

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/283724832>

γ -H2AX DAN POTENSINYA UNTUK BIOMARKER PREDIKSI TOKSISITAS RADIASI PADA RADIOTERAPI

Conference Paper · August 2015

CITATIONS

0

READS

140

6 authors, including:



lin Kurnia

National Nuclear Energy Agency, Jakarta, Indo...

19 PUBLICATIONS 12 CITATIONS

SEE PROFILE



Yanti Lusiyan

Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta

12 PUBLICATIONS 3 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Detection Biomarker Gamma H2AX, 53BP1 in High Background Natural Radiation Area Resident [View project](#)



Detection Biomarker Gamma H2AX, 53BP1 in medical radiation worker [View project](#)

All content following this page was uploaded by [lin Kurnia](#) on 13 November 2015.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

γ - H2AX DAN POTENSINYA UNTUK BIOMARKER PREDIKSI TOKSISITAS RADIASI PADA RADIOTERAPI

Iin Kurnia, Yanti Lusiyanti

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN

ABSTRAK

γ -H2AX DAN POTENSINYA UNTUK BIOMARKER PREDIKSI TOKSISITAS RADIASI PADA RADIOTERAPI Ekspresi tinggi histon γ -H2AX, penanda yang sensitif dari kerusakan DNA, mungkin menjadi indikasi adanya cacat jalur perbaikan DNA atau ketidakstabilan genomik, ketidakstabilan genom ini diawali dengan adanya mutasi yang dapat menyebabkan terjadinya kanker. Kerusakan DNA dapat disebabkan oleh adanya pajanan radiasi ionik. Pajanan radiasi ini dapat terjadi pada pajanan radiasi yang disengaja atau buatan seperti pada tindakan radioterapi. Pada makalah ini akan dibahas γ -H2AX pada perbaikan DNA akibat pajanan radiasi pengion dan potensinya sebagai biomarker prediksi toksisitas radiasi pada radioterapi.

Kata Kunci : γ -H2AX, kerusakan DNA, radioterapi.

ABSTRACT

γ -H2AX AND ITS POTENTIAL AS A BIOMARKER RADIATION TOXICITY AND GENOME INSTABILITY IN RADIOTHERAPY. High expression of histone γ -H2AX, a sensitive marker of DNA damage, may be an indication of defective DNA repair pathway or genomic instability, this genome instability that begins with the presence of mutations that can cause cancer. DNA damage can be caused by ionic radiation exposure. Radiation exposure can occur in accidental radiation exposure or artificial like the action radiotherapy. This paper will be discussed γ -H2AX in DNA repair due to exposure to ionizing radiation and its potential as a biomarker predictive toxicity of radiation in radiotherapy.

Keyword : γ -H2AX, DNA damage, radiotherapy

I. PENDAHULUAN

Sejumlah jalur perbaikan kerusakan DNA merupakan bagian dari mekanisme tubuh melindungi sel-sel terhadap ketidakstabilan genetik. Hubungan adanya gangguan perbaikan DNA dengan penyakit kerusakan bersifat autosomal resesif maupun keganasan atau dan tumorigenesis. Penyakit kerusakan autosomal resesif ini misalnya dapat dijumpai pada kasus Ataksia telangiectasia, Anemia Fanconi dan sindrom kerusakan kromosom Nijmegen [1-3]. Sedangkan berkurangnya kapasitas perbaikan DNA yang terkait dengan adanya tumorigenesis dapat dijumpai predisposisi kasus kanker

payudara yang muncul secara sporadik dan turunan [4]. Di sisi lain gangguan kerusakan DNA juga berhubungan dengan peningkatan radiosensitifitas yang menimbulkan efek samping pajanan radiasi pengion pada radioterapi [5].

