

PENGARUH TRANSFEKSI ONKOGEN *c-raf-1* TERHADAP RADIOSENSITIVITAS SEL KANKER LARYNX

Zubaidah Alatas

Pusat Standardisasi dan Penelitian Keselamatan Radiasi - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

PENGARUH TRANSFEKSI ONKOGEN *c-raf-1* TERHADAP RADIOSENSITIVITAS SEL KANKER LARYNX. Radiosensitivitas sel kanker larynx PCI-4A yang ditransfeksi dengan onkogen normal *c-raf-1* cDNA (PCI-4A-raf) dan onkogen mutan *c-raf-1* cDNA (PCI-4A-raf^{*}) dipelajari secara *in vitro*. Onkogen mutan *c-raf-1* hanya mengandung kode untuk aktivitas produksi protein kinase Raf-1. Sel diradiasi dengan mesin AECL Theratron 80 Co-60 dengan dosis 1 Gy - 13 Gy. Data dianalisis dengan menggunakan 2 model kurva daya tahan hidup, single hit multitarget dan linear quadratic. Parameter radiobiologi yang diamati adalah D_0 , n , α , β , dan fraksi sel yang hidup pada dosis 2 Gy. Penelitian ini menyimpulkan bahwa transfeksi onkogen normal dan mutan meningkatkan index radiosensitivitas sel kanker larynx (PCI-4A, $D_0 = 2,01$ Gy; PCI-4A-raf, $D_0 = 2,90$ Gy; PCI-4A-raf^{*}, $D_0 = 3,80$ Gy). Ketahanan sel terhadap radiasi pengion dapat ditingkatkan tidak hanya dengan meningkatkan ekspresi dari onkogen normal *raf*, juga dengan meningkatkan aktivitas protein kinase serine/threonine Raf-1.

ABSTRACT

EFFECT OF TRANSFECTION OF *c-raf-1* ONCOGENE ON THE RADIOSENSITIVITY OF THE LARYNGEAL CANCER CELL LINE. The *in vitro* radiosensitivity of the laryngeal cancer cell line PCI-4A transfected with a normal *c-raf-1* cDNA oncogene (PCI-4A-raf) or with an activated mutant *c-raf-1* cDNA oncogene (PCI-4A-raf^{*}) was studied. The mutant *c-raf-1* contains codes for the kinase domain of Raf-1 only. Cells were irradiated by AECL Theratron 80 Co-60 machine with doses of 1 Gy - 13 Gy. The data was fitted to two survival curves used, single hit multitarget and linear quadratic models. Radiobiological parameters studied were D_0 , n , α , β , and surviving fraction at 2 Gy. This study concludes that the transfection of normal *c-raf-1* cDNA and of activated mutant *c-raf-1* oncogene increase the index of radiosensitivity of laryngeal cancer cell lines (PCI-4A, $D_0 = 2.01$ Gy; PCI-4A-raf, $D_0 = 2.90$ Gy; PCI-4A-raf^{*} = 3.80 Gy). The radioresistance of the cells can be enhanced not only by increase the expression of *c-raf-1* oncogene, but also by increase the activity of serine/threonine kinase of Raf-1 protein.

PENDAHULUAN

Paparan radiasi pengion pada sel mamalia menimbulkan kerusakan pada sasaran kritis DNA yang mengakibatkan terjadinya mutasi, kematian sel, atau transformasi [1]. Beberapa penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa onkogen sebagai gen yang ekspresinya dapat mengubah sel normal menjadi sel kanker mempunyai peranan yang penting dalam menentukan daya tahan sel terhadap radiasi [2]. Onkogen yang dimaksud yang banyak ditemukan pada sel kanker adalah onkogen keluarga *ras*, *myc*, dan *raf*.

Secara normal, protein sebagai hasil ekspresi dari onkogen (proto-onkogen) ini terlibat didalam proses pembelahan sel dan/atau proses diferensiasi sel. Diduga perubahan ekspresi onkogen secara tidak normal atau onkogen yang teraktivasi dapat mempengaruhi daya tahan

hidup sel kanker terhadap radiasi pengion. Onkogen dapat diaktifasi dengan adanya mutasi titik, translokasi kromosom, atau amplifikasi (perbanyak) gen [3]. Perubahan aktivitas dari onkogen dapat diketahui dengan menggunakan metode transfeksi DNA yaitu pemindahan molekul DNA dari sel kanker atau sel yang diuji ke sel lain sebagai penerima [1].

