

EKSPRESI PROTEIN P53 MUTAN PADA MELANOMA MALIGNA DAN NEVUS MELANOSITIK

Lusiani Tjandra

Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Abstrak

Latar belakang : Melanoma maligna merupakan tumor ganas sel melanosit dengan pertumbuhan agresif dan resisten terhadap terapi konvensional. Proses karsinogenesis melanoma maligna secara umum melibatkan onkogen dan gen penghambat tumor yang berhubungan dengan siklus sel serta gen pengendali apoptosis. Mutasi pada gen P53 menyebabkan hilangnya fungsi gen dan menjadi dasar perubahan dalam proses terjadinya kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah P53 berperan penting dalam proses karsinogenesis melanoma maligna.

Metode : blok paraffin pasien melanoma maligna kulit di instalasi Patologi Anatomi RSU Dr Soetomo Surabaya sejak bulan Juli 2007 – 30 juni 2008. Sebagai pembanding diambil 5 kasus nevus melanositik. Blok paraffin dipotong dengan mikrotom, kemudian dilakukan pewarnaan Immunohistokimia dengan antibody anti p53 dan dihitung jumlah sel tumor positif.

Hasil : pada penelitian ini didapatkan 50% kasus yang positif dengan pewarnaan anti P53. Analisis statistik uji Mann Whithney menunjukkan tidak ada peningkatan yang signifikan ekspresi protein P53 mutan ($P=0,129$; $p> 0,05$) pada melanoma maligna dibandingkan nevus melanositik.

Kesimpulan: P53 kurang berperan pada karsinogenesis melanoma maligna yang menunjukkan adanya kemungkinan gen penghambat tumor lain yang lebih berperan,

Kata kunci : Melanoma maligna, p53

P53 PROTEIN EXPRESSION IN MALIGNANT MELANOMA DAN MELANOCYTIC NEVI

Lusiani Tjandra

Lecturer Faculty of Medicine, University of Wijaya Kusuma Surabaya

ABSTRACT

Background: Melanoma is the form of skin cancer that has an aggressive behavior and resistance to conventional therapy. These unusual behaviors reflecting its unique carcinogenesis process which involve several mutations in chromosomes and genome that regulate proliferation and apoptotic process. The most common mutated genes in malignant tumors is p53. The object of this study is to determine whether these three genes play an important role in melanoma carcinogenesis.

Methods: block paraffin of melanoma patients from Pathologic Department were collected from the period of July 2007 until June 2008. Five cases of melanocytic nevi were added as a control groups. The block then cut by microtome, placed on microscopic slides which stained with monoclonal antibody against p53 respectively.

Results: melanoma specimen show 50% cases has scattered positive cell for p53 staining. The data then statistically analyzed Mann Whitney and the result shows that there was no significance difference in the expression of p53 ($p = 0,129$; $p > 0,05$) in melanoma compared with nevus.

Conclusions: p53 has a less role in melanoma carcinogenesis suggesting that there was another tumor suppressor genes that was mutated in melanoma cells.

Keywords: malignant melanoma, p53

PENDAHULUAN

Melanoma maligna merupakan tumor ganas sel melanosit dengan pertumbuhan agresif dan resisten terhadap terapi. Sel melanosit merupakan sel normal yang terdapat pada lapisan basal epidermis kulit. Sel ini berfungsi untuk melindungi tubuh dari paparan sinar matahari terutama sinar UV yang dapat merusak komposisi DNA sel normal. Paparan sinar ultraviolet B serta terjadinya mutasi gen yang berperan dalam proliferasi dan apoptosis sel, dapat meningkatkan pertumbuhan sel melanosit dan menghasilkan tumor, baik tumor jinak

yang disebut nevus melanositik atau tumor ganas yang dikenal sebagai melanoma maligna. Sampai saat ini peran p53 pada melanoma maligna belum dapat dijelaskan.

Melanoma maligna merupakan tumor ganas kulit yang paling banyak menimbulkan kematian di Amerika Serikat dan Eropa (Ugurel, 2009). Di Australia, insiden dan mortalitas masih terus meningkat. Di Indonesia menurut data histopatologis, kanker kulit merupakan kanker ketiga tersering dan melanoma maligna menyebabkan 1% sampai 2% dari semua kematian akibat kanker (Harahap,

2000 ; Djuanda, 1999).

Proses berkembangnya sel melanosit menjadi nevus ataupun melanoma maligna terjadi melalui banyak tahapan dan melibatkan banyak perubahan pada gen maupun kromosom. Penelitian dengan teknik Comparative genomic Hybridization pada melanoma telah mengidentifikasi beberapa perubahan kromosom baik berupa penambahan maupun pengurangan jumlah nukleotida pada melanoma maligna dibandingkan dengan sel melanosit maupun nevus melanositik. Perubahan tersebut melibatkan mutasi berbagai macam gen yang berperan pada karsinogenesis melanoma maligna (Bastian, 1998). Pola pertumbuhan melanoma yang agresif dan resisten terhadap terapi konvensional berkaitan dengan proses karsinogenesis tumor. Proses karsinogenesis melanoma melibatkan mutasi beberapa gen yang berfungsi sebagai gen pengatur pertumbuhan sel (p53). Mutasi pada gen tersebut akan menghasilkan pertumbuhan neoplastik sel melanosit baik berupa neoplasma jinak (nevus melanositik) maupun neoplasma ganas (melanoma maligna). Pemahaman karsinogenesis melanoma diperlukan untuk mengungkap perilaku biologi tumor serta cara untuk menghambat pertumbuhan tumor. Walaupun sudah banyak diteliti tetapi karsinogenesis melanoma masih belum dapat diungkap secara menyeluruh.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada peningkatan yang bermakna dari ekspresi protein p53 pada melanoma maligna dibanding dengan nevus melanositik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi panduan dalam terapi melanoma maligna.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Sampel penelitian

Kasus melanoma dari 1 Juli 2007 sampai dengan 31 Juli 2008 di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo

sebanyak 26 kasus, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian sebanyak 10 kasus dan 5 kasus nevus melanositik sebagai pembanding. Rancangan penelitian ini adalah eksplanatori dan jenis penelitian adalah observasional analitik.

B. Pemeriksaan Immunohistokimia

Ekspresi protein p53 mutan merupakan jumlah sel tumor dengan inti berwarna merah (pada pemeriksaan imunohistokimia) dan dihitung dari 100 sel tumor. Pada setiap kasus diberikan skor berdasarkan hasil penghitungan jumlah sel tumor yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi p53 dengan ketentuan sebagai berikut (Stretch, 1991) :

Skor 0 = sel tumor tidak terwarnai pada intinya

Skor +1 = sel tumor terwarnai pada inti sel < 5 %

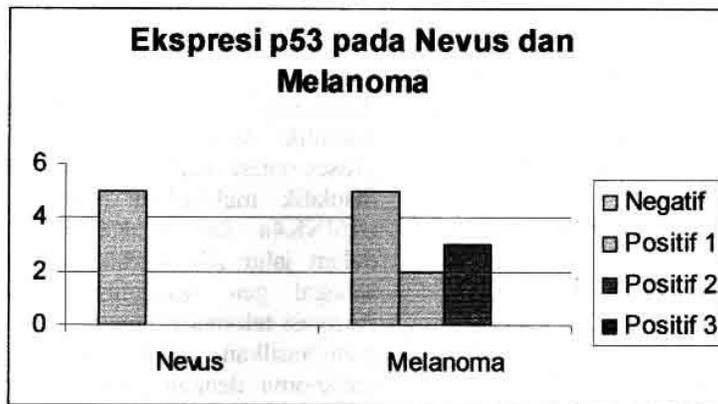
Skor +2 = sel tumor terwarnai pada inti sel antara 5 – 50%

Skor +3 = sel tumor terwarnai pada inti sel > 50 %

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

Hasil pemeriksaan imunohistokimia sel tumor yang mengekspresikan protein p53 mutan pada melanoma maligna dan nevus melanositik.