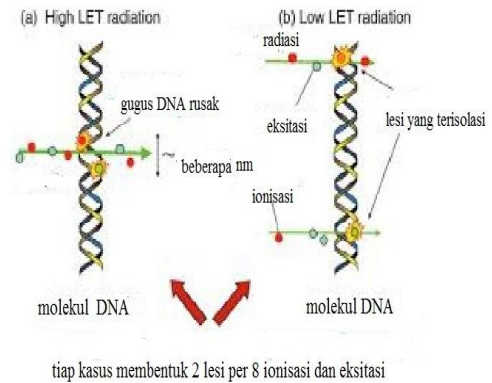
Kerusakan DNA pada dasarnya dapat dipelajari dengan penggunaan berbagai tes seperti adanya pengamatan foci γ -H2AX aberasi kromosom, mikronukleus, fragmentasi DNA dengan cara Comet Assay dan lain lain [6]. Pengamatan foci γ -H2AX pertama kali ditemukan pada DNA yang mengalami kerusakan akibat pajanan radiasi pengion.

Ekspresi γ -H2AX juga berfungsi sebagai penanda lanjut untuk mendeteksi proses perbaikan DNA dan integritas DNA [7]. Ekspresi foci γ -H2AX diduga menunjukkan gangguan jalur perbaikan kerusakan DNA atau ketidakstabilan genetik pada kasus kanker payudara [8].

Dalam makalah ini akan dibahas proses kerusakan DNA akibat radiasi, hubungannya dengan ketidakstabilan genom dan potensi penelitian γ -H2AX sebagai biomarker prediksi toksisitas radiasi dan ketidakstabilan genom pada radioterapi.

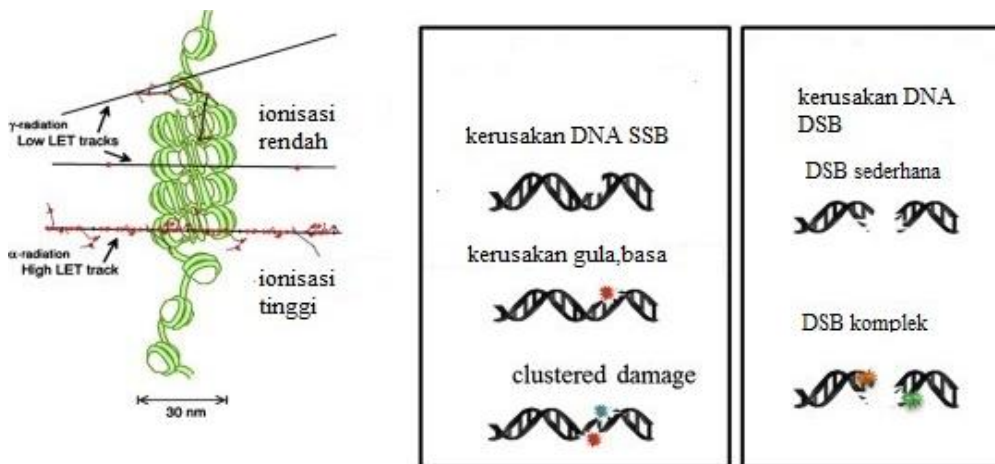
II. RADIASI DAN KERUSAKAN DNA

Radiasi pengion yang termasuk radiasi elektromagnetik atau foton, merupakan jenis radiasi yang banyak digunakan untuk pengobatan pasien pada radioterapi. Radiasi pengion dapat menimbulkan kerusakan pada material biologis dengan cara mengionisasi atau mengeluarkan elektron dan kekuatannya akan berkurang jika energi yang diterima dari telah habis [9]. Secara umum pengaruh paparan radiasi pengion yang terdiri dari *High LET* dan *Low LET* dapat dilihat pada Gambar 1 dibawah ini:



Gambar 1. Pengaruh pajanan radiasi terhadap molekul DNA [10]