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh transfeksi onkogen manusia *c-raf-1* baik yang normal (raf) maupun yang mutan (raf^{*}) terhadap sensitivitas sel kanker larynx terhadap radiasi sinar γ .

TEORI

Tingkat radiosensitivitas sel mamalia dapat dipelajari dengan menggunakan kurva daya tahan hidup sel terhadap radiasi pengion. Kurva ini menggambarkan hubungan antara dosis

radiasi yang diberikan dengan jumlah sel yang hidup yang ditunjukkan dengan kemampuan dari sel tersebut untuk membentuk koloni [1].

Dua macam model kurva daya tahan hidup yang digunakan dalam penelitian ini adalah single hit multitarget (SHMT) dan linear quadratic (LQ). Pada model SHMT diasumsikan bahwa sebuah sel mamalia mempunyai beberapa sasaran kritis (multitarget) yang berperan penting dalam proses reproduksi sel yang harus diaktifkan dengan sebuah pukulan (single hit) untuk mematikan sel tersebut. Umumnya, kurva daya tahan hidup model SHMT diawali dengan daerah yang melengkung (shoulder) dan diikuti dengan garis lurus. Kurva SHMT yang ditunjukkan pada Gambar 1A mempunyai persamaan sebagai berikut:

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$$

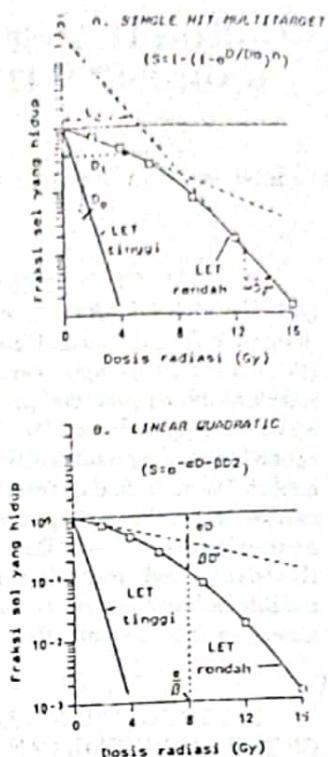
S adalah fraksi sel yang tahan hidup setelah diiradiasi (surviving fraction) dan D adalah dosis iradiasi yang diberikan. D_0 sebagai *mean lethal dose* didefinisikan sebagai dosis yang dibutuhkan untuk menurunkan fraksi sel yang tahan hidup menjadi 37% dari jumlah sel semula. D_0 yang menunjukkan kemiringan dari kurva ini menggambarkan indeks radiosensitivitas dari sel. Sedangkan n adalah nomor ekstrapolasi (extrapolation number) yang menunjukkan kemampuan dari sel untuk mengakumulasi dan menyembuhkan kerusakan subletal pada sel akibat radiasi. Nilai n ini diperoleh dengan menarik garis lurus dari bagian lurus kurva ke sumbu y [1].

Kematian sel, pada model LQ, diasumsikan karena adanya interaksi dari kerusakan-kerusakan pada sel akibat radiasi pengion yang disebabkan oleh dua komponen yaitu α dan β . Kurva model LQ (Gambar 1B) mempunyai persamaan sebagai berikut:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Komponen merupakan komponen yang seimbang dengan dosis radiasi dan mendominasi kematian sel pada dosis rendah. Sedangkan komponen β merupakan komponen yang berbanding dengan kuadrat dari dosis dan komponen yang menyebabkan melengkungnya kurva daya tahan hidup dari model LQ ini. Kontribusi dari kedua komponen ini sama pada dosis yang sama dengan ratio α/β [1].

