tersebut juga dapat digunakan untuk menganalisis serta mengubah format PDB ke dalam format lainnya. Studi mengenai kompleksitas struktur makromolekul tidak terlepas dari peran program pemodelan dan visualisasi. Proses visualisasi merupakan salah satu cara untuk memahami lebih mendalam tentang dunia biologi molekuler. Saat ini telah banyak

software yang dikembangkan untuk keperluan visualisasi struktur ataupun untuk menganalisis hasil simulasi MD (*Molecular Dynamics*) suatu molekul (Murray, dkk., 2009).

2.7 Software Penunjang Analisis In silico

Pemahaman proses-proses biologi saat ini dapat dikaji dan diperdalam dengan studi secara bioinformatika. Pada bioinformatika, dipelajari penerapan teknik biokomputasi untuk mengelola dan menganalisis informasi biologis. Bidang ini mencakup penerapan metode-metode matematika, statistika dan informatika untuk memecahkan masalah-masalah biologis terutama yang terkait dengan sekuen DNA dan asam amino. Pendekatan secara bioinformatika akan memberikan nilai interpretasi lebih dari sekuen DNA maupun asam amino yang di dapatkan. Hasil yang diperoleh dapat berupa informasi mekanisme metabolisme maupun mekanisme evolusi (Murray, dkk., 2009). Penelitian secara *in silico* memiliki peran penting dalam menganalisis data genetik dan genom secara efektif dan efisien. Dapat juga dilakukan analisis dan identifikasi adanya mutasi genetik pada penyakit manusia serta desain obat yang berbasis informasi genetik (Kelsell, dkk., 2007; Feng dkk., 2010). Menurut Kelley (2009), kelebihan metode ini dapat digunakan untuk memprediksi pengaruh mutasi genetik pada struktur protein.

Metode *molecular docking* adalah metode yang digunakan untuk mengetahui fungsi dari suatu makromolekul. Tujuan docking antara ligan-reseptor yaitu untuk memprediksi banyaknya ikatan kimia antara ligan dengan reseptor dalam konformasi tiga dimensi serta mengetahui afinitas serta besarnya energi yang digunakan dalam pembentukan interaksi tersebut (Morris & Lim Wilby, 2008). Jumlah program *molecular viewer* dapat mengkonversi koordinat atom menjadi tampilan molekul. Program tersebut juga mungkin menghitung ulang informasi untuk menghilangkan ketidakkonsistenan di database atau untuk mensuplai informasi yang hilang. Kebutuhan program visualisasi bagi studi biologi molekular ataupun MD dapat dilihat dari berbagai aspek. Perangkat lunak visualisasi dibutuhkan untuk beberapa hal, diantaranya yaitu untuk memvisualisasi berbagai konformasi dari struktur tunggal atau hasil simulasi MD, visualisasi secara real-time, ataupun digunakan untuk menganalisis mekanisme molekuler seperti proses *folding* ataupun *docking*. Pymol merupakan perangkat lunak yang handal dan serbaguna untuk visualisasi grafis molekular. Program ini dikembangkan menggunakan bahasa pemrograman-C dan Python oleh Warren L. DeLano. Program visualisasi ini merupakan

program multiplatform yang dapat berjalan pada sistem operasi Unix/Linux, Windows, ataupun Mac-OS dan mudah digunakan karena tampilannya berbasis grafis atau GUI (*Graphical User Interface*). Berikut adalah beberapa software untuk analisis secara *in-silico*:

a. PatchDock

PatchDock merupakan web service yang memiliki algoritma untuk docking secara rigid body. Web server ini mampu menghitung transformasi 3D suatu molekul dengan molekul yang lain dengan tujuan untuk memaksimalkan bentuk komplementer permukaan dan meminimalisasi jumlah steric clashes (Duhovny, dkk., 2002).

b. LigandScout

LigandScout merupakan software untuk membuat model pharmacophore dari data struktur kompleks makromolekul dengan ligan atau dari pengujian molekul organik. Penggabungan definisi lengkap dari fitur kimia 3D yang digambarkan berinteraksi dengan ligan dan melingkupi sisi pengikatan pada makromolekul (Wolber, dkk., 2005).

c. Groningen Machine for Chemical Simulation (GROMACS)

Beberapa aplikasi yang dapat dilakukan dengan menggunakan GROMACS yaitu simulasi membran, simulasi protein membran, interaksi molekul dengan sinar X, simulasi pembentukan konformasi 3D protein (folding), mekanisme docking suatu ligan dengan molekul tertentu serta pengujian stabilitas suatu makromolekul (VanDer Spoel, dkk., 2005)

d. Yet Another Scientific Artificial Reality Application (YASARA)

YASARA merupakan software yang dapat digunakan untuk memodifikasi struktur dari suatu molekul (Kumar, dkk., 2012), seperti metilasi, hidrosilasi, glikosilasi, dan lain sebagainya. Software ini juga dapat digunakan untuk menentukan kondisi lingkungan kimia masing-masing atom dari suatu molekul (Krieger, dkk., 2002)

e. PyMOL

PyMOL sebagai program visualisasi grafis molekuler dapat digunakan untuk beberapa hal antara lain yaitu: untuk membaca basis data protein PDB (Protein Data Bank), menampilkan struktur 3D makromolekul dengan berbagai representasi bentuk, visualisasi hasil kristalografi, melakukan seleksi dan mengedit bagian tertentu pada molekul, menampilkan proses trajektori hasil simulasi MD, membuat file animasi, dan analisis molekuler lainnya seperti visualisasi warna b-factor, penyejajaran

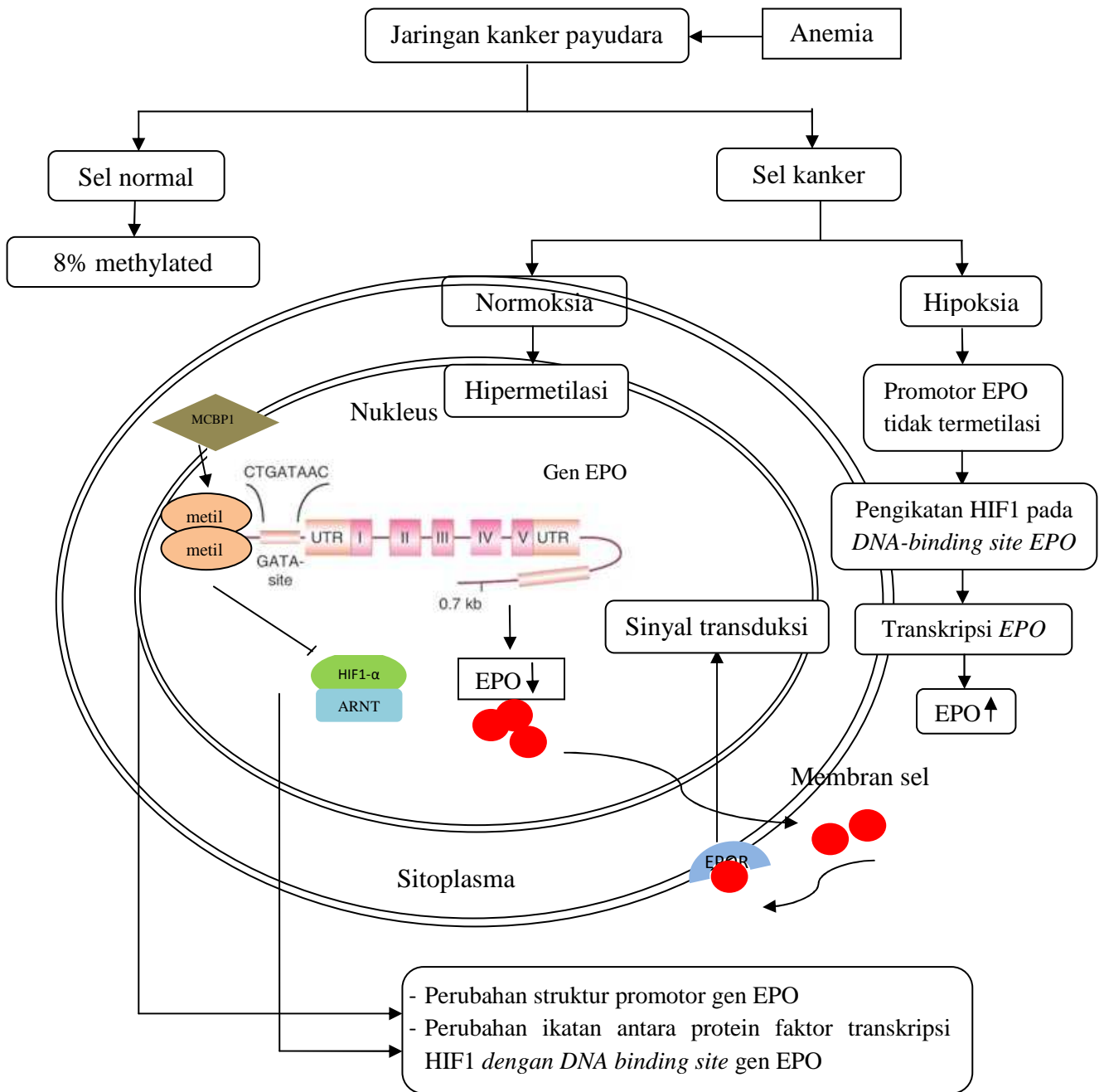
makromolekul, menghitung jumlah ikatan hidrogen, menampilkan sekuens protein dan kalkulasi struktur sekunder. Software ini dapat menggunakan bantuan script python untuk dapat menampilkan efek-efek tertentu (DeLano dan Sarina, 2004).

f. Hex 6.3

Hex 6.3 merupakan software yang digunakan untuk melakukan docking antara dua molekul. Software ini dilengkapi dengan algoritma FFT, yang berfungsi pada gerak bebas makromolekul dan mempercepat proses docking yang dilakukan. Disediakan fungsi energi minimalisasi dan refinement pada software ini untuk mendapatkan hasil energi interaksi yang lebih baik. Selain itu, program ini juga dapat digunakan untuk superimpose (Macindoe, dkk., 2010).

2.8 Kerangka Konseptual

Kanker payudara merupakan kanker nomor dua yang paling banyak menyerang wanita diseluruh dunia. Terapi pada pasien kanker serta ketidaksensitivitasan dari EPOR dalam menangkap EPO seringkali menyebabkan terjadinya anemia pada pasien kanker. Kondisi anemia ditambah dengan proses dari progresifitas tumor yang ditandai dengan pertumbuhan seluler yang sangat cepat diduga dapat menyebabkan perubahan lingkungan mikro tumor sehingga menyebabkan terjadinya kondisi hipoksia. Hipoksia merupakan kondisi dimana kurangnya suplai oksigen pada jaringan sehingga kadar oksigen pada jaringan sangat rendah. Pada kondisi hipoksia, sel-sel kanker akan mampu mentranskripsi beberapa gen yang terkait dengan pertahanan diri sel kanker melalui aktivasi dari protein HIF-1, salah satunya adalah EPO. Gen EPO pada kondisi non-hipoksia akan termetilasi pada bagian promotornya, akan tetapi pada kondisi hipoksi, promotor gen EPO tidak akan termetilasi. Metilasi gen EPO menyebabkan perubahan struktur dari gen EPO dan menyebabkan penurunan ekspresi protein EPO, akan tetapi penyebab terjadinya hal tersebut sampai sekarang masih belum diketahui secara pasti.



Gambar 8 Kerangka konseptual penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

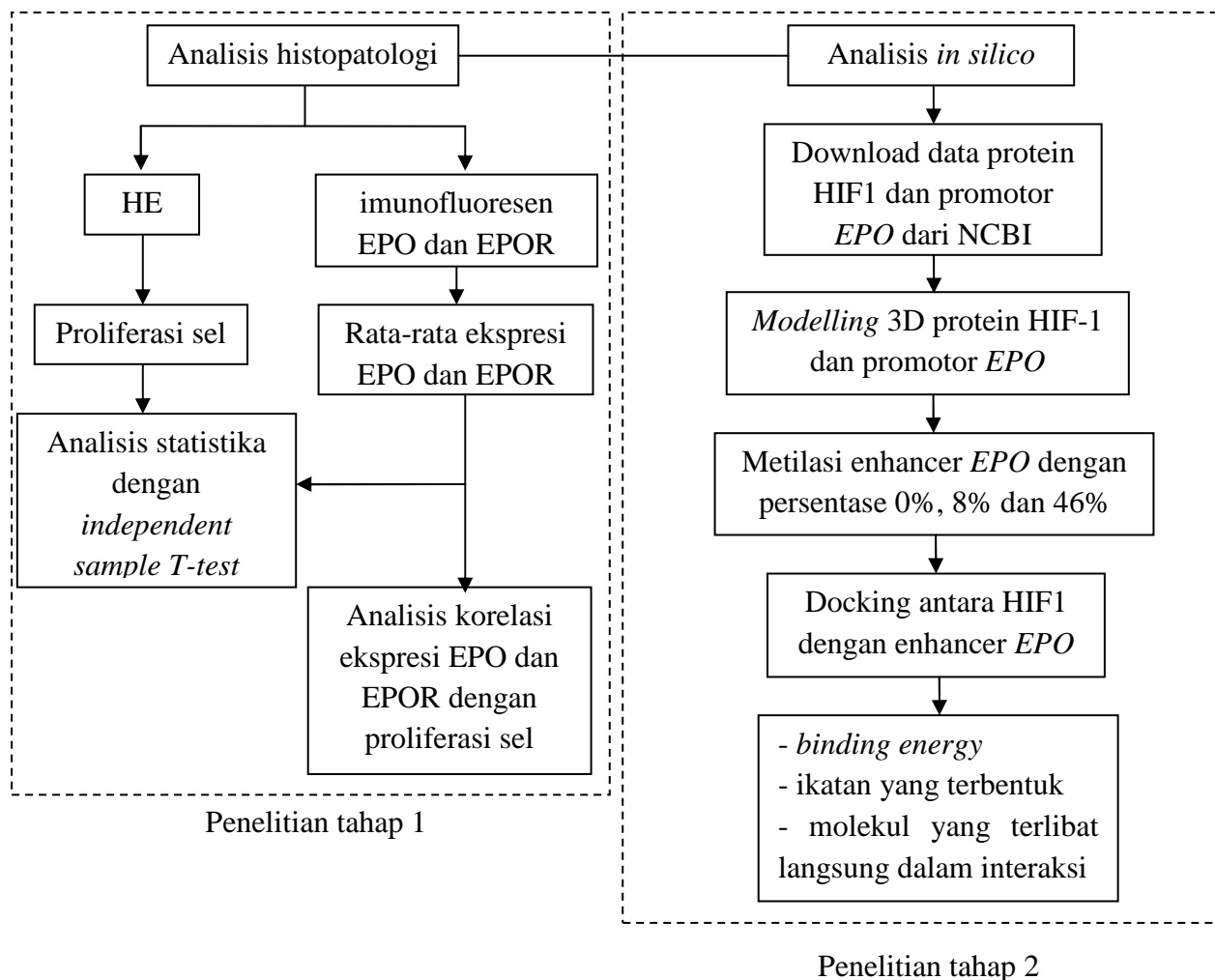
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan April - Juli 2013 di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan Laboratorium Bioinformatika dan Komputasi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Penelitian ini telah mendapatkan sertifikat kelaikan etik dari Komisi Etik Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya (No:157A/EC/KEPK-S3-JK/06/2011) pada tanggal 23 Juni 2011.

3.2 Kerangka Operasional

Penelitian dilakukan dalam dua tahap penelitian. Pada penelitian tahap I, diteliti hubungan antara anemia dengan hipoksia pada jaringan yang ditandai dengan ekspresi dari protein EPO. Penelitian dilakukan dengan melakukan pewarnaan imunofluoresen untuk mendeteksi ekspresi EPO dengan EPOR pada jaringan kanker payudara pasien anemia dan pada jaringan kanker payudara dari pasien non-anemia. Selanjutnya dilakukan analisis proliferasi sel dengan cara menghitung jumlah sel kanker pada jaringan kanker payudara. Selanjutnya di analisis hubungan antara proliferasi sel kanker dengan ekspresi EPO dan EPOR untuk mengetahui pengaruh EPO terhadap proses proliferasi sel-sel kanker secara *in vivo*.

Penelitian tahap II dilakukan dengan menganalisis pengaruh metilasi pada promotor gen EPO terhadap mekanisme *silencing* dari gen EPO tersebut secara *in-silico*. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana metilasi yang seringkali terjadi pada kondisi non-hipoksia dapat menyebabkan terjadinya *silencing* dari gen EPO tersebut. Berikut ini merupakan diagram kerangka operasional dari penelitian yang akan dilakukan:



Gambar 9 Kerangka operasional

3.3 Pewarnaan hematoksin-eosin (HE)

Langkah awal dari pewarnaan HE adalah irisan jaringan kanker pada gelas preparat direndam dalam xylol I selama 10 menit dan kemudian dalam xylol II selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dalam etanol absolut, 90% dan 70% masing masing selama 5 menit. Setelah itu slide dicuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian preparat direndam dalam pewarna hematoksin selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Kemudian diwarnai kembali dengan eosin selama 10 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan di dehidrasi kembali dengan etanol 70% dan 90% masing masing selama 2 menit dan dilanjutkan dengan etanol absolut selama 2 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya slide di rendam pada xylol 2 x 5 menit. Slide kemudian dikering anginkan dan ditetesi dengan

enthelan, lalu ditutup dengan coverglass dan diamati (Bancroft dan Marilyn (2002) dalam Firdausi, 2008).

Hasil pewarnaan HE selanjutnya di amati dengan menggunakan mikroskop BX-53 untuk menghitung jumlah sel kanker pada jaringan kanker payudara. Di ambil 3 bidang pandang untuk masing-masing slide preparat untuk kemudian di hitung sel kanker pada ketiga bidang pandang tersebut. Dari ketiga bidang pandang tersebut kemudian dihitung rata-rata jumlah sel kanker pada masing-masing sampel.

3.4 Analisis Imunofluoresen

Pewarnaan imunofluoresen dilakukan secara double staining terhadap protein EPO dengan EPOR. Slide preparat direndam dalam xylol 2 x 5 menit, kemudian direndam dalam etanol absolut selama 2 x 5 menit dan dilanjutkan dengan etanol 90% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam PBS 3 x 5 menit. Kemudian preparat dimasukkan dalam 10mM buffer sitrat (pH 6) dan dipanaskan dalam microwave pada *high temperature* selama 10 menit. Preparat dan wadah selanjutnya dikeluarkan dari microwave dan ditunggu beberapa saat. Setelah itu, preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit, lalu di *blocking* menggunakan 2% susu skim *overnight*. Slide preparat kemudian di cuci kembali dengan PBS 3 x 10 menit. Kemudian ditetesi dengan antibodi primer *anti-EPO rabbit IgG* (1:1000) dalam 2% susu skim di suhu ruang selama 1 jam. Setelah itu, preparat dicuci lagi dengan PBS 3 x 10 menit. Preparat lalu ditetesi dengan antibodi sekunder *Mouse-anti rabbit FITC labelled* (1:1500) selama satu jam dalam suhu ruang tanpa cahaya, kemudian di cuci dengan PBS 3 x 10 menit dan di *blocking* kembali dengan menggunakan 2% susu skim *overnight*. Slide preparat kemudian di cuci kembali dengan PBS 3 x 10 menit. Kemudian ditetesi dengan antibodi primer *anti-EPOR mouse IgG* (1:1500) dalam 2% susu skim di suhu ruang selama 1 jam. Setelah itu, preparat dicuci lagi dengan PBS 3 x 10 menit. Preparat lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder *Goat-anti mouse rhodamin labelled* (1:1500) selama satu jam dalam suhu ruang tanpa cahaya, kemudian di cuci dengan PBS 3 x 10 menit. Hasil pewarnaan imunofluoresen selanjutnya diamati dan dianalisis dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM; Olympus). Masing-masing sample diamati pada 3 bidang pandang sebagai ulangan, kemudian dianalisis rata-rata ekspresi EPO dan EPOR pada masing-masing sampel.

3.5 Analisis *in silico*

3.5.1 Modelling struktur 3D Protein dan nukleotida

Sekuen gen EPO (NG_021471) serta sekuen asam amino HIF-1 α (Q16665.1) dan HIF-1 β (P27540.1) diperoleh dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Selanjutnya dilakukan prediksi struktur 3 dimensi protein dengan metode *homology modelling* menggunakan web service *Swiss model*. Pemodelan homologi didasarkan atas teori bahwa dua protein yang homolog memiliki struktur yang sangat mirip satu sama lain. Pada metode ini struktur suatu protein yang disebut dengan protein target ditentukan berdasarkan atas struktur protein lain atau protein cetakan (*template protein*) yang telah diketahui dan memiliki kemiripan sekuen dengan protein target. Setelah itu dilakukan prediksi struktur 3D promotor *EPO* yang dilakukan dengan web server 3D-DART (3DNA-Driven DNA Analysis and Rebuilding Tool). Struktur 3D protein dan DNA yang terbentuk kemudian divisualisasi dengan menggunakan software *Pymol*.

3.5.2 Metilasi promotor *EPO*

Proses metilasi dilakukan dengan bantuan dari software YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application). Metilasi dilakukan pada basa nitrogen sitosis (C) pada promotor gen EPO (-61 sampai -45). Pilihan menu 'build' digunakan untuk memasukkan gugus metil pada basa nitrogen, dan pilihan menu 'adjust bond order' digunakan untuk mengoreksi ikatan yang terbentuk. Struktur DNA yang telah dimetilasi selanjutnya dilakukan minimalisasi energi dengan web server YASARA *energy minimization*.

3.5.3 Docking

Docking antara HIF-1 α dengan HIF-1 β dilakukan dengan menggunakan web server HADDOCK sehingga akan menghasilkan struktur HIF-1. Selanjutnya dilakukan docking antara protein HIF-1 dengan sekuen gen EPO menggunakan HADDOCK dan software Hex 6.3. Data sekuen gen EPO (*.pdb) dimasukkan ke dalam *Hex worksheet* diikuti dengan file HIF-1 (*.pdb). Struktur permukaan masing-masing protein dilakukan *setting* dalam kondisi *surface*. *Setting docking* yang dilakukan antara lain:

- a. Perbaikan hasil *docking (refinement)* dengan menggunakan *energy minimization* pada *post processing*
- b. Algoritma yang digunakan adalah *FFT (Fourier Fast Transform)* secara tiga dimensi

- c. Proses *docking scan* dilakukan pada bentuk topologi permukaan protein serta dan interaksi elektrostatik asam amino.
- d. Perputaran ligan dan reseptor di *setting* sebesar 180°

Data hasil *docking* yang diperoleh berupa energi ikatan antara keduanya. Hasil *docking* di simpan dalam bentuk *PDB file*. Visualisasi ikatan hidrogen dan pasangan asam amino yang terlibat dalam interaksi antara kedua protein dapat dilihat dengan bantuan software *NUCPLLOT* dan *LIGANDSCOUT*.

3.6 Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua kelompok sampel, yaitu sampel jaringan kanker payudara dari pasien anemia dan sampel jaringan kanker payudara dari pasien non-anemia. Untuk masing-masing kelompok, jumlah sampel yang digunakan adalah sebanyak 10 sampel, dan untuk masing-masing sampel akan dianalisis ekspresi protein EPO dan EPOR serta dianalisis tingkat proliferasi sel kanker dari sampel tersebut. Analisis data secara statistika dilakukan dengan menggunakan *independent sample T-test*. Data ekspresi EPO, EPOR, serta proliferasi sel akan dibandingkan antara sampel anemia dengan sampel non-anemia dengan melihat signifikansi dari dua kelompok tersebut. Selanjutnya dilakukan uji korelasi dan uji regresi antara masing-masing variabel yang diamati untuk melihat hubungan dan pengaruh dari suatu variabel terhadap variabel yang lainnya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Hubungan Antara Anemia Dengan Ekspresi EPO dan EPOR

Kelompok anemia merupakan sampel jaringan kanker payudara dari pasien dengan level Hemoglobin (Hb) rata-rata 8,76 g/dL, sedangkan level Hb rata-rata dari pasien non-anemia adalah 12,98 g/dL. Data sel darah yang meliputi jumlah leukosit, eritrosit, trombosit, dan hematokrit pada masing-masing kelompok secara lengkap dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1 Data sel darah dari pasien kanker payudara

Parameter	Anemia	Non-anemia
Hb (g/dL)	8,76 ± 1,89 (10)	12,98 ± 0,79 (10)
Leukosit (μL)	8,51 ± 3,63 x 10 ³ (10)	7,44 ± 2,11 x 10 ³ (8)
Eritrosit (μL)	4,16 ± 0,57 x 10 ⁶ (7)	4,76 ± 0,37 x 10 ⁶ (8)
Thrombosit (μL)	343,3 ± 168,25 x 10 ³ (10)	314,75 ± 62,94 x 10 ³ (8)
Hematokrit (vol%)	29,68 ± 4,9 (9)	38,76 ± 3,96 (8)

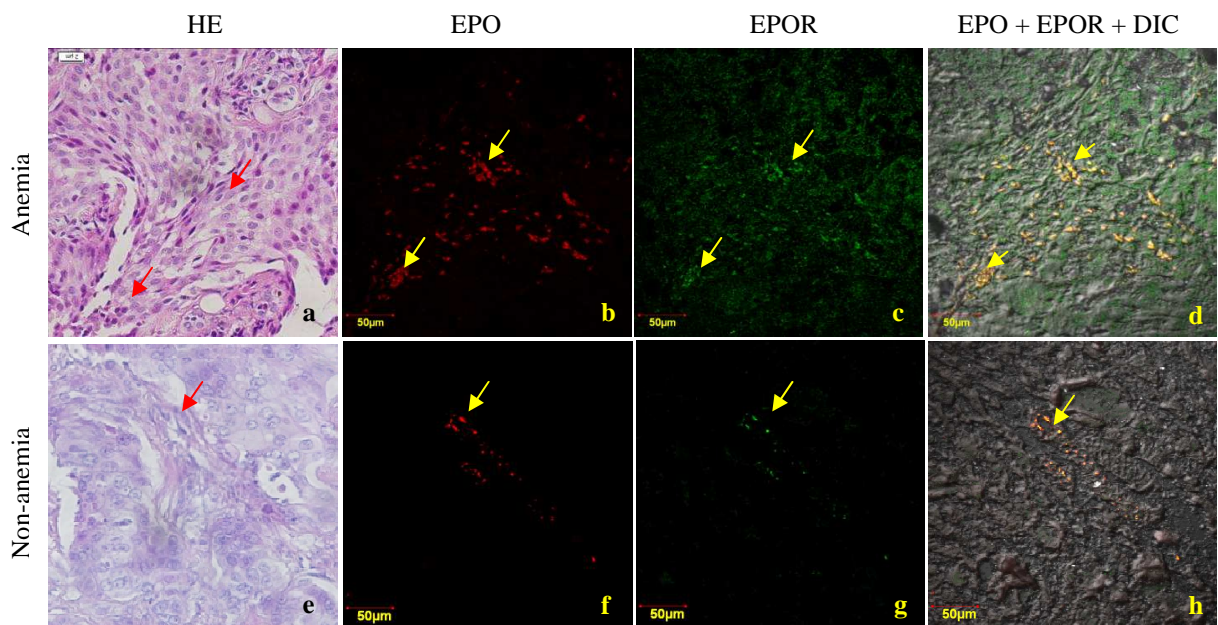
Sumber: Medical record dari pasien kanker payudara, (jumlah pasien)

Berdasarkan tabel di atas, terlihat bahwa level Hb, jumlah rata-rata sel darah merah (eritrosit) dan jumlah hematokrit pada kelompok anemia adalah lebih rendah dibandingkan pada kelompok non-anemia, sedangkan jumlah sel darah putih (leukosit) dan keping darah (trombosit) pada kelompok anemia lebih tinggi daripada kelompok non-anemia. Hemoglobin merupakan senyawa pembawa oksigen yang tersusun atas kompleks protein-pigmen yang mengandung zat besi. Kompleks tersebut berwarna merah dan terdapat di dalam eritrosit. Sebuah molekul hemoglobin memiliki empat gugus haeme yang mengandung besi fero dan empat rantai globin (Brooker, 2001). Pada data penelitian ini, jumlah eritrosit pada kelompok anemia lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah eritrosit pada kelompok non-anemia, sehingga level Hb kelompok anemia-pun lebih rendah dibandingkan dengan kelompok non-anemia.

Kondisi anemia diduga dapat menyebabkan perubahan mekanisme regulasi ekspresi EPO dan EPOR. Suatu penelitian yang dilakukan oleh Dunst dkk., (2003) menunjukkan bahwa terdapat suatu korelasi yang kuat antara penurunan level Hb dengan peningkatan angiogenesis yang diamati pada tumor yang mengalami hipoksia kronis dengan nilai pO₂ jaringan yang rendah. Hasil tersebut mendukung dugaan bahwa anemia berpengaruh terhadap kondisi hipoksia jaringan, dan hipoksia menyebabkan perubahan mekanisme

kontrol gen-gen yang terlibat dalam proses angiogenesis. Pada jaringan atau organ normal, suplai oksigen (O_2) dapat memenuhi kebutuhan sel. Namun pada tumor padat, laju konsumsi O_2 dapat melebihi suplai oksigen dan menimbulkan area-area dengan kadar O_2 yang sangat rendah (hipoksia) (Vaupel, P dkk., 2001). Pada kondisi non-hipoksia (normoksia), region promotor dan enhancer gen EPO mengalami hipermetilasi, sedangkan pada kondisi hipoksia tidak. Metilasi yang terjadi pada daerah promotor dan enhancer gen EPO diduga dapat menyebabkan perubahan aktivitas faktor transkripsi dari gen EPO, yaitu *hypoxia inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α) sehingga menyebabkan perbedaan jumlah ekspresi EPO pada kondisi hipoksia dan normoksia (Yin & Blanchard, 2000).

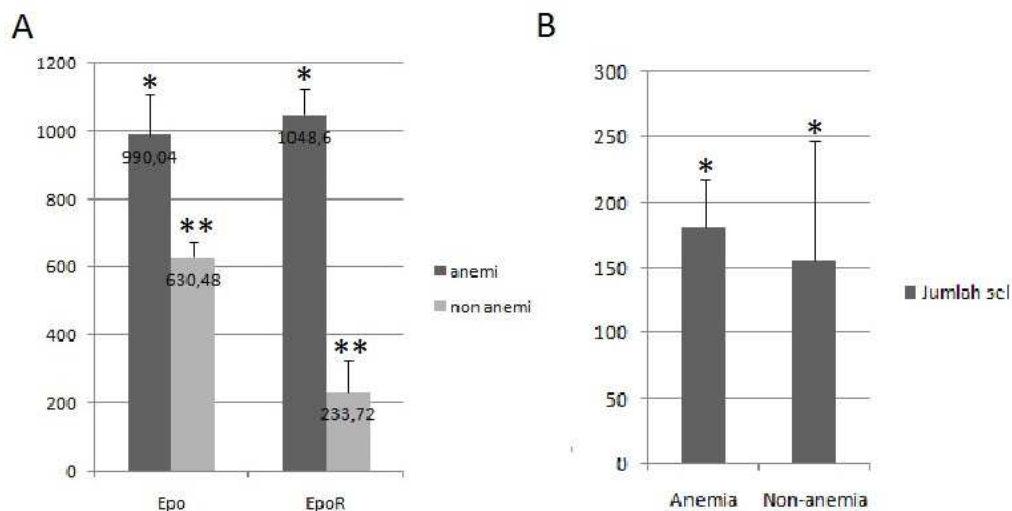
Analisis ekspresi EPO dan EPOR dilakukan dengan menggunakan analisis secara imunofluoresen *double-staining*. Hasil pewarnaan imunofluoresen tersebut dapat dilihat pada gambar sebagai berikut:



Gambar 10 Histopatologi jaringan kanker payudara pada kondisi anemia dan non anemia. Analisis profil histopatologi dengan menggunakan pewarnaan HE (a, e) menunjukkan bahwa sebagian besar sel-sel pada jaringan payudara telah berubah menjadi sel kanker, sedangkan analisis secara imunofluoresen (b-d, f-h) menunjukkan bahwa sel-sel yang mengekspresikan EPO (b, f) dan EPOR (c, g) adalah sel-sel kanker.

Pada kelompok anemia dan non-anemia, terlihat adanya ekspresi protein EPO dan EPOR dari hasil pewarnaan imunofluoresen jaringan kanker payudara (Gambar 10), akan tetapi ekspresi EPO dan EPOR terlihat lebih tinggi pada kelompok anemia daripada kelompok non-anemia. Ditemukan adanya pola ekspresi EPO dan EPOR yang berbeda antara kelompok anemia dengan kelompok non-anemia. Jaringan kanker payudara yang

diambil dari pasien anemia mempunyai ekspresi EPO yang lebih rendah daripada EPOR, sedangkan pada kelompok non-anemia ekspresi EPO lebih tinggi daripada EPOR. Berdasarkan hasil pengukuran ekspresi rata-rata EPO dan EPOR diketahui bahwa ekspresi EPOR pada kelompok anemia ($1048 \pm 99,72$) secara nyata lebih tinggi daripada kelompok non-anemia ($233,72 \pm 44,57$), begitupula dengan ekspresi EPO yang pada kelompok anemia ($990,04 \pm 119,35$) lebih tinggi daripada kelompok non-anemia ($630,46 \pm 77,17$). Tingginya ekspresi EPO dan EPOR pada kelompok anemia dibandingkan dengan kelompok non-anemia menimbulkan dugaan bahwa kondisi lingkungan mikro tumor pada kelompok anemia lebih hipoksia dibandingkan pada kelompok non-anemia. Pada tumor padat, respon adaptif terhadap hipoksia adalah berhubungan dengan angiogenesis, peningkatan agresivitas, penurunan apoptosis, dan menurunnya respon terhadap terapi (Dunst dkk., 2003).

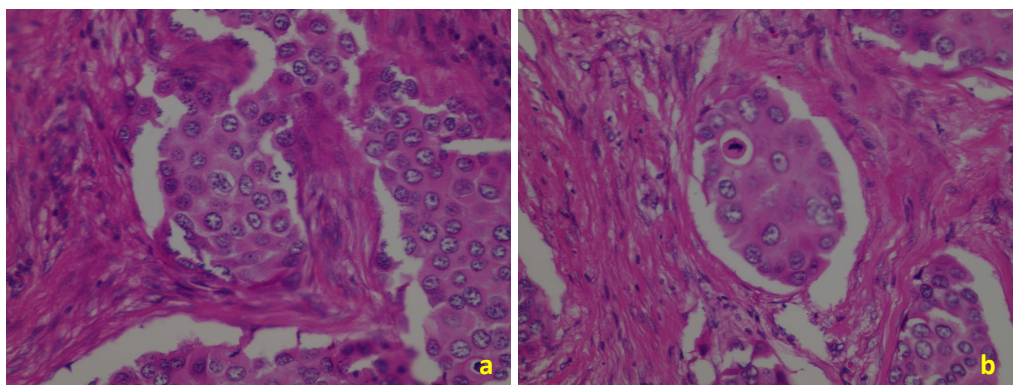


Gambar 11 Ekspresi EPO dan EPOR pada kelompok anemia dan non anemia (A) dan proliferasi sel kanker pada kelompok anemia dan non-anemia (B). **, berbeda secara signifikan pada Pvalue < 0.05.

Analisis secara statistika dengan *Independent sample T-test* menunjukkan bahwa ekspresi EPO dan EPOR secara signifikan lebih tinggi pada kelompok anemia dibandingkan kelompok non-anemia, sedangkan jumlah sel kanker tidak berbeda nyata antar masing-masing kelompok (Gambar 11). Adanya ekspresi EPO dan EPOR pada jaringan kanker payudara semakin memperkuat dugaan bahwa EPO berperan dalam mekanisme pertahanan diri dan perkembangan sel-sel kanker. Penelitian pada sel kanker berhubungan dengan kemampuan sel tersebut dalam mensintesis protein EPO meningkatkan dugaan bahwa ekspresi EPO pada penderita kanker akan menyebabkan

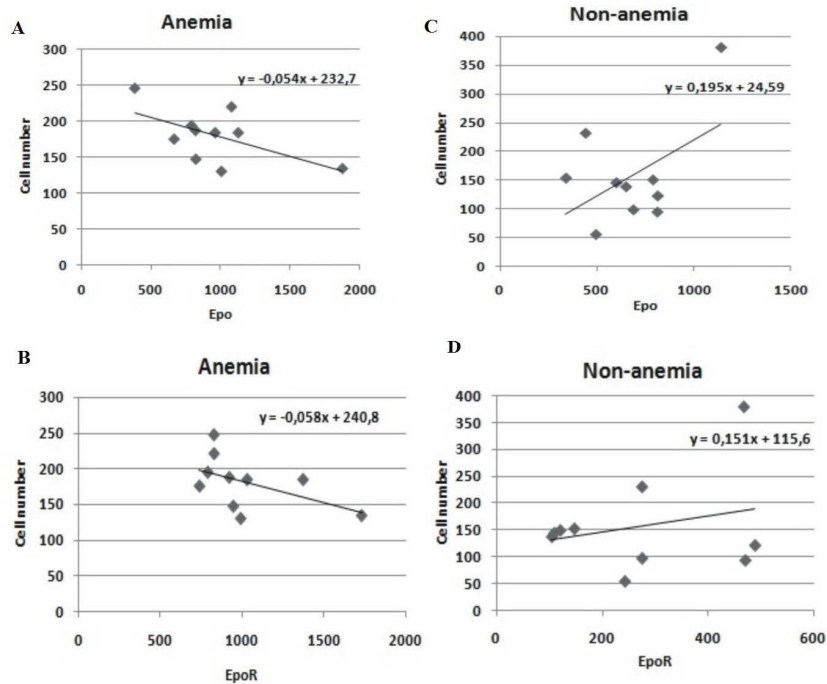
peningkatan proliferasi dan pertahanan diri sel-sel kanker serta menstimulasi terjadinya angiogenesis sehingga menyebabkan pertumbuhan sel-sel kanker (Farrel, 2004).

Pertumbuhan sel kanker ditandai dengan tingginya laju proliferasi dari sel tersebut. EPO bekerja melalui ikatan dengan reseptor eritropoietin (EPOR). Aktivasi EPOR/JAK2 juga mengaktifasi beberapa protein intraseluler yang lainnya, termasuk Shc dan phospholipase C- γ 1 yang akan aktif dan mengaktifkan jalur signaling untuk proliferasi sel, serta phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang meningkatkan pertahanan hidup sel (Weiss, 2003). Hasil perhitungan sel kanker pada kelompok anemia adalah lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok non-anemia meskipun tidak mempunyai perbedaan yang signifikan. Diduga hal tersebut dikarenakan pada masing-masing kelompok terdapat ekspresi EPO, sehingga pada masing-masing kelompok tingkat proliferasi sel kanker adalah sama.



Gambar 12 Contoh hasil pewarnaan HE yang digunakan untuk menghitung jumlah sel kanker pada jaringan kanker payudara pada kelompok anemia (a) dan non anemia (b).

Analisis hubungan antara ekspresi EPO dan EPOR menunjukkan bahwa pada kelompok anemia, EPO mempunyai korelasi dengan EPOR pada tingkat kepercayaan 99%. Analisis regresi menunjukkan bahwa pada kelompok anemia, terdapat hubungan negatif antara proliferasi sel kanker dengan ekspresi EPO dan EPOR. Ketika ekspresi EPO dan EPOR rendah maka jumlah sel kanker akan meningkat, dan begitu pula sebaliknya yaitu ketika ekspresi EPO dan EPOR tinggi maka jumlah sel kanker akan menurun. Berkebalikan dengan kelompok anemia, ekspresi EPO dan EPOR pada kelompok non-anemia ditemukan mempunyai hubungan positif dengan proliferasi sel. Tingginya ekspresi EPO dan EPOR akan diikuti dengan peningkatan jumlah sel kanker, sedangkan rendahnya ekspresi EPO dan EPOR akan menyebabkan penurunan jumlah sel kanker (Gambar 13).



Gambar 13 Analisis regresi antara jumlah sel kanker dengan ekspresi EPO dan EPOR pada kelompok anemia (A, B) dan kelompok non-anemia (C, D).

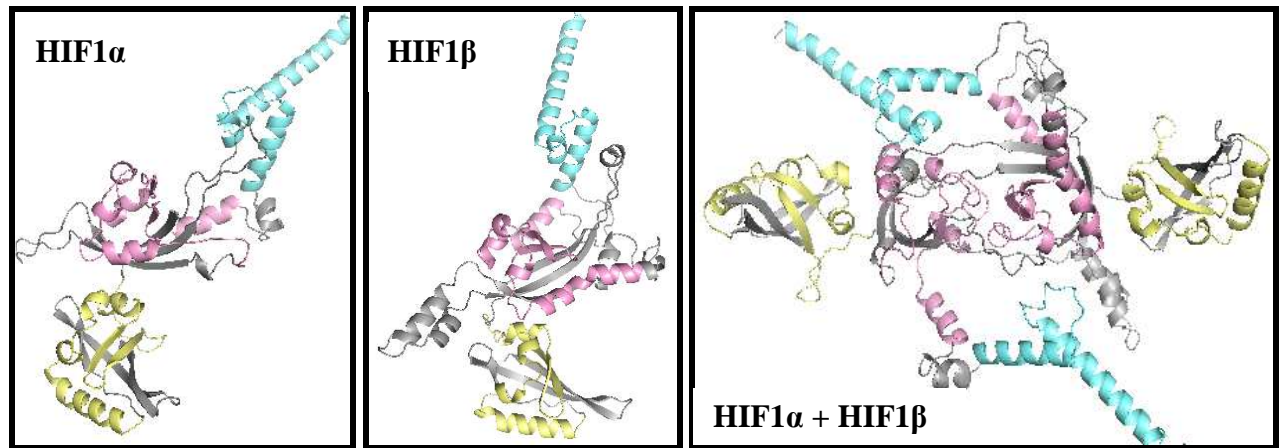
Hasil uji regresi yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel kanker pada kelompok anemia ketika ekspresi EPO dan EPOR tinggi menimbulkan dugaan bahwa terapi pasien kanker payudara dengan menggunakan *erythropoietin stimulating agent* (ESA) tidak menyebabkan peningkatan progresivitas sel kanker, sedangkan pada kelompok non-anemia, terapi ESA diduga dapat menyebabkan peningkatan progresivitas sel-sel kanker karena dapat menyebabkan peningkatan jumlah sel kanker. Diharapkan hasil dari penelitian ini dapat mendukung penelitian yang dilakukan oleh *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) pada tahun 2011 yang melaporkan bahwa terjadi penurunan pertahanan hidup pasien kanker dengan level Hb di atas 12 g/dL ketika mendapatkan terapi ESA, sedangkan ketika terapi ESA diberikan pada pasien kanker dengan level Hb kurang dari 12 g/dL, maka terapi tersebut tidak akan menyebabkan penurunan pertahanan hidup pasien kanker (Bennett dkk., 2008).

4.2 Analisis Pengaruh Metilasi Terhadap Regulasi Transkripsi Gen EPO

4.2.1 Pemodelan protein HIF-1 dan enhancer gen EPO

Pemodelan molekul protein dan DNA berperan sangat penting dalam studi untuk melihat interaksi antar molekul. Penelitian ini dilakukan dengan memodelkan protein HIF-1 yang merupakan faktor transkripsi dari gen EPO dan *binding site* dari HIF1 yang terletak

pada region enhancer gen EPO. Model protein HIF1 yang tersusun atas sub-unit α (826 asam amino) dan β (789 asam amino) didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB). Model yang didapatkan merupakan hasil *homology modelling* dengan menggunakan webserver SWISS-MODEL dan Ps2. Berikut ini merupakan struktur protein HIF1:

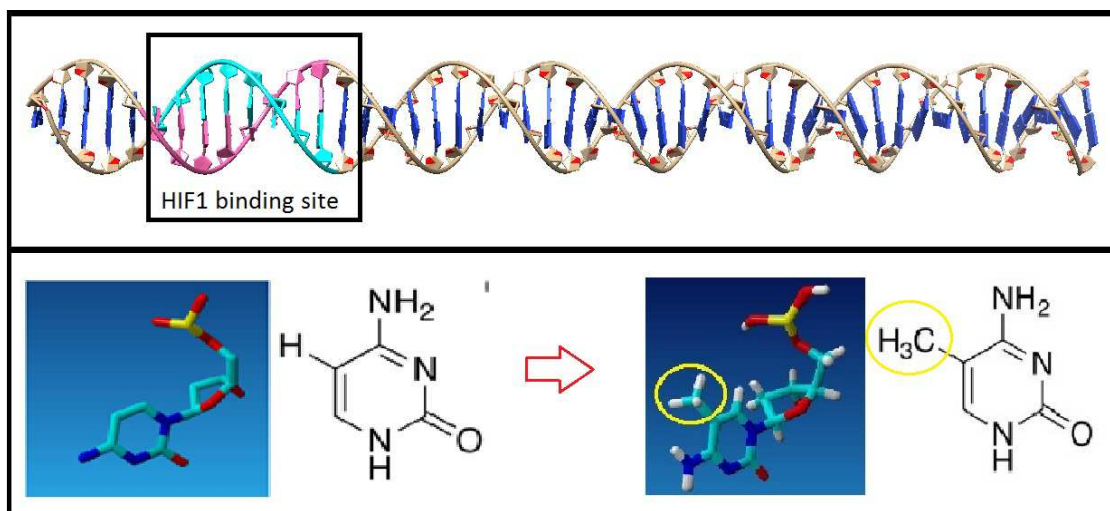


Ket: ■ = Basic helix-loop-helix (bHLH) domain
■ = PAS 1 domain
■ = PAS 2 domain

Gambar 14 Struktur 3D protein HIF1 subunit α dan β

Model protein HIF1 di atas digunakan karena mempunyai panjang sekuen yang lengkap meliputi *basic helix loop helix* (bHLH) domain, domain PAS1 dan domain PAS2. Model protein HIF1 merupakan hasil *homology modelling*, sehingga perlu dilakukan validasi terlebih dahulu untuk mengetahui kesesuaian model dengan kondisi struktur protein yang stabil. Proses validasi model protein HIF1 menggunakan RAMPAGE web server untuk menganalisis penyebaran sudut psi (ϕ) dan phi (ψ) sebagaimana analisis *stereochemical* dan kalkulasi struktur sekunder (Lovell dkk., 2002). Berdasarkan hasil validasi protein diketahui bahwa nilai residu pada *most favoured region* HIF1 α dan HIF1 β berturut-turut adalah 94.2% dan 93.9%, yang mana nilai tersebut dapat menunjukkan indikator kualitas *stereochemical* yang bagus dari struktur protein dan dapat dikatakan memiliki konformasi yang stabil. Jumlah kombinasi sudut psi (ϕ) dan phi (ψ) dapat digunakan untuk menentukan kemungkinan konformasi protein bahkan pada suatu polipeptida yang relatif kecil. Meskipun secara teoritis sudut psi (ϕ) dan phi (ψ) memiliki kebebasan rotasi 360° , nilainya sangat dibatasi oleh halangan sterik dari atom-atom rantai samping sehingga menyebabkan terbatasnya jumlah konfigurasi yang mungkin diambil oleh segmen-segmen rantai polipeptida (Murray, dkk., 2009; Rachmayati, dkk., 2010).

Pemodelan struktur 3D sekuen enhancer gen EPO dilakukan dengan 3D-DART webserver. Hasil pemodelan tersebut selanjutnya dimetilasi dengan menambahkan gugus metil (CH₃) pada atom hidrogen ke-5 (H5) dari basa sitosin (C). Metilasi DNA terjadi pada sekuen sitosin-guanin (CpG) pada strand DNA. Sebanyak 60% gen yang ada pada mamalia mempunyai CpG island yang terletak pada region 5' UTR (Cross & Bird, 1995). Pada sel payudara normal, metilasi terjadi sebanyak 8%, pada sel kanker non-hipoksia adalah sebanyak 46%, dan pada sel yang hipoksia tidak terjadi metilasi (Steinmann dkk, 2011; Yin & Blanchard, 2000). Proses metilasi dilakukan dengan menggunakan software YASARA dengan posisi penambahan gugus metil sebagai berikut:



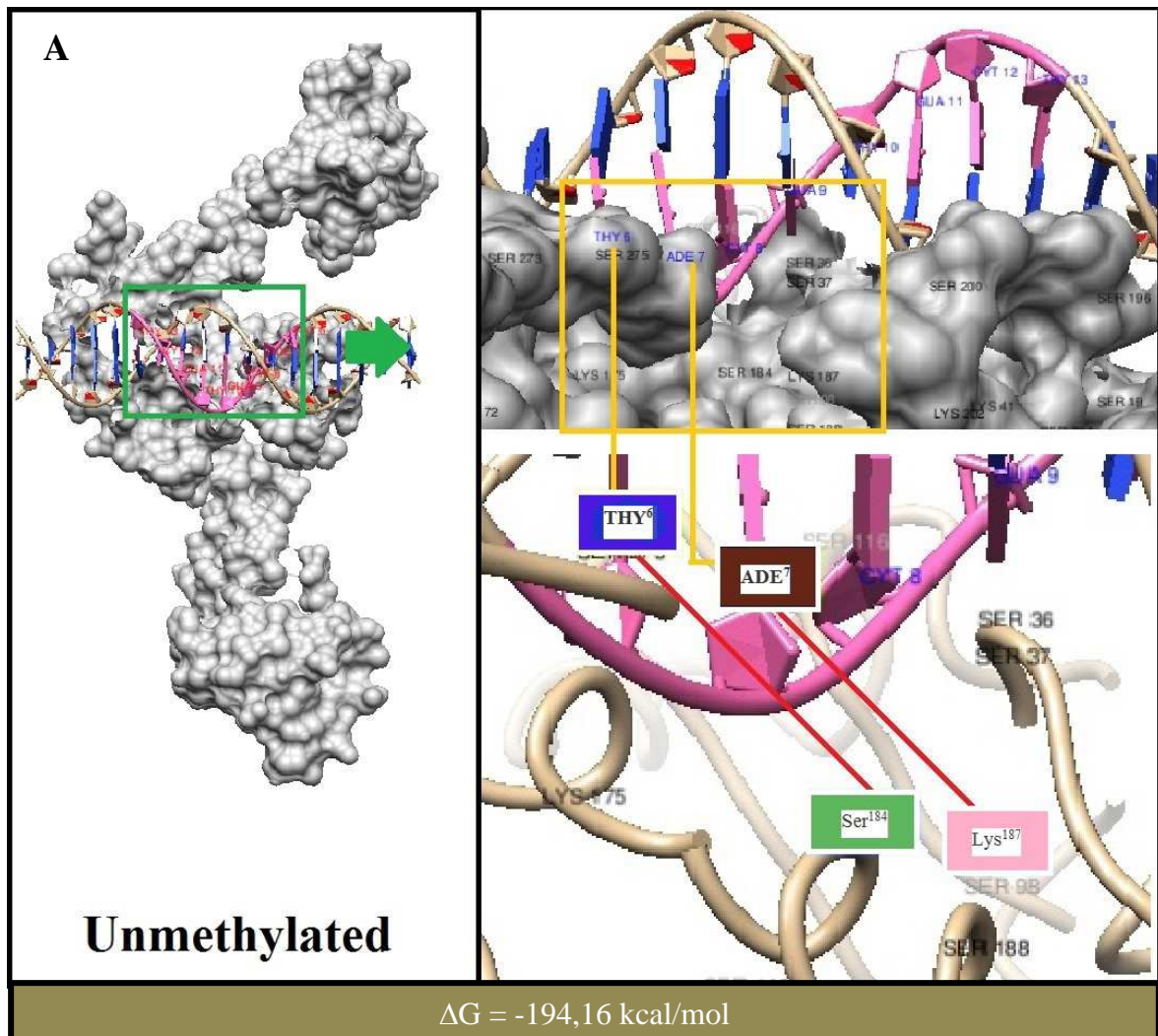
Gambar 15 Penambahan gugus metil pada gugus hidrogen-5 (H5).

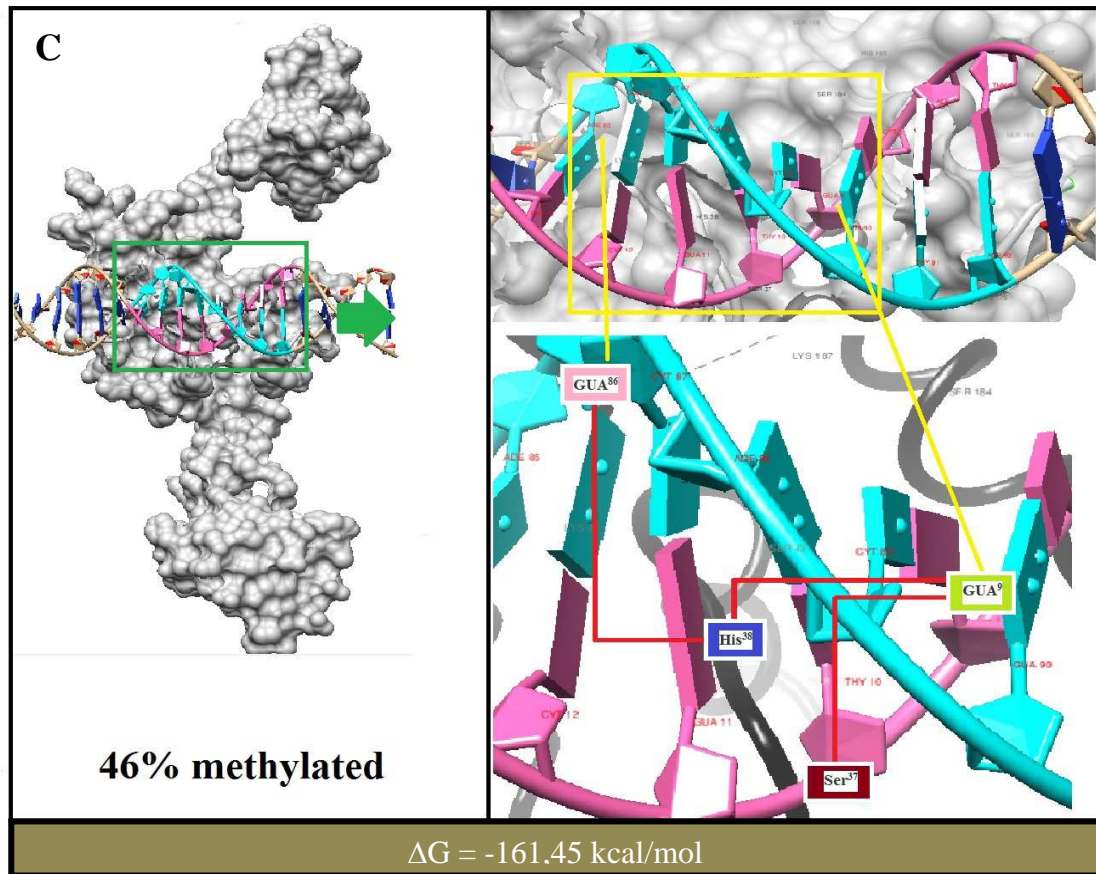
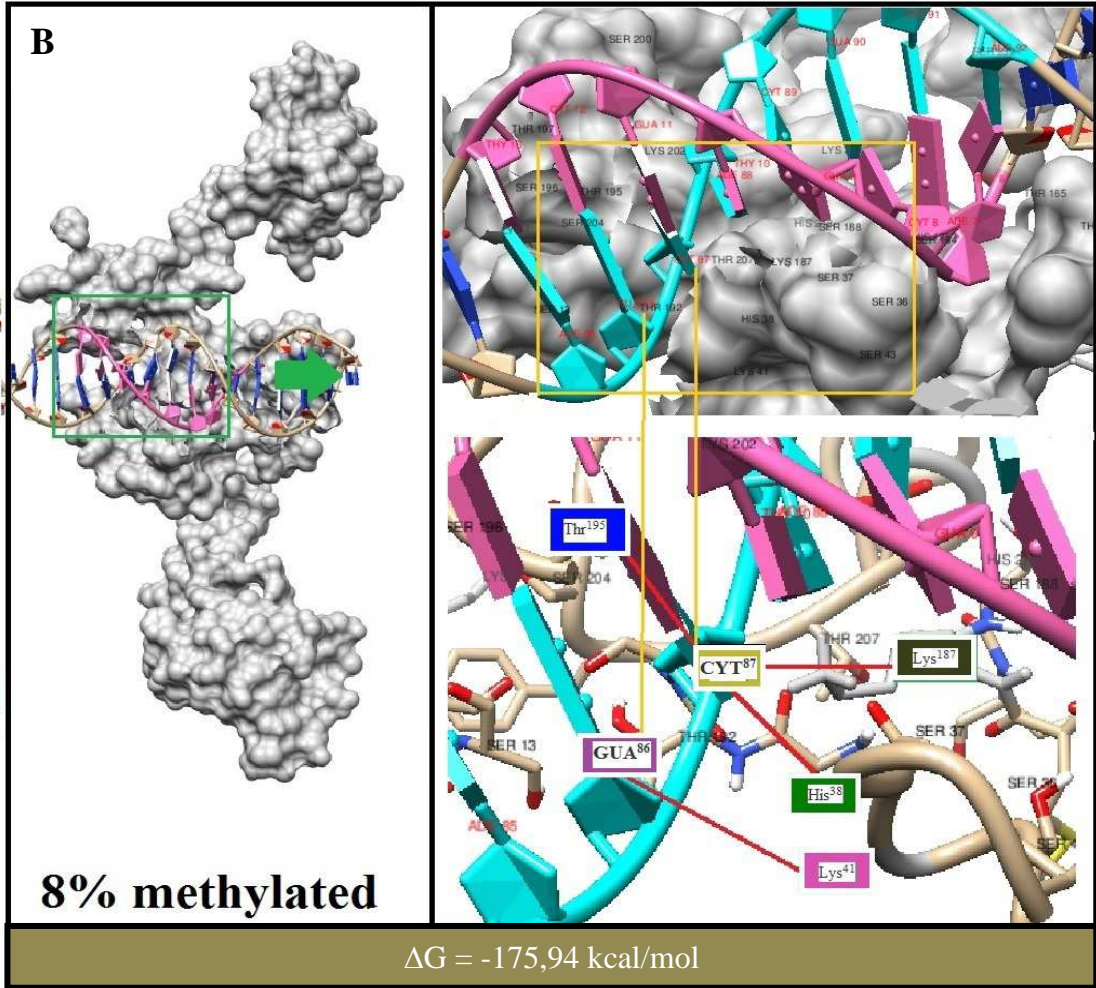
Proses metilasi daerah enhancer gen EPO sebelumnya telah dilakukan oleh Steinmann, dkk., (2011) secara *in vitro* dengan menggunakan sel normal dan berbagai jenis sel kanker, salah satunya adalah sel kanker payudara (ZR751, T47D dan MDAMB231). Pada hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa metilasi berpengaruh sangat penting terhadap jumlah protein EPO yang diekspresikan. Ketika sel mengalami hipermetilasi maka EPO yang diekspresikan akan sangat rendah, akan tetapi pada penelitian tersebut tidak diteliti lebih jauh pengaruh metilasi terhadap aktivitas HIF1 yang merupakan faktor transkripsi gen EPO yang berperan penting dalam regulasi transkripsi gen EPO.

4.2.2 Molecular docking protein HIF1 dengan sekuen enhancer gen EPO

Interaksi antara protein HIF1 dengan region enhancer gen EPO baik yang tidak termetilasi maupun yang termetilasi sangat penting untuk dipelajari karena merupakan

salah satu faktor kunci dari regulasi proses transkripsi gen EPO. Diduga metilasi dapat menekan ekspresi protein EPO melalui dua mekanisme, yaitu dengan merekrut protein methyl-CpG binding protein pada region promotor gen EPO atau dengan menghambat ikatan antara enhancer dengan faktor transkripsi (HIF1). Oleh karena itu, analisis interaksi protein HIF1 dengan region enhancer gen EPO yang telah termetilasi dengan persentase yang berbeda-beda dilakukan *secara molecular docking* untuk mengetahui interaksi antara keduanya, serta mengetahui energi pengikatan yang dibutuhkan untuk terjadinya proses interaksi tersebut. Hasil *molecular docking* dengan menggunakan HADDOCK web server dan software HEX 6.12 membentuk suatu kompleks protein-DNA berdasarkan *global energy*. Dilakukan tiga kali proses docking antara HIF1 dengan enhancer gen EPO yang telah dimetilasi dengan persentase masing-masing 0%, 8%, dan 46%. Hasil docking tersebut selanjutnya divisualisasi sehingga mendapatkan hasil sebagai berikut:





Gambar 16 Hasil *molecular docking* antara HIF1 dengan region enhancer gen EPO; A, enhancer yang tidak termetilasi; B, enhancer termetilasi 8%; C, enhancer termetilasi 46%. Energi pengikatan yang dibutuhkan untuk masing-masing interaksi berturut-turut adalah 194,16 kcal/mol; -175,94 kcal/mol; 161,45 kcal/mol.

Pada semua hasil *molecular docking* yang didapatkan, diketahui bahwa HIF1 berinteraksi langsung dengan sekuen *binding site*-nya, yaitu pada urutan sekuen TACGTGCT pada region enhancer gen EPO. Hasil *molecular docking* yang lain meliputi energi Van der Waals dan energi elektrostatis dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2 Hasil docking HIF1 dengan enhancer gen EPO

Parameter	Unmethylated	8% methylated	46% methylated
HADDOCK score	-57.8 +/- 7.4	-61.0 +/- 7.1	-55.1 +/- 7.7
RMSD (Å)	8.5 +/- 0.1	4.2 +/- 0.5	4.2 +/- 0.2
Van der Waals energy (kcal/mol)	-51.8 +/- 3.2	-52.1 +/- 5.8	-53.9 +/- 12.8
Electrostatic energy (kJ/mol)	-375.8 +/- 52.4	-357.1 +/- 48.0	-339.1 +/- 24.3
Desolvation energy	46.3 +/- 11.0	45.3 +/- 9.8	42.9 +/- 4.4
Restraints violation energy	228.7 +/- 50.62	172.7 +/- 34.44	237 +/- 26.16

Berdasarkan tabel di atas, terlihat bahwa energi pengikatan paling besar yang dibutuhkan untuk proses interaksi antara HIF1 dengan enhancer adalah pada persentase metilasi 46% (-161,45 kcal/mol). Tingginya energi pengikatan yang dibutuhkan untuk proses interaksi tersebut diduga menyebabkan sulitnya terjadi ikatan antara HIF1 dengan *binding site*-nya, serta jika berhasil terjadi suatu interaksi maka interaksi tersebut tidak stabil. Berkebalikan dengan enhancer yang termetilasi sebanyak 46%, energi pengikatan yang dibutuhkan untuk interaksi enhancer yang tidak termetilasi sama sekali (0%) adalah yang paling kecil dibandingkan dengan yang lainnya (-194.16 kcal/mol), dimana semakin rendah energi yang dibutuhkan untuk suatu interaksi maka interaksi yang terbentuk akan semakin kuat dan stabil. Rendahnya energi yang dibutuhkan dalam proses interaksi pada sekuen DNA yang tidak termetilasi menimbulkan dugaan bahwa HIF1 akan terikat dengan kuat pada region enhancer gen EPO, sehingga akan menstimulasi transkripsi dari gen EPO tersebut. Energi pengikatan merupakan energi bebas (ΔG) yang penting dalam perhitungan nilai konstanta kecepatan reaksi dan merupakan parameter kekuatan afinitas pengikatan ligan terhadap reseptor. Semakin rendah harga ΔG , ikatan antara dua molekul akan semakin stabil (Pebriana, dkk., 2008). Interaksi antar molekul bisa terjadi karena adanya komplementari bentuk, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan interaksi elektrostatis yang terjadi antara senyawa penyusun masing-masing molekul (Andrea, 2010).

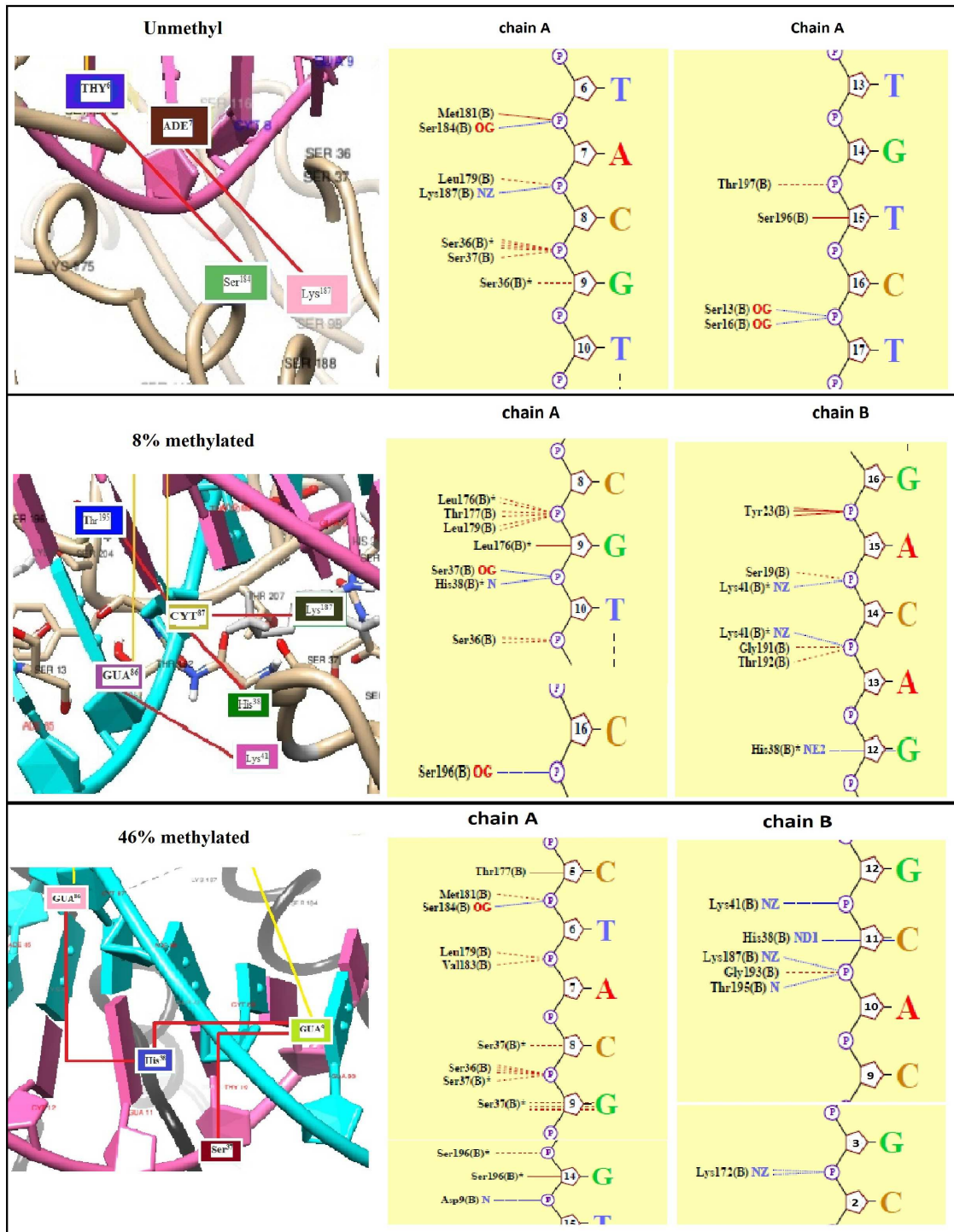
Hasil penelitian ini diharapkan akan mendukung hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Steinmann dkk., (2011), yang mana pada kondisi hipoksia sel akan mengekspresikan EPO dengan sebanyak 25 kali lipat dibandingkan dengan jumlah EPO yang diproduksi oleh sel normal dan sel kanker normoksia. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa kultur sel yang pada awalnya hanya memproduksi EPO pada jumlah yang sangat kecil pada kondisi normoksia, akan mengalami peningkatan produksi EPO hingga sebanyak 100 kali lipat setelah mendapatkan perlakuan dengan hipoksia atau kobalt (Goldberg, dkk., 1991). Kondisi hipoksia dengan metilasi pada region regulator gen EPO memang sangat berkaitan antara satu dengan yang lainnya. Pada kondisi hipoksia, region regulator gen EPO tidak termetilasi, sedangkan pada kondisi normoksia, region regulator tersebut akan mengalami hipermetilasi (Yin & Blanchard, 2000). Persentase metilasi pada masing-masing kondisi sel diduga kuat turut berperan dalam regulasi proses transkripsi gen EPO. Metilasi pada DNA diketahui mempunyai efek lokal terhadap proses transkripsi (Irvine dkk., 2002).

4.2.3 Analisis interaksi protein *Hypoxia Inducible Factor-1* dengan sekuen enhancer gen EPO

Interaksi antar molekul dapat memberikan informasi yang penting tentang fungsional suatu molekul. Kompleks HIF1 dengan enhancer gen EPO berperan sangat penting dalam proses regulasi transkripsi dari gen EPO. Berdasarkan hasil analisis interaksi dengan menggunakan software NUCPLOT, terlihat bahwa lokasi *binding site* untuk HIF1 pada masing-masing persentase metilasi adalah sama, akan tetapi molekul-molekul yang terlibat interaksi secara langsung berbeda-beda. Hasil analisis interaksi dapat dilihat pada tabel dilihat berikut:

Tabel 3 Molekul yang terlibat langsung dalam proses interaksi

Unmethylated	8% methylated	46% methylated
THY6 → Ser184	CYT5 → Ser184	GUA9 → Ser37, His38
ADE7 → Lys187	CYT11 → Lys41, Lys187, Thr195	GUA12 → His38
CYT16 → Ser13, Ser16	GUA12 → Lys41	CYT14 → Lys41
	GUA14 → Asp9	ADE15 → Lys41
		CYT16 → Ser196



Gambar 17 Interaksi antara HIF1 dengan enhancer gen EPO

Beberapa asam amino dan basa nitrogen yang terlibat interaksi langsung di atas dihubungkan oleh adanya ikatan hidrogen dan ikatan elektrostatis dengan jumlah yang berbeda-beda, sehingga energi total yang dibutuhkan dalam proses interaksi-pun tidak sama. Menurut Ngili (2009), residu asam amino bermuatan dapat membentuk interaksi

elektrostatik dengan membentuk jembatan garam, dengan beberapa derajat ikatan hidrogen yang memperkuat tarikan elektrostatik tersebut. Energi elektrostatik adalah energi yang dibutuhkan untuk membentuk interaksi elektrostatik antar molekul. Interaksi elektrostatik antara gugus-gugus bermuatan membantu membentuk struktur biomolekul tapi tidak berperan besar terhadap stabilitas protein. Interaksi yang berperan penting dalam pembentukan struktur protein karena interaksi hidrofobik antar rantai-rantai samping nonpolar dari residu asam amino merupakan alasan utama protein melipat dan berinteraksi membentuk struktur tertentu (Murray, dkk., 2009).

Hasil dari penelitian ini memperkuat dugaan bahwa metilasi mempunyai peran yang sangat penting dalam regulasi proses transkripsi gen EPO. Pada DNA yang termetilasi, tidak ditemukan adanya histon asetilase yang seringkali berasosiasi dengan DNA yang tidak termetilasi, sehingga diduga proses metilasi tidak hanya berpengaruh terhadap interaksi DNA dengan suatu protein, akan tetapi juga berhubungan dengan keberadaan ujung histon (Irvine dkk., 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Kumar dkk., (2011) menunjukkan bahwa pada kondisi normal, DNA merupakan molekul dengan muatan negatif, akan tetapi ketika DNA tersebut termetilasi, muatan negatif dari DNA akan berkurang sehingga menyebabkan ekor histon tidak dapat berinteraksi secara fisik dengan DNA.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa anemia berpengaruh terhadap kondisi hipoksia jaringan, dan hipoksia menyebabkan perubahan mekanisme regulasi gen EPO. Ekspresi EPOR pada kelompok anemia ($1048 \pm 99,72$) secara nyata lebih tinggi daripada kelompok non-anemia ($233,72 \pm 44,57$), begitupula dengan ekspresi EPO yang pada kelompok anemia ($990,04 \pm 119,35$) lebih tinggi daripada kelompok non-anemia ($630,46 \pm 77,17$). Metilasi region promotor dan enhancer gen EPO ketika sel berada pada kondisi hipoksia membutuhkan *binding energy* paling kecil untuk proses interaksi dengan HIF1. Diduga bahwa kecilnya *binding energy* yang dibutuhkan dalam proses interaksi menyebabkan ikatan antara region enhancer dengan HIF1 lebih stabil dan lebih kuat dan memungkinkan terjadinya transkripsi gen EPO oleh faktor transkripsi HIF1.

5.2 Saran

- a. Pemberian terapi ESA pada pasien kanker yang mengalami kondisi anemia hendaknya lebih dipertimbangkan lagi pada batas level Hb berapa terapi tersebut boleh diberikan.
- b. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan *docking* antara region promotor dengan protein p300 dan *methyl-CpG-binding protein* serta dilihat komplementari ikatan dan struktur antar keduanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., & Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*; 22:195-201.
- Bohlius J, Weingart O, Trelle S, Engert A. 2006. Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin – an updated overview. *Nat Clin Pract Oncol*; 3:152-64.
- Boyes J, Bird A. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*. 11:327-333.
- Brines M, Giovanni G, Fabio F, Alessandra S, Pietro G, Maddalena F, Roberto L. 2004. Erythropoietin Mediates Tissue Protection Through An Erythropoietin and Common-Subunit Heteroreceptor. 101 (41).
- Brooker, C. 2001. **Kamus saku keperawatan edisi 31**. Penerbit EGC. Jakarta.
- Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. 2001. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer* 91:2214-21.
- Cross SH, Bird AP. 1995. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*. 5:309-14.
- Dame C, Sola MC & Lim K. 2004. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem*, 279 : 2955 – 2961
- DeLano W. L & Sarina B. 2004. PyMOL user's guide. DeLano Scientific LLC.
- Dewi, FRP, Muhammad DP, Fatchiyah. 2012. **Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (EPO) Dengan Peningkatan Jumlah Sel pada Jaringan Kanker Payudara**. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. 2002. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI) Rome, Italy. Lecture Notes in Computer Science 2452, pp. 185-200, Springer Verlag.
- Dunst J, T. Kuhnt, H.G. Strauss, U. Krause, T. Pelz, H. Koelbi, and G. Haensgen. 2003. Anemia in cervical cancers : impact on survival , patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 56:78-787.
- Krieger E. YASARA is a molecular graphics, modelling and stimulation program for linux, windows and mac OS X. 2011. Accessible at <http://www.yasara.org/>.

- Feng, F. W. 2010. **Classifying arguments by scheme**. University of Toronto. Toronto. Thesis.
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. 1987. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7972-7976.
- Groopman JE & Itri LM. 1999. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 91:1616-34.
- Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. 2001. Expression And Characterization of Hypoxia Inducible Factor (HIF)-3 α in Human Kidney: Supression Of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α . *Biochem Biophys Res Commun*. 287:808 – 813
- Harper P & Littlewood T. 2005. Anaemia of cancer: impact on patient fatigue and long-term outcome. *Oncology*, 69(2):2-7.
- Hendrich B, Bird A. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 18:6538-6547.
- Hill, JR., Sebastian K., Jiye S., & Charlotte MD. 2011. Environment specific substitution tables improve membrane protein alignment. *Bioinformatics*. 27:15-23.
- Hurter B, Bush NJ. 2007. Cancer-related anemia. Clinical review and management update. *Clin J Oncol Nurs*. 11:349-59
- Ihle JN, Thierfelder W, Teglund S. 1998. Signaling By The Cytokine Receptor Superfamily. *Ann NY Academy Science*. 865:1–9
- Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. 1997. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood*. 89:1430-1439.
- Irvine RA, Lin IG and Hsieh CL. 2002. DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Mol.Cell Biol*. 22(19):6689-6696.
- Jelkmann W. 2002. The Enigma of the Metabolic Fate of Circulating Erythropoietin (EPO) in View of the Pharmacokinetics of Recombinant Drugs Rhepo and NESP. *Eur J Haematol*. 69:265-274.
- Jelkmann W. 2004. Molecular Biology Of Erythropoietin. *Journal of Internal Medicine*. 48 (8):649 – 659.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*. 37:387-392.

- Knight K, Wade S, Balducci. 2004. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med.* 116(7A):11S-26S.
- Krane, D. E. & M. L. Raymer. 2003. **Fundamental Concepts of Bioinformatics**. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0805346333
- Krieger E. 2011. YASARA is a molecular graphics, modelling and stimulation program for Linux, Windows and Mac OS X. Accessible at <http://www.yasara.org/>
- Kumar S.P, Kapopara R.G, Jasrai Y.T & Rawal R.M. 2012. Computational Studies On The Interaction Of Core Histone Tail Domains With CpG Island. *International Journal of Pharma and Bio Sceinces*; 3(1):B581-590
- Lovell S.C., I.W Davis., W.B Arendall., P.I.W de Bakker., J.M Word., M.G Prisant., J.S. Richardson & D.C. Richardson. 2002. Structure validation by Ca geometry: f/y and Cb deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics.* 50:437-450.
- Lu XG., CG Xing., YZ Feng., J Chen., C Deng. 2006. Clinical significance of immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1alpha as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer.* 5:350-353.
- van Dijk M & A.M.J.J. Bonvin. 2009. 3D-DART: a DNA structure modelling server. *Nucleid Acids Res.* 37, doi:10.1093/nar/gkp287
- Macindoe G., Mavridis L, Venkatraman V., Devignes M.D., Ritchie D.W. 2010. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Research.* 38:W445-W449.
- Maouche L, Tournamille C, Hattab C, Boffa G, Cartron JP, Chretien S. 1991. Cloning of the Gene Encoding the Human Erythropoietin Receptor. *Blood,* 78:2557 – 2563.
- Marc A M, Emidio Capriotti, Ilya NS, dan Philip EB. 2009. **Structural Bioinformatics 2nd Edition: Structure Comparison and Alignment**. John Wiley and Sons.
- Maruyama, K, K Miyata, & Yoshimura. 1994. Proliferation and erythroid differentiation through the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor. *The Journal of biological chemistry.* 269 (8).
- Maxwell PH, Osmond MK, dan Pugh CW. 1997. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 44:1149-1162.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. 1992. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucl Acids Res.* 20:5085-5092.
- Mercadante S, Gebbia V, Marrazzo A, Filosto S. 2000. Anaemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev.* 26:303-11.

- Moliterno AR, Spivak JL. 1996. Anemia of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 10:345-63.
- Moore, E & Rinaldo Bellomo. 2011. Erythropoietin (EPO) in Acute Kidney Injury. *Annals of Intensive Care*. 1 : 3.
- Morris, G.M. and M. Lim-Wilby, 2008. **Molecular Docking, Methods in Molecular Biology. In: Molecular Modeling of Proteins**. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Mount DM. 2004. **Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0879697121.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., and Weil. **Harpers illustrated biochemistry 28th Edition**. The Mc-Graw Hill Companies. New York.
- Mustard D & D.W. Ritchie. 2005. Docking essential dynamics eigenstructures. *PROTEINS: Struct. Funct. Bioinformatics*. 60:269-274.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393:386-389.
- Ngili, Y. 2009. *Biokimia struktur dan fungsi biomolekul*. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Pajonk, Frank, Antonia Weil, Alfred Sommer, Rafal Suwinski & Michael Henke. 2004. The Erythropoietin - Receptor Pathway Modulates Survival of Cancer Cells. *Oncogene*: 8987-8991. doi:10.1038/sj.onc.1208140.
- Prenggono MD, Handono K, Djoko W. S, Aru W S, Fatchiyah. 2012. Ekspresi Hypoxia-Inducible Factor-1 α menginduksi Ekspresi Eritropoietin Intraseluler, dan Vascular Endothelial Growth Factor pada Penderita Kanker Payudara dengan Anemia. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2 (27):77-82.
- Rekam medis pasien kanker payudara. 2011. RS Kanker Dharmais. Jakarta.
- Siegfried Z, Cedar H. 1997. DNA methylation: a molecular lock. *Curr Biol* 7:R305-307.
- Silva, Maite, Adalberto Benito, Cristina Sanz, Felipe Prosper, Daryoush Ekhterae & Jose Luis Fernandez-luna. 1999. Erythropoietin Can Induce the Expression of Bcl-xL through Stat5 in Erythropoietin-dependent Progenitor Cell Lines. *Biochemistry*. 274 (32):22165-22169.
- Sohmiya M & Kato Y. 2000. Molecular and Electrical Heterogeneity of Circulating Human Erythropoietin Measured by Sensitive Enzyme Immunoassay. *Eur J Clin Invest*. 30:344 – 349

- Steinmann K, Ritcher A.M, Dammann R.H. 2011. Epigenetic silencing of erythropoietin in human cancers. *Genes & Cancer*. 2(1):65-73
- Syed RS, Reid SW, Li C. 1998. Efficiency of Signalling Through Cytokine Receptors Depends Critically on Receptor Orientation. *Nature*. 395:511–516.
- Van Belle SJ, Cocquyt V. 2003. Impact of haemoglobin levels on the outcome of cancers treated with chemotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 47:1-11.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26(16):1701-1718
- Varlotto JMD and M.A. Stevenson. 2005. Anemia, Tumor Hypoxemia, and The Cancer Patient. *Radiation Oncology*. 63:25-36.
- Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. 2001. Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Oncol*. 28(8):29-35.
- Wasley LC, Timony G, dan Murtha P. 1991. The Importance of N- and O- Linked Oligosaccharides for the Biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* Biologic Activities of Erythropoietin. *Blood*. 77:2624 – 2632.
- Weiss, Mitchell J. 2003. New Insights Into Erythropoietin and Epoetin Alfa. *Signal Transduction*. 8(3):18-29.
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. 1998. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem*. 253:771-777.
- Whitelaw, Murray L, Janake Gustafsson, dan Lorenz Poellinger. 1994. Identification of Transactivation and Repression Functions of the Dioxin Receptor and Its Basic Helix-Loop-Helix / PAS Partner Factor Arnt. *Inducible versus Constitutive Modes of Regulation*, 14 (12):8343-8355.
- Wide L, Bengtsson C, Birgerard G. 1989. Circadian Rythm of Erythropoietin in Human Serum. *Br J Haematol*, 72:85 – 90
- Wolber G, Langer, T. 2005. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Comput Science*. 45(1):160-169.
- Yin H & KL Blanchard. 2000. DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanism. *Blood*. 95(1):111-119

Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. 1991. Activation of the Erythropoietin Receptor Promoter by Transcription Factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:10638–10641



GESDAV

Journal of Experimental and Integrative Medicine

available at www.scopemed.org



Original Article

Impact of anemia on erythropoietin and erythropoietin receptor expression: correlation with the proliferation of breast cancer cells

Firli Rahmah Primula Dewi¹, Muhammad Darwin Prenggono², Fatchiyah Fatchiyah¹

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, East Java;

²Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Lambung Mangkurat University, Ulin Hospital, Banjarmasin, South Kalimantan, Indonesia

Received March 6, 2013

Accepted May 1, 2013

Published Online May 30, 2013

DOI 10.5455/jeim.010513.or.069

Corresponding Author

Fatchiyah Fatchiyah

Department of Biology,

Faculty of Mathematics and Natural

Sciences, Brawijaya University,

Veteran St., Malang 65145, Indonesia.

fatchiya@gmail.com, fatchiya@ub.ac.id

Key Words

Anemia; Breast cancer; Erythropoietin;

Erythropoietin receptor; Non-anemia;

Proliferation

Abstract

Objective: The aim of this research is to investigate the relationship between anemia and erythropoietin (Epo) and erythropoietin receptor (EpoR) expression. This study also investigated the relationship between Epo and EpoR expression level and the proliferation rate of cancer cells.

Methods: 20 samples of breast cancer tissues were divided into two groups; anemic group (from patients with Hb level < 12) and non-anemic group (from patients with Hb level > 12). All samples were analyzed by using immunofluorescence staining in order to examine Epo and EpoR expression. Proliferation of cancer cells were analyzed by using Hematoxylin-Eosin staining.

Results: Anemic breast cancer group represented higher Epo and EpoR expression than the non-anemic group. The results also indicated that in anemic samples expression levels of Epo and EpoR were negatively correlated with the number of cancer cells. In contrast, Epo and EpoR expression levels from non-anemic samples were positively correlated with the number of cancer cells.

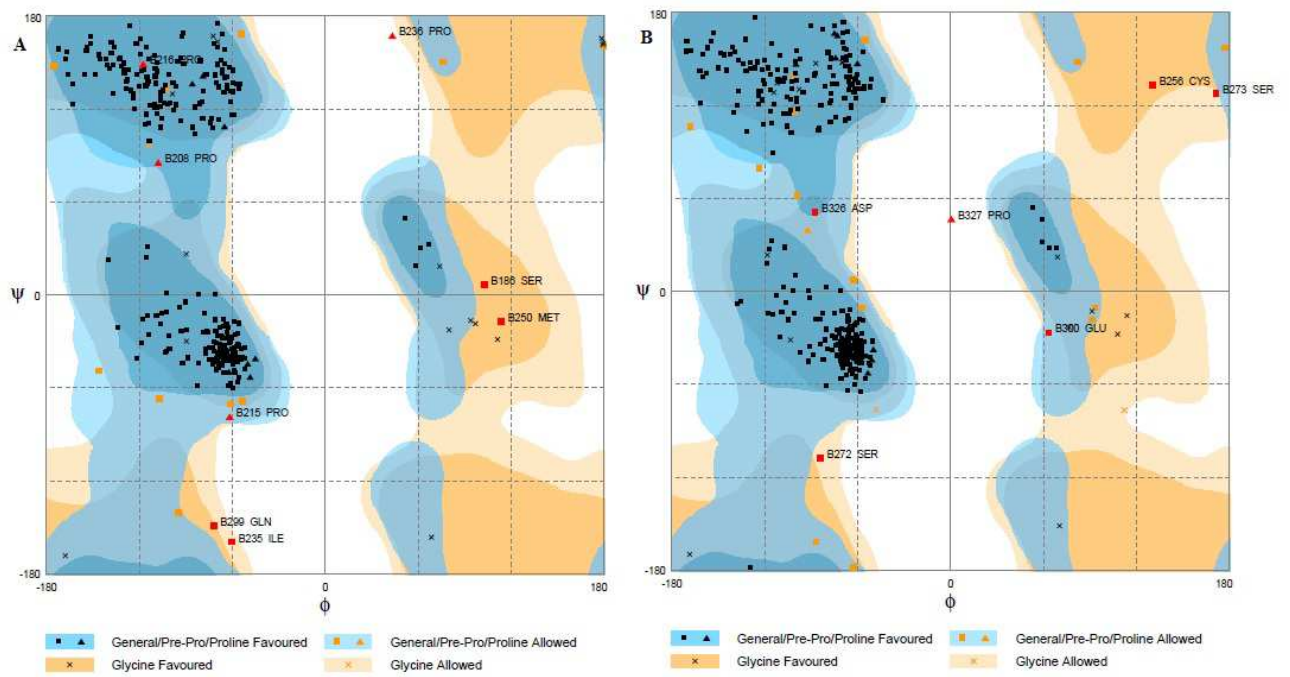
Conclusion: These results conducted that anemia is a crucial factor of hypoxic condition. Hypoxia led by anemia cause a different control mechanism of Epo and EpoR expression and cancer cell proliferation.

© 2013 GESDAV

Lampiran 2. Laik Etik Penelitian

	<p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH Jalan Veteran Malang – 65145 Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755</p>
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")</p>	
<p>No. 157A / EC / KEPK- S3- JK / 06 / 2011</p>	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN</p>	
<p>JUDUL : Jalur Pensinyalan <i>Hypoxia-Inducible Factor-1α</i> (HIF-1α) Eritropoietin Intraseluler dan <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) Pada Penderita Kanker Anemik : Kanker Payudara Sebagai Model</p>	
<p>PENELITI UTAMA : dr. Muhammad Darwin Prenggono, SpPD KHOM</p>	
<p>UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG</p>	
<p>DINYATAKAN LAIK ETIK</p>	
	<p>Malang, 23 JUN 2011</p>  <p>Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum</p>

Lampiran 3. Hasil Ramachandran Plot Analysis



Lampiran 4. Hasil Uji Statistika

LT 1. Hasil Pengujian Statistika Deskriptif ekspresi EPO dan EPOR

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
EPO anemi	10	951.00	390.106	381	1874
EPOR anemi	10	1017.00	309.270	737	1734
EPO non anemi	10	629.90	244.018	338	1140
EPOR non anemi	10	233.20	140.950	104	470
Cancer cell in anemia	10	181.10	36.458	131	247
Cancer cell in non-anemia	10	155.40	91.780	55	380

LT 2. Hasil Pengujian Kenormalan Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test							
		EPO anemi	EPOR anemi	EPO non anemi	EPOR non anemi	Cancer cell in anemia	Cancer cell in non-anemia
N		10	10	10	10	10	10
Normal Parameters ^a	Mean	951.00	1017.00	629.90	233.20	181.10	155.40
	Std. Deviation	390.106	309.270	244.018	140.950	36.458	91.780
	Most Extreme Differences						
	Absolute	.228	.283	.130	.232	.152	.310
	Positive	.228	.283	.130	.232	.152	.310
	Negative	-.138	-.183	-.116	-.180	-.144	-.152
Kolmogorov-Smirnov Z		.720	.896	.412	.733	.479	.982
Asymp. Sig. (2-tailed)		.677	.399	.996	.655	.976	.290

LT3. Hasil Uji Korelasi

Correlations							
		EPO anemi	EPOR anemi	EPO non anemi	EPOR non anemi	Cancer cell in anemia	Cancer cell in non-anemia
EPO anemi	Pearson Correlation	1	.873**	-.027	-.329	-.581	.025
	Sig. (2-tailed)		.001	.940	.353	.078	.946

	N	10	10	10	10	10	10
EPOR anemi	Pearson Correlation	.873**	1	-.116	-.318	-.498	.175
	Sig. (2-tailed)	.001		.750	.371	.143	.629
	N	10	10	10	10	10	10
EPO non anemi	Pearson Correlation	-.027	-.116	1	.625	-.242	.554
	Sig. (2-tailed)	.940	.750		.053	.501	.096
	N	10	10	10	10	10	10
EPOR non anemi	Pearson Correlation	-.329	-.318	.625	1	.136	.405
	Sig. (2-tailed)	.353	.371	.053		.707	.246
	N	10	10	10	10	10	10
Cancer cell in anemia	Pearson Correlation	-.581	-.498	-.242	.136	1	.132
	Sig. (2-tailed)	.078	.143	.501	.707		.717
	N	10	10	10	10	10	10
Cancer cell in non-anemia	Pearson Correlation	.025	.175	.554	.405	.132	1
	Sig. (2-tailed)	.946	.629	.096	.246	.717	
	N	10	10	10	10	10	10

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).