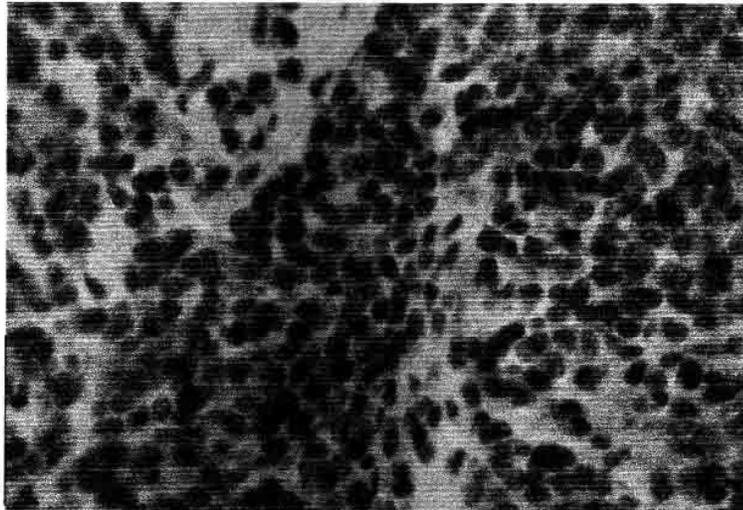
Pemeriksaan jumlah sel tumor yang mengekspresikan p53 mutan pada melanoma maligna dilakukan dengan teknik imunohistokimia Biotin Streptavidin Amplified. Satu sampel diamati dan dihitung jumlah sel tumor yang mengekspresikan protein p53 mutan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, diamati pada seluruh lapang pandang dan dihitung jumlah sel tumor yang memberikan reaksi positif dan negatif terhadap antibodimonoklonal p53. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4, kemudian dihitung persentase dan diberi skor, hasil dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. Ekspresi p 53 pada nevus dan melanoma

Dari gambar 1 dapat diketahui bahwa 10 kasus melanoma hanya 5 kasus yang menunjukkan ekspresi protein p53 yang positif dengan rincian 2 kasus positif pada < 5% sel tumor dan 3 kasus positif pada 5 – 10% sel tumor. Tidak ada kasus yang positif > 10% sel tumor. Sedangkan untuk kasus nevus tidak ada yang

memberikan hasil positif.



Pengujian peningkatan ekspresi protein p53 pada melanoma maligna dibandingkan nevus melanositik.

Dari hasil analisis statistika dengan menggunakan uji Mann Whitney didapatkan tidak ada peningkatan yang bermakna ekspresi protein p53 mutan pada melanoma dibanding dengan nevus melanositik ($p = 0,129$; $p > 0,05$).

DISKUSI

Jumlah kasus melanoma dari 1 Juli 2007 sampai dengan 31 Juli 2008 di Instalasi Patologi Anatomi RSU Dr. Soetomo sebanyak 26 kasus. Dari 26 kasus, 10 kasus yang memenuhi kriteria inklusi dan digunakan dalam penelitian ini, sedangkan untuk nevus melanositik diambil 5 kasus sebagai pembanding. Kriteria pemilihan kasus nevus adalah proliferasi sel yang mengandung pigmen melanin dan secara jelas menunjukkan perilaku jinak pada gambaran histologi (nevus intradermal).

Sampel penelitian melanoma

terdiri dari 7 orang penderita wanita dan 3 orang penderita pria dengan rentang usia antara 28 – 80 tahun. Menurut literatur melanoma maligna dapat menyerang semua umur dengan insiden paling banyak pada usia di atas 40 tahun, tanpa adanya predileksi jenis kelamin (Harahap, 2000).

Lokasi melanoma yang sering ditemukan (7 dari 10 kasus) adalah melanoma pada daerah telapak kaki dan jari kaki (acral melanoma). Melanoma jenis ini faktor paparan sinar matahari kurang berperan dalam proses terjadinya tumor, karena telapak kaki relatif terlindung dari sinar matahari. Dua kasus

yang lain adalah penderita wanita dengan melanoma pada daerah perineum / vulva dan kulit abdomen yang juga terlindung dari sinar matahari, hanya satu penderita melanoma di kulit regio cruris dimana paparan sinar matahari ikut berperan pada proses karsinogenesis.

Gambaran mikroskopis penderita melanoma maligna di RSUD Dr. Soetomo Surabaya adalah semua kasus menunjukkan sel melanosit anaplastik yang menghasilkan pigmen dan tidak didapatkan kasus amelanotik melanoma. Derajat invasi tumor semuanya tergolong Clark level 5 dengan kedalaman invasi tumor menurut Breslow pada level 4 serta pertumbuhan tumor secara vertikal (Vertical Growth Phase). Tidak ditemukannya kasus melanoma tahap awal disebabkan oleh kurangnya pengetahuan tenaga medis dan masyarakat akan gejala melanoma secara dini. Gejala melanoma awal serupa dengan lesi kulit lain yang berpigmen seperti nevus melanositik, nevus biru (blue nevus) serta pigmented basal cell carcinoma sedangkan melanoma amelanotik dapat memberikan gejala yang serupa dengan pyogenic granuloma, hemangioma atau basal cell carcinoma (Paek, 2008).

Ditemukannya kasus melanoma pada stadium lanjut disebabkan oleh jenis pertumbuhan melanoma yang termasuk pola pertumbuhan vertikal (Vertical Growth Phase) sehingga tumor dapat melakukan invasi pada struktur kulit bagian bawah dalam waktu singkat, tanpa atau belum melakukan penyebaran secara horisontal. Hal ini berbeda dengan kasus yang ditemukan di negara barat dimana sebagian besar berupa melanoma dengan penyebaran superfisial (Superficial Spreading Melanoma) yang menunjukkan pola penyebaran secara horisontal.

Berkembangnya sel melanosit menjadi nevus melanositik dan melanoma maligna yang tumbuh secara vertikal melalui beberapa tahapan. Mutasi paling awal ditemukan pada gen NRAS dan BRAF yang tergolong dalam jalur MAP kinase. Mutasi ini menyebabkan sel melanosit berproliferasi dan membentuk nevus melanositik. Proliferasi sel nevus bersifat terbatas dimana pada suatu titik tertentu akan berhenti karena sel mengalami senescence. Proses senescence dipengaruhi oleh gen p16INK4a yang

merupakan tumor supresor gen, yang berperan dalam jalur gen retinoblastoma (Rb). Tahap berikut dalam terjadinya melanoma adalah Nevus displastik yang memiliki kemampuan menghindari dari proses senescence. Proses terjadinya nevus displastik melibatkan mutasi pada gen p16INK4a dan CDK4 yang berperan dalam jalur Rb. Kedua gen ini dikenal sebagai gen susceptibilitas melanoma. Aktivasi telomerase pada nevus displastik menghasilkan perubahan menjadi melanoma dengan pertumbuhan radial / horisontal yang menghasilkan sel melanosit imortal (dapat berproliferasi terus tanpa mengalami proses senescence) akan tetapi pertumbuhan sel tumor masih bergantung pada sel keratinosit di sekitarnya. Tahap akhir dari progresi melanoma adalah melanoma dengan pola pertumbuhan vertikal yang bersifat invasif dan tidak bergantung pada keratinosit. Proses ini melibatkan mutasi pada jalur penghambat apoptosis. (Ha Linan, 2008; Bennet C Dorothy 2003).

Ekspresi protein p53 pada melanoma maligna

Pada sel normal didapatkan molekul p53 wild type yang berfungsi mengendalikan replikasi DNA. Mutasi pada gen p53 menghasilkan protein p53 mutan serta hilangnya fungsi p53 wild type untuk mengendalikan siklus sel. Ekspresi protein p53 mutan merupakan perubahan yang umum didapatkan pada berbagai jenis kanker pada manusia. Gen p53 terletak pada lokus kromosom 17p13 yang umumnya mengalami delesi. Penelitian struktur kromosom pada melanoma didapatkan bahwa terjadi banyak perubahan kromosom pada melanoma primer tetapi mutasi pada kromosom 17 tempat gen p53 jarang ditemukan. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi gen p53 kurang berperan dalam terjadinya melanoma (Stretch, 1991).

Pada penelitian ini ekspresi protein p53 mutan didapatkan pada 5 dari 10 kasus melanoma, dengan kurang dari 10% sel tumor yang terwarnai sedangkan pada kasus nevus melanositik tidak ada kasus yang memberikan reaksi p53 positif. Menurut analisis statistik tidak didapatkan peningkatan ekspresi protein p53 mutan secara bermakna pada melanoma maligna dibandingkan nevus

melanositik ($p = 0,129$; $p > 0,05$).

Proses pertumbuhan melanoma maligna melibatkan dua jalur mutasi yaitu gen p53 atau gen p16INK4a sebagai tahap untuk menghindari proses senescence. Walaupun peran inaktivasi gen p16INK4a dalam melanoma sudah dapat dipastikan, peranan mutasi gen p53 masih belum dapat dijelaskan sepenuhnya. Secara normal gen p53 dapat mencegah terjadinya tumor dengan menjaga stabilitas genom, penghentian siklus sel pada tahap tertentu, induksi apoptosis serta menghambat aktivitas transkripsi gen yang berperan pada progresi tumor (Milyavsky, 2005) sehingga gen p53 dikenal sebagai gen penjaga (guardian genome). Frekuensi mutasi gen p53 pada melanoma dilaporkan lebih rendah dibanding dengan tumor ganas lainnya (Rodolfo, 2005). Penelitian Yang et al menemukan mutasi gen p53 pada 25% kasus melanoma. Mekanisme perubahan yang menyebabkan kerusakan jalur p53 terletak pada lokus CDKN2A berakibat mutasi pada gen ARF (alternatif reading frame) dan p16. ARF berperan menjaga aktivitas fungsional p53 sedangkan p16 lebih berperan pada jalur retinoblastoma (Rb). Delesi pada ekson CDKN2A mengganggu kedua jalur tersebut.

Walaupun pada umumnya mutasi melibatkan salah satu jalur di atas, mutasi gen p53 dan p16 secara bersamaan dapat terjadi pada beberapa kultur sel melanoma yang seringkali berhubungan dengan mutasi BRAF. Mutasi yang bersamaan ini ditemukan pada penderita dengan survival yang rendah (Daniotti, 2004).

Sebagai gen penjaga, gen p53 berfungsi dalam perbaikan DNA sel pada kulit yang rusak karena berbagai macam faktor seperti sinar ultraviolet, obat yang diberikan secara topikal serta iritasi kronis. Mutasi gen p53 pada kulit telah terbukti berperan dalam terjadinya karsinoma sel skuamous sedangkan pemberian p53 wild type dapat menghentikan pertumbuhan sel kanker dan menginduksi apoptosis. Analisis proses perkembangan dan progresi melanoma menunjukkan bahwa mutasi genetik p53 pada melanoma sedikit ditemukan sedangkan peningkatan ekspresi p73 yang termasuk keluarga gen p53, berhubungan dengan progresi dari melanoma primer menjadi metastasis. Keluarga gen p53 terbukti berperan dalam

perbaikan kerusakan DNA pada melanosit, proses apoptosis dan penghentian siklus sel melanosit (Johnson, 2005).

PENUTUP

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Tidak didapatkan peningkatan bermakna ekspresi protein p53 mutan pada melanoma maligna dibanding dengan nevus melanositik.

Daftar Pustaka

- Bastian C Boris, LeBoit E Phillip, Hamm Henning, Brocker Eva-Bettina and Pinkel Dan, 1998. Chromosomal Gains and Losses in Primary Cutaneous Melanomas Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research* 58 : 2170-2175.
- Bennett C Dorothy, 2003. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes, *Oncogene* 22: 3063-3069.
- Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, 2004. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 23;5968-5977.
- Djarwanto, 2007 : Statistik Nonparametrik Edisi 4, Yogyakarta. 30-35, 75-80
- Djuanda Adhi, Hamzah Mochtar, Aisah Siti, 1999 : Ilmu Penyakit Kulit dan kelamin Edisi 3, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 221-223.
- Ha Linan, Merlino Glenn, and Sviderskaya V Elena, 2008. Melanomagenesis : Overcoming the Barrier of Melanocyte Senescence, *Cell Cycle*, Juli I; 7(13); 1944-1948.
- Harahap M, 2000. Ilmu Penyakit Kulit, Hipokrates. Jakarta, 228-235
- Johnson Jodi, Lagowski James, Sundbert Alexandra and Kulesz-Martin Molly, 2005. P53 Family Activities in Development and Cancer : Relationship to Melanocyte and Keratinocyte Carcinogenesis, *J Invest Dermatol* 125: 857-864.
- Milyavsky M, Tabach Y, Shats I, 2005. Transcriptional programs following genetic alterations in p53, INK4A and H-Ras genes along defined stages of malignant transformation. *Cancer Res* 11 :4530-4543.
- Paek SC, Sober AJ, Tsao H, 2008, Cutaneous melanoma in : Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K editor, Fitzpatrick's Dermatology in general medicine 7th ed New York: Mc Grow Hill, p 1134-1157.
- Rodolfo M, Pierotti MA and Parmiani G, 2005. A Merging Duo in melanoma Formation, *The society for Investigative Dermatology*, p1242-1251.
- Stretch JR, Gatter KG, Ralfkiar E, Iane DP and Harris AI, 1991. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Resear* Ch51. Nov I, p5976-5979
- Ugurel Selma, Utikal Jochen, and Becker C Jurgen, 2009. Tumor Biomarkers in Melanoma, *Cancer Control* Juli, 16 (3), 219 – 224.