Data penelitian dianalisis dengan program komputer yang berdasarkan pada kedua model di atas. Secara teori, fraksi sel yang hidup sete-



Gambar 1. Kurva representatif daya tahan hidup sel mamalia terhadap radiasi pengion.

lah diiradiasi (SF) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut [1]:

Jumlah koloni yang dihitung

$$SF = \frac{\text{Jumlah sel yang ditanam} \times PE/100}{\text{Jumlah sel yang ditanam}}$$

Jumlah koloni yang dihitung
tanpa diiradiasi

$$PE = \frac{\text{Jumlah sel yang ditanam}}{\text{Jumlah sel yang ditanam}} \times 100\%$$

TATA KERJA

Biakan sel kanker

Kultur sel kanker larynx yang digunakan adalah PCI-4A. Biakan yang ditransfeksi dengan onkogen normal *raf* disebut PCI-4A-*raf*, sedangkan yang ditransfeksi dengan onkogen mutan *raf* (*raf*⁺) adalah PCI-4A-*raf*⁺. Kultur sel kanker ini diperoleh dari Dr. U. Rapp (FCRDC-

NCI, NIH). Sel ditransfeksi dengan menggunakan metode transfeksi DNA kalsium fosfat. PCI-4A-raf ditransfeksi dengan vektor ekspresi yang mengandung seluruh c-raf-1 komplementer DNA (cDNA) manusia dan plasmid DNA pSV2Neo. Sedangkan PCI-4A-raf^{*} ditransfeksi dengan vektor ekspresi yang mengandung sebagian c-raf-1 yang mengatur domain kinase protein Raf dan plasmid DNA pSV2Neo [4].

Medium biakan sel kanker

Biakan sel kanker dikultur pada medium pertumbuhan MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO No. Kat. 320-1095 AJ). Medium pertumbuhan ini diperkaya dengan 15% (v/v) Fetal Bovine Serum (GIBCO, No. Kat. 230-6140 AG), 2 mM L-Glutamine (GIBCO, No. Kat. 320-5030 PE), 0,1 mM MEM-non essential amino acid (GIBCO, No. Kat. 320- 1140 AG), 10 mM Hepes pH 7,0 (GIBCO, No. Kat. 380-5630 PE), 0,4 µg/ml Hydrocortisone (SIGMA Cell Culture, Lot 41H9409), 50 IU/ml Penicilline G sodium, dan 0,05 mg/ml Streptomycin sulphate (GIBCO, No. Kat. 600-5070 PE). Kultur sel disimpan dalam inkubator pada temperatur 37°C dengan kandungan 5% CO₂ di udara.

Untuk kultur sel PCI-4A-raf dan PCI-4A-raf^{*}, 0,4 mg/ml Gentamycin Reagent Solution (G418) (GIBCO, No. Kat. 600- 5750 AS) ditambahkan pada medium pertumbuhan yang telah diperkaya.

Pengujian daya tahan hidup sel kanker terhadap radiasi

Kultur sel pada fase eksponensial dicuci dengan 10 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, BioWhittaker No. Kat. 10-543 A). Kemudian sel diberikan sekitar 4 ml 1X Tripsin-EDTA Solution (GIBCO, No. Kat. 26300-29) dan disimpan dalam inkubator selama 5 menit. Tripsin ini akan melepaskan sel-sel kanker yang menempel pada permukaan bawah botol (flask) untuk mendapatkan sel tunggal. Sel dihitung dengan menggunakan Haemocytometer. Sejumlah sel tertentu ditanam dalam flask T-25 cm² (Falcon) yang telah diisi dengan 4 ml medium pertumbuhan. Jumlah sel yang ditanam disesuaikan dengan dosis. Semakin tinggi dosis yang diberikan, semakin banyak jumlah sel yang ditanam. Untuk setiap dosis, digunakan 2 macam jumlah sel, masing-masing dengan 3 ulangan. Setelah penanaman, sel disimpan dalam inkubator selama sekitar 18 jam sebelum diiradiasi. Sel diiradiasi dengan menggunakan pesawat teletерапи Cobalt-60 Theratron 80 AECL dengan laju dosis 198,55 cGy/menit. Jumlah sel yang ditanam un-

tuk masing-masing dosis dan dosis radiasi yang diberikan adalah 500 dan 1000 untuk dosis 0 Gy (untuk efisiensi penanaman) dan 1 Gy; 1000 dan 2500 untuk dosis 2 Gy; 2500 dan 5000 untuk dosis 3 Gy; 5000 dan 10000 untuk dosis 5 Gy; 10000 dan 50000 untuk dosis 7 Gy; 50000 dan 100000 untuk dosis 9 Gy; 100000 dan 250000 untuk dosis 11 Gy; 250000 dan 500000 untuk dosis 13 Gy. Sel kemudian disimpan kembali di inkubator. Dalam waktu sekitar 10 - 14 hari, sel yang tahan hidup terhadap radiasi akan tumbuh dan membentuk koloni. Koloni diberi perwarnaan carbol fuchsin dan dihitung dengan menggunakan mikroskop. Koloni yang terdiri dari 50 sel atau lebih yang dihitung sebagai koloni yang berasal dari satu sel kanker yang tahan terhadap dosis radiasi pengion yang diberikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan teknik transfeksi DNA, beberapa macam onkogen dapat diidentifikasi pada kanker. Dari jenis onkogen yang telah dikenal seperti keluarga ras, raf, myc, dan abl, sekitar 80% adalah anggota keluarga ras [3]. Dari penelitian terdahulu diketahui bahwa ekspresi onkogen mempengaruhi sensitivitas sel terhadap radiasi pengion. Secara umum dapat dikatakan bahwa ketahanan sel terhadap radiasi pengion dipengaruhi oleh ekspresi dari onkogen tertentu [2,4,5,6].

Pada penelitian ini, digunakan onkogen manusia c-raf-1 yang diduga mempunyai peranan yang penting dalam menentukan tingkat sensitivitas sel terhadap radiasi pengion dari sel kanker larynx. Proto-onkogen c-raf-1 yang merupakan anggota dari keluarga raf dapat diubah menjadi bentuk onkogen raf yang aktif dengan proses translokasi kromosom. Hasil dari gen raf ini adalah protein Raf-1 yang merupakan protein kinase serine/threonine yang terdapat pada sitoplasma sel [7].

Kasid dkk (1989) telah membuktikan bahwa biakan sel kanker larynx SQ-20B mempunyai daya tahan hidup yang relatif tinggi terhadap radiasi γ yang dikarenakan adanya ekspresi onkogen raf (4). Hasil penelitian Kasid ini dikembangkan lagi pada penelitian ini dengan menggunakan sel kanker larynx PCI-4A, tidak hanya untuk mengetahui pengaruh transfeksi onkogen normal raf (raf) tetapi juga untuk mengetahui pengaruh transfeksi onkogen mutan raf (raf^{*}) yang hanya mengandung kode untuk memproduksi protein Raf-1.

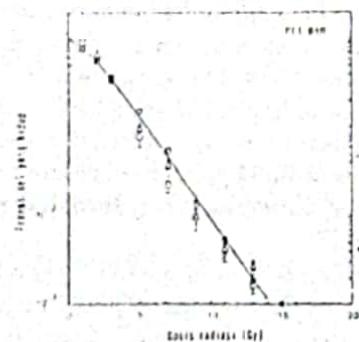
Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program komputer yang dibuat oleh Albright [8] berdasarkan pada dua model kurva daya tahan hidup, single hit multitarget dan linear quadratic. Data yang dimasukkan dalam program adalah jumlah sel kanker yang ditanam, dosis radiasi yang diberikan, dan jumlah koloni yang dihitung.

Parameter radiobiologi D_0 dan n dari model SHMT dan parameter α dan β dari model LQ untuk sel kanker yang tidak ditransfeksi (PCI-4A), sel kanker yang ditransfeksi dengan *c-raf-1* cDNA normal (PCI-4A-raf), dan sel kanker yang ditransfeksi dengan *c-raf-1* cDNA mutan (PCI-4A-raf*) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Parameter radiobiologi sel kanker larynx yang tidak dan ditransfeksi dengan onkogen *raf* normal dan mutan

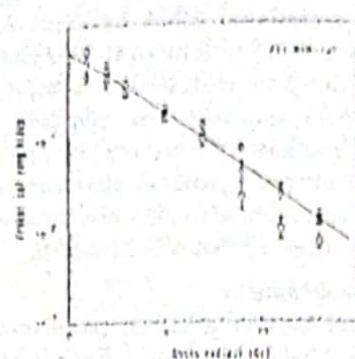
Sel	Ulang-an	D_0 (Gy)	n	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	SF2
PCI-4A	3	2,011	2,03	0,3350	0,0093	0,43
PCI-4A-raf	3	2,899	1,19	0,2804	0,0042	0,56
PCI-4A-raf*	3	3,801	1,31	0,2260	0,0015	0,70

Fraksi sel yang hidup setelah diiradiasi dengan dosis 2 Gy dihitung dari kurva daya tahan hidup model LQ. Kurva daya tahan hidup yang dihasilkan dengan menggunakan model SHMT dari masing-masing sel disajikan pada Gambar 2-4.

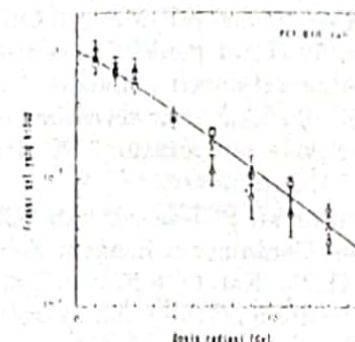


Gambar 2. Kurva daya tahan hidup sel kanker larynx PCI-4A ($D_0 = 2,01$ Gy)

Dari semua parameter radiobiologi yang dianalisis, hanya parameter D_0 , mean lethal dose, yang menunjukkan perbedaan yang nyata antara ketiga macam sel tersebut. Nilai D_0 PCI-4A, PCI-4A-raf, dan PCI-4A-raf* masing-masing adalah 2,01 Gy, 2,90 Gy, dan 3,80 Gy.



Gambar 3. Kurva daya tahan hidup sel kanker larynx yang ditransfeksi dengan onkogen normal *raf* (PCI-4A-raf, $D_0 = 2,90$ Gy).



Gambar 4. Kuva daya tahan hidup sel kanker larynx yang ditransfeksi dengan onkogen mutan *raf* (PCI-4A-raf*, $D_0 = 3,80$ Gy).

Berdasarkan nilai D_0 yang menggambarkan indeks radiosensitivitas sel, ternyata PCI-4A-raf relatif lebih tahan terhadap radiasi sinar γ dibandingkan dengan biakan asalnya PCI-4A dan relatif lebih sensitif daripada sel PCI-4A yang ditransfeksi dengan mutan *raf* (PCI-4A-raf*).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ekspresi onkogen *raf* pada PCI-4A ternyata dapat meningkatkan daya tahan sel tersebut terhadap radiasi pengion. Ini ditunjukkan dengan meningkatnya nilai D_0 PCI-4A dari 2,01 Gy menjadi 2,90 Gy (PCI-4A-raf). Lebih jauh lagi, sel kanker yang ditransfeksi dengan mutan *raf* (PCI-4A-raf*, $D_0 = 3,80$ Gy) relatif lebih tahan terhadap radiasi dibandingkan dengan kedua sel lainnya. Mutan *raf* ini hanya mengandung kode untuk produksi protein Raf-1 tanpa kode untuk mengatur produksi

protein tersebut. Ini menunjukkan bahwa protein kinase Raf-1 mempunyai peranan penting di dalam mekanisme alur informasi biokimia dari membran sel ke inti sel yang akhirnya mempengaruhi sensitivitas sel terhadap radiasi.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa transaksi onkogen *raf* normal dan mutan

(*raf*^{*}) dapat meningkatkan index radiosensitivitas sel kanker larynx (PCI-4A, $Do = 2,01$ Gy; PCI-4A-*raf*, $Do = 2,90$ Gy; PCI-4A-*raf*^{*}, $Do = 3,80$ Gy). Hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya ekspresi onkogen *raf* dan aktivitas protein kinase serine/threonine Raf-1 dapat meningkatkan daya tahan sel kanker larynx terhadap radiasi sinar γ .

DAFTAR PUSTAKA

1. Hall, E.J. Radiobiology for the radiologist, Philadelphia; J.B. