

# Ekspresi Relatif mRNA *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$* pada Sel Glioma Penderita

NOVI SILVIA HARDIANY, MOHAMAD SADIKIN, SEPTELIA INAWATI WANANDI

Departement of Biochemistry & Molecular Biology FKUI

Diterima 3 Desember 2012; Direview 12 Desember 2012; Disetujui 21 Desember 2012

## ABSTRACT

*Glioma is primary brain tumor which is frequently found in Indonesia. Glioma patient have lower life expectancy due to recurrence and resistance to treatment. Hypoxia is one of factors that influence the response to radiotherapy. This research analyzed the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA, as a hypoxia tissue marker, in low grade glioma compared to high grade glioma. Samples were 15 low grade glioma tissues, 6 high grade glioma tissues and 21 leucocyte cells from a particular glioma patient as a control of normal cell. The relative expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA was quantitatively determined using Real Time RT-PCR. The result showed that relative expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA in high grade glioma were higher than low grade glioma, but it was not significant. Surprisingly, there were 73 % samples of low grade glioma which have high HIF-1 $\alpha$  mRNA expression with varying values compared with leucocyte cells as a control. As well as, relative expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA in 100 % high grade glioma samples were higher than the control with varying values. It could be concluded that there are variations in the degree of hypoxia in low grade and high grade glioma that may affect the success of radiotherapy.*

**Keyword:** Glioma, mRNA HIF-1 $\alpha$ , hypoxia

## ABSTRAK

Glioma merupakan tumor otak primer yang cukup sering ditemukan di Indonesia di antara keganasan otak lainnya. Penderita glioma mempunyai angka harapan hidup yang rendah dikarenakan seringnya mengalami resistansi terapi. Hipoksia merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi respons terapi radiasi. Penelitian ini menganalisis ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$ , sebagai petanda jaringan hipoksia, pada glioma derajat rendah dibandingkan dengan glioma derajat tinggi. Sampel terdiri dari 15 jaringan glioma derajat rendah, 6 jaringan glioma derajat tinggi, dan 21 sel leukosit dari penderita glioma sebagai kontrol sel normal. Ekspresi relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan *Real Time* RT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada glioma derajat tinggi lebih tinggi dibandingkan dengan glioma derajat rendah, namun tidak bermakna secara statistik. Hal yang menarik yaitu ditemukan peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  dengan nilai yang bervariasi pada 73 % sampel glioma derajat rendah dibandingkan dengan sel leukosit sebagai kontrol sel normal. Begitu juga pada glioma derajat tinggi ditemukan peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$  dengan nilai yang bervariasi pada 100% sampel. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat variasi derajat hipoksia pada glioma derajat rendah dan derajat tinggi yang mungkin mempengaruhi keberhasilan terapi radiasi.

**Kata kunci:** Glioma, mRNA HIF-1 $\alpha$ , hipoksia

## KORESPONDENSI:

Dr. dr. Novi Silvia H,  
MBiomed  
Departemen Biokimia &  
Biologi Molekuler FKUI  
Jl. Salemba Raya  
No. 6 Jakarta Pusat,  
Telp (021) 3910734  
Fax. (021) 3910190  
Email:  
novi\_s\_h@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Glioma adalah bentuk tumor otak primer yang paling sering ditemukan di Indonesia di antara keganasan otak lainnya. Penderita glioma mempunyai angka harapan hidup yang rendah karena sering mengalami kekambuhan dan resistan terhadap terapi.<sup>1</sup> Berdasarkan klasifikasi WHO, glioma dibedakan menjadi glioma derajat keganasan rendah dan glioma derajat keganasan tinggi.<sup>2</sup> Sampai saat ini, klasifikasi WHO tersebut tidak selalu menjadi indikator keberhasilan terapi radiasi.<sup>3</sup> Renindra *et al.*, menemukan bahwa penderita glioma dengan derajat keganasan yang sama memberikan respons berbeda terhadap terapi radiasi. Glioma derajat keganasan rendah menunjukkan respons radioterapi bervariasi, yaitu 10 – 70 %. Begitu pula dengan glioma derajat keganasan tinggi menunjukkan respons terhadap radioterapi yang bervariasi antara 30 – 70%. Dengan demikian, kemungkinan terdapat faktor lain yang mempengaruhi respons radioterapi, misalnya kondisi hipoksia sel tumor.<sup>3</sup>

Tumor solid pada manusia, termasuk glioma, mempunyai status oksigen yang kurang baik dibandingkan dengan jaringan normal. Konsentrasi oksigen pada jaringan normal sekitar 40 – 60 mmHg. Kebalikannya, setengah dari tumor *solid* menunjukkan nilai kurang dari 10 mmHg, bahkan lebih kecil dari 10% rentang nilai normal.<sup>4</sup> Kondisi hipoksia pada sel tumor tersebut akan menurunkan respons jaringan tumor terhadap terapi radiasi dikarenakan terapi radiasi memerlukan oksigenisasi yang baik.<sup>4,5</sup> Dengan adanya oksigen maka sensitivitas radiasi meningkat 2,5 – 3 kali. Mekanisme sensitivitas tersebut terjadi akibat terikatnya oksigen oleh radikal bebas dan akan membentuk peroksida yang lebih stabil sehingga memfiksasi kerusakan DNA sel tumor.<sup>6</sup>

Hipoksia dapat dideteksi dengan suatu penanda jaringan hipoksia yaitu HIF-1. HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen, baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Molekul HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari subunit  $\alpha$  dan subunit  $\beta$ . Namun, hanya subunit  $\alpha$  yang stabilitas dan aktivitasnya ditingkatkan pada kondisi hipoksia. Dengan demikian, subunit ini yang dipercaya sebagai penanda jaringan yang hipoksia.<sup>7</sup> HIF-1 $\alpha$  sebagai petanda jaringan hipoksia dideteksi pada kebanyakan jenis kanker padat seperti pada kanker otak, kandung kemih, payudara, usus, ovarium, pankreas, ginjal, dan prostat. Secara klinis, overekspresi HIF-1 $\alpha$  bisa dijadikan sebagai *marker* pada penyakit-penyakit dalam kondisi agresif tinggi

dan sulit dilakukan pengobatan. HIF-1 akan mengaktifkan gen yang memungkinkan sel tumor tetap hidup dan berkembang dalam kondisi lingkungan kanker yang hipoksik.<sup>4</sup>

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada glioma derajat keganasan rendah dan glioma derajat keganasan tinggi. Ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  tersebut dapat menggambarkan kondisi hipoksia sel tumor yang diperkirakan akan mempengaruhi respons sel glioma terhadap terapi radiasi.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian *cross-sectional* yang dilaksanakan di Laboratorium Biokimia & Biologi Molekular FKUI selama 6 bulan (Juni 2008 – November 2008). Sampel terdiri dari 15 jaringan glioma derajat keganasan rendah, 6 jaringan glioma derajat tinggi, dan 21 sel lekosit dari penderita glioma yang sama sebagai kontrol sel normal karena sulit mendapatkan sel otak normal. Kriteria inklusi adalah pasien glioma yang didiagnosis glioma dengan pemeriksaan radiologi serta menjalani operasi pengangkatan tumor dan bersedia menandatangani *informed consent*. Kriteria eksklusi yaitu apabila hasil pemeriksaan Patologi Anatomi (PA) tidak menunjukkan glioma, baik menurut klasifikasi WHO (*grade* I-IV) maupun tipe sel.

Sampel berupa jaringan glioma yang diambil saat pasien menjalani operasi serta darah vena (*whole blood*) yang diambil sebelum pasien menjalani terapi radiasi atau kemoradiasi. Jaringan tumor langsung dihomogenisasi menggunakan *Polytron Homogenizer* atau disimpan dalam *deep freezer* pada suhu - 80°C. Sel lekosit diperoleh dari darah vena pasien sebanyak 3 mL dan disimpan dalam tabung EDTA untuk mencegah pembekuan darah. Sampel darah dapat disimpan pada suhu 2 – 8°C maksimal selama 24 jam sebelum dilakukan isolasi RNA. Prosedur pengambilan sampel telah disetujui oleh komite etik Fakultas Kedokteran UI (No. 235/PT.02.FK/ETIK/2006).

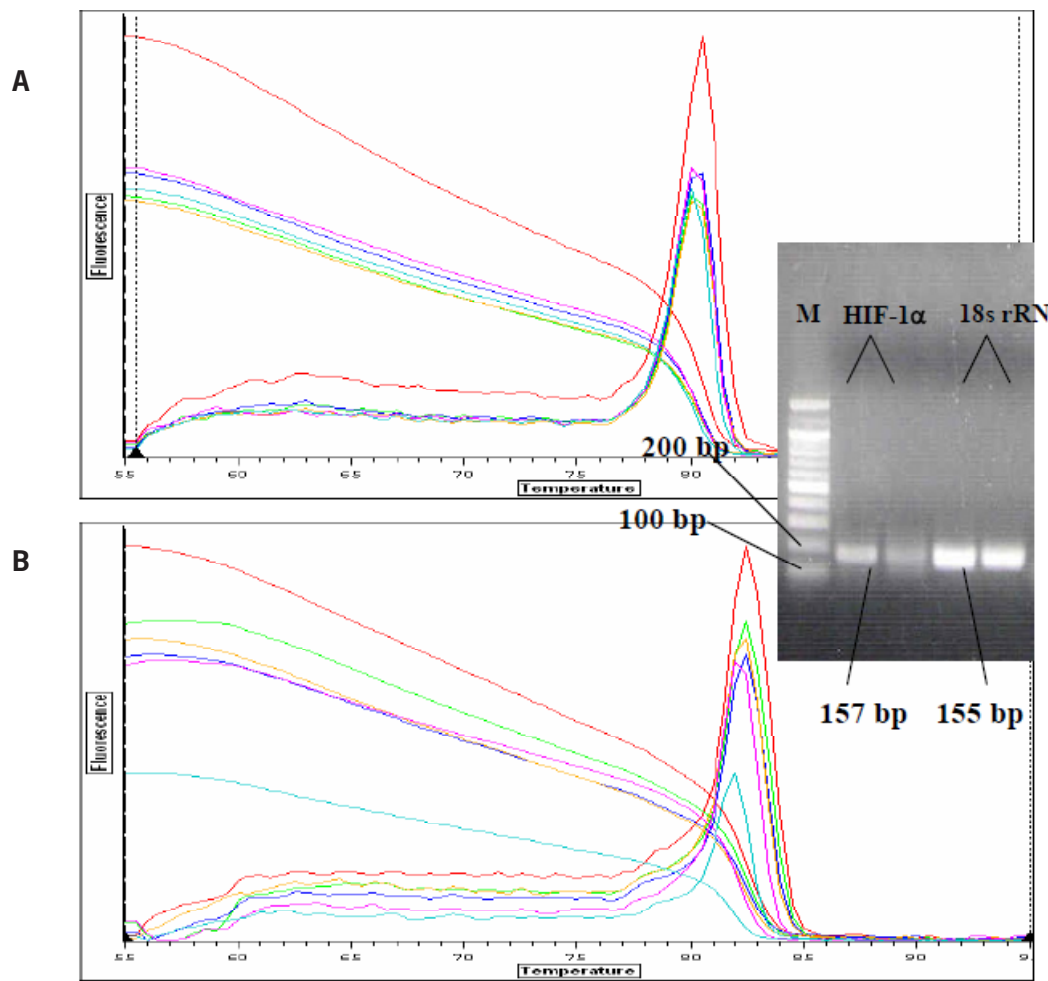
Isolasi RNA total dari sel glioma dan sel lekosit menggunakan *Aquapure RNA Isolation Kit (BioRad)* dengan mengikuti instruksi dari kit. Sampel hidrasi RNA disimpan pada suhu -70°C sampai digunakan. Amplifikasi sampel RNA menggunakan *iScript One Step RT-PCR Kit with SYBR Green (BioRad)*. Sintesis cDNA dan amplifikasi dilakukan pada tabung yang sama. Protokol reaksi adalah sintesis cDNA selama 10 minutes pada 50°C, inaktivasi *iScript Reverse*

*transcriptase* selama 5 minutes pada 95°C, siklus PCR (40 siklus) selama 10 detik pada 95°C; 30 pada 59°C (melalui proses optimasi); 30 detik pada 72°C, analisis *Melt curves* selama 1 menit pada 95°C; 1 menit pada 55°C; 10 detik pada 55°C (80 siklus, ditingkatkan 0,5°C setiap siklus). Primer untuk gen HIF-1 $\alpha$  adalah tgatgaccagcaactgagg (*Forward*) dan ttgattgagtgcagggtcag (*Reverse*) dengan produk amplicon sebesar 157 bp. 18S rRNA digunakan sebagai standar eksternal (*Housekeeping gene*), prosedur amplifikasi sama dengan gen HIF-1 $\alpha$ . Primer untuk gen 18S rRNA adalah aaacggctaccacatccaag (*Forward*) dan cctccaatggatcctcgta (*Reverse*) dengan produk amplifikasi 155 bp. Primer untuk HIF-1 $\alpha$  dan 18S rRNA didesain menggunakan program *Primer3* dan *Primer Analysis software*. Sekuen untuk HIF-1 $\alpha$

(NM\_001530) dan 18S rRNA (X03205) diperoleh dari *NCBI Gene Bank*. *Aquabidest* digunakan sebagai kontrol negatif untuk menghindari hasil positif palsu. Tingkat ekspresi mRNA pada sel glioma ditentukan secara relatif dengan menggunakan rumus Pfaffl.

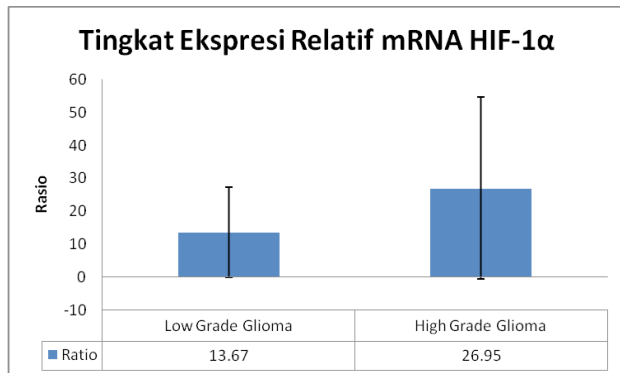
#### HASIL

Pada gambar 1 terlihat hanya satu puncak pada analisis *melting curve* untuk gen HIF-1 $\alpha$  (A) dan gen 18S rRNA (B). Hal ini membuktikan bahwa primer yang telah didesain spesifik untuk HIF-1 $\alpha$  dan 18S rRNA. Hasil elektroforesis produk *Real Time RT PCR* yang menunjukkan hanya satu pita untuk gen HIF-1 $\alpha$  (216 bp) dan gen 18S rRNA (155 bp) juga mendukung bahwa primer yang telah didesain spesifik untuk gen tersebut.



Gambar 1: Melting Curve gen HIF-1 $\alpha$  (A) dan gen 18S rRNA (B). Hasil elektroforesis produk PCR pada agarosa 1 % terlihat hanya 1 pita sebesar 157 bp untuk gen HIF-1 $\alpha$  dan 155 bp untuk gen 18S rRNA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  lebih tinggi pada glioma derajat keganasan tinggi dibandingkan dengan glioma derajat keganasan rendah walaupun tidak bermakna secara statistik (gambar 2). Namun, terdapat hal yang menarik yaitu ditemukan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  yang meningkat pada 73% sampel glioma derajat rendah dibandingkan dengan sel lekosit sebagai kontrol sel normal. Peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$  pada glioma derajat keganasan rendah tersebut bervariasi, yaitu 20% sampel menunjukkan peningkatan 1,6 – 8,8 kali; 40% sampel menunjukkan peningkatan 10,7 - 20,1 kali dan 13,3% sampel menunjukkan peningkatan 31,2 - 60,02 kali. Sedangkan pada glioma derajat keganasan tinggi ditemukan peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$  pada 100% sampel, walaupun peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  tersebut juga bervariasi (40% sampel menunjukkan peningkatan 1,6 – 8,8 kali, 20% sampel menunjukkan peningkatan 10,7 – 20,1 kali dan 40% menunjukkan peningkatan 31,2 – 60,02 kali). Variasi tingkat ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  tersebut dapat dilihat pada tabel 1.



Gambar 2: Tingkat ekspresi relatif mRNA HIF-1 ditemukan lebih tinggi pada glioma derajat keganasan tinggi dibandingkan dengan glioma derajat keganasan rendah ( $p > 0,05$ )

**DISKUSI**

Penelitian sebelumnya di Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI pada jaringan jantung, otak, dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik menunjukkan bahwa mRNA HIF-1 $\alpha$  pada berbagai jaringan tersebut semakin meningkat apabila

perlakuan hipoksia diteruskan sampai 14 hari. Begitu pula dengan aktivitas HIF-1 $\alpha$  ditemukan meningkat seiring dengan peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$ .<sup>8</sup> Dengan demikian, peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada penelitian ini menunjukkan adanya kondisi hipoksia pada sebagian besar sel glioma.

Hipoksia pada sel tumor terjadi karena adanya area nekrotik, tertutupnya/’blocking’ pembuluh darah oleh sel tumor dari sirkulasi darah, kolapsnya pembuluh darah akibat tekanan intersisial tumor yang tinggi, dan/atau interupsi dari aliran darah tumor. Semua faktor tersebut terjadi karena sifat alami tumor yang rapuh, tidak teratur serta kaotik apabila dibandingkan dengan pembuluh darah jaringan normal. Proliferasi sel tumor yang begitu cepat disertai dengan terbentuknya area yang nekrotik dikarenakan jarak di mana oksigen masih dapat berdifusi dalam jaringan yaitu sekitar 150  $\mu$ m.<sup>9</sup>

Tingginya mRNA HIF-1 $\alpha$  pada penelitian ini menunjukkan suatu respons adaptif sel glioma terhadap hipoksia, sehingga sel glioma dapat bertahan hidup dalam kondisi yang hipoksik. Evans *et al.*, menunjukkan bahwa *microenvironment* yang hipoksik pada tumor glia dapat mencetuskan modifikasi epigenetik *post* translasi pada gen tumor supresor seperti p53. Perubahan ini akan menghasilkan disregulasi aktivitas translasi dan *downstream pathway* tumor glia.<sup>10</sup> Dimerisasi antara HIF-1 $\alpha$  dan HIF-1 $\beta$  akan memediasi pertahanan sel tumor dalam kondisi hipoksia melalui modulasi lebih dari 40 gen yang terlibat dalam homeostatis glukosa, eritropoiesis, proliferasi, apoptosis, dan angiogenesis.<sup>11</sup>

Tingginya kadar relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  diduga akan mengurangi sensitivitas sel glioma terhadap terapi radiasi karena terapi radiasi memerlukan oksigen. Bachtary *et al.*, melaporkan bahwa pada kanker serviks, overekspresi HIF-1 $\alpha$  berhubungan secara signifikan dengan respons radiasi di mana pasien dengan ekspresi HIF-1 $\alpha$  yang berlebihan hanya memberikan respons parsial terhadap terapi radiasi.<sup>12</sup> Selain itu, peningkatan kadar HIF-1 $\alpha$  pada kanker serviks dan kanker orofaring berhubungan dengan *survival* pasien, dimana pasien yang mengekspresikan HIF-1 $\alpha$  lebih tinggi mempunyai *survival* yang rendah.<sup>12,13</sup>

Tabel 1: Persentase sampel dengan tingkat ekspresi relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  yang bervariasi

Glioma	% Sampel dengan Tingkat Ekspresi Relatif mRNA HIF-1				
	Rendah	Tetap	Tinggi		
	< 0,9 x	0,9 – 1,1 x	1,6 – 8,8 x	10,7 – 20,1 x	31,2 – 60,02 x
Derajat Rendah	20 %	6,7 %	20 %	40 %	13,3 %
Derajat Tinggi	-	-	40 %	20 %	40 %

Variasi peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$  tersebut menunjukkan perbedaan derajat hipoksia pada sel glioma, yang mungkin berhubungan dengan perbedaan respons sel glioma terhadap terapi radiasi. Dengan demikian, variasi peningkatan kadar relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  tersebut mungkin dapat menjelaskan penelitian yang telah dilakukan oleh Renindra pada pasien glioma RSCM yang menunjukkan terdapatnya variasi respons terapi radiasi yang luas pada kelompok glioma dengan derajat keganasan yang sama.<sup>3</sup> Namun, penelitian lanjutan yang menganalisis hubungan ekspresi gen HIF-1 $\alpha$  dengan respons terapi, *survival* dan derajat keganasan perlu dilakukan untuk mendukung pernyataan tersebut.

### KESIMPULAN

Terdapat variasi derajat hipoksia pada glioma derajat rendah dan derajat tinggi yang mungkin mempengaruhi keberhasilan terapi radiasi.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Padmosantjojo RM. Brain Tumors in Indonesia. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Asia Pasific Cancer Congress; 2003; Bali, Indonesia
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
3. Aman RA. Identifikasi faktor prediksi radiosensitivitas tumor sel glia: tinjauan khusus pada angiogenesis, proliferasi sel dan apoptosis sebagai perantai biologik tumor. [Disertasi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
4. Vaupel P. Oxygen transport in tumors: characteristics and clinical implications. *Adv Exp Biol.* 1996; 388:341-51.
5. Giatromanolaki A, Harris AL. Tumour hypoxia, hypoxia signalling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(6B):4317-24
6. Bristow RG, Hill RP. Molecular and cellular basis of radiotherapy. In: Tannock IF, Hill PH, editors. *The basic science of oncology*. New York: Mc. Graw-Hill. Inc.Company, 1998; p. 295-321.
7. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36(1):1-12.
8. Wanandi SI, Dewi S, Paramita R. Peran protein hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) terhadap regulasi gen manganese superoxide dismutase (MnSOD) pada induksi hipoksia sistemik. Oral Presentation. Seminar PBBMI; 15 Agustus 2008; Padang.
9. Hall EJ, Giaccia AJ. Oxygen effect and reoxygenation. In: *Radiobiology for the radiologist*. Sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.p.85-102.
10. Evans SM, et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10:8177-84.
11. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Polon.* 2004; 51(3):563-85.
12. Bachtary B, Schindl M, Potter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, Birner P. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 32:117-20.
13. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:2911-6.