Berbagai bukti dalam penelitian secara radiobiologi menyimpulkan bahwa DNA sebagai target utama yang menentukan pengaruh radiasi pengion pada sel. Radiasi pengion dapat menimbulkan spektrum yang luas lesi DNA meliputi kerusakan basa nukleotida (base kerusakan), DNA untai tunggal istirahat (SSBs) dan istirahat untai ganda (DSBs). Adanya lesi pada DNA akibat radiasi pengion ini juga dapat dijadikan dasar untuk memahami kematian sel akibat radiasi, transformasi sel dan karsinogenesis, melalui penginduksian mutasi gen dan penyimpangan kromosom [5,11]. Pengaruh radiasi pengion terhadap terbentuknya SSB dan DSB DNA dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini:



Gambar 2. SSB dan DSB DNA yang ditimbulkan oleh radiasi pengion [12]

Kerusakan DNA berupa SSB akibat radiasi mempunyai potensi yang kecil untuk menimbulkan mutasi pada gen dan dianggap sebagai kerusakan DNA yang tidak begitu penting pada sel mamalia, karena kerusakan ini relatif dapat diperbaiki. Di sisi lain kerusakan DNA DSB dianggap paling relevan dalam menginduksi terjadinya mutasi sebagai awal gangguan integritas genom. Ini disebabkan bila terjadi kegagalan atau ketidaksempurnaan perbaikan kerusakan DNA. DSB juga berpotensi terjadinya penyimpangan kromosom dan kematian sel [13].

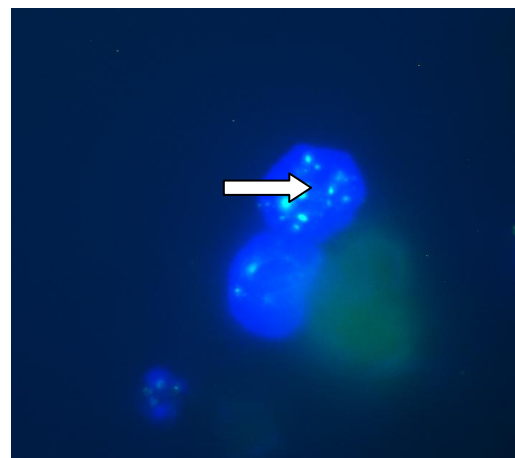
Disamping pajanan radiasi pengion, DSB juga dapat dihasilkan dalam sejumlah proses alam termasuk metabolisme oksidatif, replikasi, meiosis, dan produksi dan pembentukan antibodi. Genom mempunyai kemampuan untuk memperbaiki DSB dan memastikan bahwa perbaikan dilakukan secara sempurna. Ada dua jalur perbaikan DSB utama yakni rekombinasi homolog (RH) dan *non homolog end join* (NHEJ). Meskipun untuk kepentingan relatif berbeda kedua jalur perbaikan DNA ini pertama kali dipelajari pada *Saccharomyces cerevisiae* dan selanjutnya pada sel mamalia. Secara umum, HR mendominasi DSB perbaikan dalam ragi dan NHEJ dalam sel mamalia. HR adalah jalur perbaikan yang mempunyai presisi yang tinggi dan efisien dalam proses perbaikan DSB. HR mengambil informasi genetik yang hilang di ujung yang rusak dari kromatid rusak atau kromosom homolog, dalam proses perbaikan jalur HR ini dibantu oleh protein Rad 52 [14].

Perbaikan DNA melalui jalur NHEJ adalah melalui proses penggabungan kembali kedua ujung dari DSB tanpa persyaratan urutan homologi antara kedua ujung dengan bantuan protein Ku70 dan Ku80 protein (XRCC5), yang bergabung dengan DNA yang rusak dan berfungsi melindungi DNA dari penguraian oleh enzim exonuclease. Ku heterodimer berikatan dengan subunit katalitik dari DNA-PK (XRCC7, DNA-PKCS) untuk membentuk aktif DNA-PK holoenzyme. DNA-PKCS diaktifkan oleh interaksi dengan DNA untai tunggal di lokasi

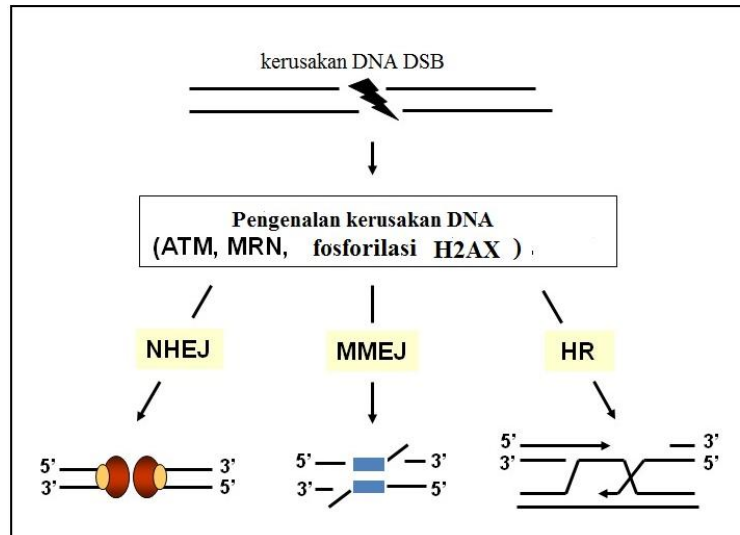
DSB dan menampilkan aktivitas kinase Ser / Thr. XRCC4 membentuk kompleks stabil dengan DNA ligase IV, dan kompleks ini mengikat ujung molekul DNA dan membentuk molekul DNA duplex sampai proses perbaikan berakhir. Setelah perbaikan berakhir, faktor NHEJ ini lepas dari DNA dan akan terbentuk kembali jika ditemukan DSBs yang baru. Jika terjadi interaksi antara ujung dari DSBs yang berbeda maka akan dapat menghasilkan translokasi kromosom tumorigenik [14].

III. γ -H2AX DAN PERBAIKAN KERUSAKAN DNA

Fosforilasi dari histon H2A varian γ -H2AX pada Serin139 merupakan peristiwa penting dalam respon seluler untuk agen genotoksik yang menyebabkan DNA untai ganda (DSBs) berhenti [1]. Fosforilasi ini dapat dimediasi oleh protein kinase yang berbeda, termasuk ataksia telangiectasia bermutasi (ATM) dan anggota lain dari *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) kelompok protein termasuk kelompok protein kinase [8]. Dengan teknik imunohistokimia ekspresi γ -H2AX dapat dilihat pada Gambar 3 dan hubungannya dengan proses kerusakan dan perbaikan DNA dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Foci γ H2AX pada limposit pasca irradiasi 4 Gy setelah 72 jam (aslinya 10 x 100)



Gambar 4. Hubungan DSB dan γ -H2AX dan proses perbaikan DNA [15]

Ratusan molekul γ -H2AX di kromatin mengelilingi DSB terfosforilasi pada residu ini, yang dapat ditampilkan sebagai fokus inti dengan mikroskop imunofluoresens [16]. Serin 139 molekul H2AX terfosforilasi disebut sebagai γ -H2AX. Pembentukan ini γ -H2AX terfokus di sekitar setiap DSB memfasilitasi perekrutan perbaikan DNA dan factor sinyal pemeriksaan. Ada bukti kuat bahwa DSB memberikan sinyal utama untuk γ -H2AX terfosforilasi [17]. Dengan demikian, kuantifikasi γ -H2AX fokus telah muncul sebagai penanda secara luas digunakan dari DSBs yang terdeteksi oleh sel. Setelah perbaikan DSBs, maka akan terjadi defosforilasi γ -H2AX di Serin 139 dan foci γ -H2AX tidak dapat lagi diamati dalam inti sel, dan dimulai kembali siklus sel dan pemeliharaan homeostasis sel. Fungsi penting ini dapat dilakukan dengan adanya p53 *wild type* [18-20].

IV. POTENSI PEMERIKSAAN γ -H2AX PASIEN RADIOTERAPI DI INDONESIA

Walau telah dilakukan usaha untuk membatasi eskalasi dosis dalam pengobatan radioterapi kanker tetapi tetap ada risiko akhir reaksi jaringan normal [21] Terlepas dari kasus yang jarang terjadi ketika kerusakan jaringan

akut yang parah akut, namun reaksi jaringan terhadap radiasi dapat terjadi beberapa bulan sampai atau tahun setelah selesai perawatan [22]. Pada individu yang tidak memiliki fenotipe karakteristik sindrom klinis radiosensitif langka, urutan temporal ini perubahan klinis mencegah identifikasi individu pada peningkatan risiko toksisitas akhir parah [22]. Uji apoptosis berbasis limfosit juga dapat dilakukan untuk memprediksi radiosensitifitas klinis lebih andal [23].

Meskipun banyak yang diketahui tentang peristiwa sinyal sekitarnya induksi ATM-dimediasi apoptosis, peraturan mekanistik antara kerusakan DNA sinyal dan kematian sel berikut paparan radiasi pengion tidak jelas. Akhir-akhir ini diduga adanya keseimbangan antara proses seluler tersebut diatur oleh fosforilasi Serin 139 dan Tirosin 142 pada histon varian 2A (γ -H2AX) [24].

Perbaikan DSB dan induksi apoptosis pada *ex vivo* yang limfosit darah pasien radioterapi payudara mengungkapkan tingkat yang lebih tinggi dari sisa foci γ -H2AX / 53BP1 pada antara individu sangat sensitive terjadap pajanan radiasi dengan ditandai reaksi negatif terhadap radioterapi payudara dibandingkan dengan kelompok control. Dari data ini tersebut bahwa perbaikan DSB fenotip sel terganggu dapat dikaitkan dengan radiosensitif klinis pada

beberapa pasien radioterapi reaksi akhir jaringan normal. Meskipun demikian, ukuran sampel kecil dari penelitian ini menghalangi dukungan untuk DSB perbaikan uji berbasis limfosit untuk memprediksi radiosensitif jaringan normal. Penurunan jumlah DSB karena bergabung meningkatkan kecenderungan untuk sel untuk menjalani apoptosis yang diatur oleh fungsi ATM yang aktif [25].

Disamping menimbulkan efek samping toksisitas jaringan normal, radioterapi juga berpotensi menimbulkan kanker sekunder. Toksisitas jaringan normal disamping menimbulkan peluang gangguan fungsi normal organ yang berada disekitar organ atau jaringan target radioterapi (seperti pada kanker nasofaring, kanker paru dan kanker prostat serta kanker payudara) [26-29]. Kanker sekunder ini berawal dengan adanya ketidakstabilan genom yang disebabkan oleh mutasi pada gen gen penekan tumor dan diturunkan antar generasi dan berperan dalam proses karsinogenesis. Mutasi ini dapat disebabkan radiasi yang diterima pada saat radioterapi [30].

Sebagai contoh pada pengobatan kanker prostat, pada pengobatan radioterapi konvensional dengan menggunakan radiasi eksternal dan brakiterapi telah berhasil memberikan peluang hidup yang lebih lama paska pengobatan, tetapi berpotensi menimbulkan efek jangka panjang berupa kanker sekunder. Dengan teknik radioterapi terbaru seperti IMRT walau dapat mengurangi eskalasi dosis namun perbedaan distribusi dosis dan *scatter* juga meningkatkan peluang terjadinya kanker sekunder. Pada radioterapi menggunakan photon, terdapat potensi radiasi sekunder yang terdiri dari foton dan neutron seperti yang dijumpai pada pemberian radioterapi kanker kepala dan leher. Efek biologis dari foton dan neutron sekunder ini sampai saat ini masih diperdebatkan [31].

Di Indonesia radioterapi digunakan pada sejumlah kasus kanker seperti kanker nasofaring, kanker payudara dan kanker paru paru serta kanker prostat. Tidak jarang radiasi ini juga akan berpotensi mempunyai dampak sampingan atau toksisitas sejumlah organ

penting dan faktor estetika. Pada kondisi ini penggunaan biomarker seperti pengamatan foci γ -H2AX menjadi penting.

V. PENUTUP

Penggunaan radioterapi pada pengobatan penyakit kanker sudah merupakan keniscayaan, penggunaan biomarker γ -H2AX untuk memprediksi toksisitas jaringan normal dan timbulnya ketidakstabilan genom yang dapat menginduksi terjadinya kanker sekunder juga perlu diperhatikan untuk mengantisipasi dampak negatif dari radioterapi.

DAFTAR PUSTAKA

1. LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998, 396:643–649.
2. THOMPSON LH, SCHILD D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 2002, 509:49–78.
3. CARNEY JP. Chromosomal breakage syndromes. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:443–447.
4. ROTHFUß A, SCHÜTZ P, BOCHUM S, VOLM T, EBERHARDT E, KREIENBERG R, VOGEL W, SPEIT G. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res* 2000, 60:390–394.
5. JOINER MC, ALBERT KVD, STEEL GG. Introduction: the significance of radiobiology and radiotherapy for cancer treatment in Joiner MC, Albert KVD (Ed) *Basic Clinical Radiobiology* Hodder Arnold Company 2009.
6. DJUZENOVA CS, ELSNER I, ELSNER I, KATZER A, WORSCHKECH E, DISTEL LV, FLENTJE M, AND POLAT B. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone γ -H2AX and 53BP1 foci. *Radiation Oncology* 2013, 8:98.
7. REDON CE, WEYEMI U, PAREKH PR, HUANG D, BURRELL AS, BONNER

- WM. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1819, 2012:743–756.
8. NAGELKERKE A, VAN KUIJK SJ, SWEEP FC, NAGTEGAAL ID, HOOGERBRUGGE N, MARTENS JW, TIMMERMANS MA, LAARHOVEN HW, BUSSINK J, SPAN PN. Constitutive expression of γ -H2AX has prognostic relevance in triple negative breast cancer. *Radiother Oncol* 2011, 101:39–45.
 9. GOODHEAD DT, Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA, *Int Journal Rad Biol* 1994,65:7-17
 10. URUSHIBARA, A., YOKOYA, A. et al., DNA Damage Induced by the Direct Effect of He Ion Particles, *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 122, no.1-4, 2006, p.163-165.
 11. LEHNERT, S. *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*, Taylor and Francis Group, LLC, 2007.
 12. LOMAX ME, FOLKES MK, ONEILL P. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*, 2013;25(10):578-585.
 13. HOEIJMAKERS, JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer *Nature* 2001, 411, 366–74.
 14. HAN W, YOU KN. Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation. In Kevin V, Urbano (Ed) *Advances in Genetics Research*. Volume 4. Nova Science Publication.
 15. <http://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/emerging-features-of-dna-double-strand-break-repair-in-humans#> (di akses Rabu, 5-8-2015).
 16. PILCH DR, SEDELNIKOVA, OA, REDON C, CELESTE A, NUSSENZWEIG A, BONNER WM. Characteristics of γ -H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem. Cell Biol.* 2003, 81, 123–129.
 17. FERNANDEZ CA, NUSSENZWEIG M, NUSSENZWEIG A. H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA Repair* 2004, 3, 959–967.
 18. MACŮREK L, LINDQVIST A, VOETS O, KOOL J, VOS HR, MEDEMA RH. WIP1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates γ H2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* 2010, 29, 2281–2291.
 19. MOON, SH, LIN L, ZHANG X, NGUYEN TA, DARLINGTON Y, WALDMAN AS, LU X, DONEHOWER LA. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant γ -H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 12935–22947.
 20. CHA H, LOWE JM, LI, H, LEE JS, BELOVA GI, BULAVIN DV, FORNACE AJ. WIP1 directly dephosphorylates γ -H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res.* 2010, 70, 4112–4122.
 21. HALL EJ, WU CS, Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;1(56):83-91.
 22. CHUA ML, SOMAIAH N, A'HERN R, DAVIES S, GOTHARD L, YARNOLD J, ROTHKAMM K Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiother Oncol* 2011; 99:362–366.
 23. Calle ´n E, Jankovic M, Wong N, Zha S, Chen HT, Difilippantonio S, Di Virgilio M, Heidkamp G, Alt FW, Nussenzweig A, Nussenzweig M (2009) Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell* 34:285–297.
 24. XIAO A, LI H, SHECHTER D, FABRIZIO LA, ERDJUMENT-BROMAGE H, XIAO

- A, LI H, SHECHTER D, FABRIZIO LA, ERDJUMENT-BROMAGE H. WSTF regulates the H2AX DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*;2009 457:57–6.
25. HORN S, STEPHEN B, DARREN B, PRISE MK, AND ROTHKAMM K. Combined Analysis of Gamma-H2AX/53BP1 Foci and Caspase Activation in Lymphocyte Subsets Detects Recent and More Remote Radiation Exposures. *Radiation Research* 2013;180(6):603-609.
26. MAYADAGLI A, YAPRAK1 G, TEZCAN Y. Evaluation of Late Radiation Side Effects in Nasopharyngeal Cancer Patients. *International Journal of Hematology and Oncology*;2012;22(4):261-266.
27. ONISHI H, SHIRATO H, MD,NAGATA Y, HIRAOKA M, MD, FUJINO M, GOMI K. *et al.*. Hypofractionated Stereotactic Radiotherapy (Hypo FXSRT) for Stage I Non-small Cell Lung Cancer: Updated Results of 257 Patients in a Japanese Multi-institutional Study. *J Thorac Oncol.* 2007;2: Suppl 3, S94–S100.
28. ARNOLD L. POTOSKY, WILLIAM W. DAVIS, RICHARD M. HOFFMAN, JANET L. STANFORD, ROBERT A. STEPHENSON, DAVID F. PENSON, LINDA CH. Five-Year Outcomes After Prostatectomy or Radiotherapy for Prostate Cancer: The Prostate Cancer Outcomes Study. *Journal of the National Cancer Institute*; 2004 Vol. 96, No. 18,1358-1367.
29. SARAH CD, MARIANNE E, PAUL MG, ANNA MB, ULLA BG, DORTHE B *et al.*. Risk of Ischemic Heart Disease in Women after Radiotherapy for Breast Cancer. *The new England Journal of Medicine*;2013;368(11):987-998
30. BRENNER DJ. Induced second cancers after prostate-cancer radiotherapy: no cause for concern?. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*; 2006; Vol. 65, No. 3, pp. 637–639.
31. HOWELL RM, HERTELL NE, WANG Z, HUTCHINSON J, FULLERTON GD.

Calculation of effective dose from measurements of secondary neutron spectra and scattered photon dose from dynamic MLC IMRT for 6 MV, 15 MV, and 18 MV beam energies. *Med Phys* 2006;33(2):360-367.

TANYA JAWAB

1. Penanya: Endah

Pertanyaan:

- Ekspresi tinggi γ -H2AX yang bagaimana yang digunakan sebagai penanda?
- Bagaimana membedakan ekspresi tersebut akibat toksisitas radiasi dan kerusakan DNA akibat dari yang lain?

Jawaban:

- Yang jumlahnya >5 /tiap sel
- Sama-sama sitotoksik, sama ekspresinya jadi tidak dapat dibedakan

2. Penanya: Fadil Nasir

Pertanyaan:

- Maksud penelitian ini bertujuan untuk apa?
- Apakah ada ekspresi gen lain sebelum ini?

Jawaban:

- Makalah ini masih kajian literatur
- Untuk tahap awal sampel akan diambil pada pekerja radiasi (radiodiagnostik)
- Bisanya juga terkait dengan ekspresi protein P53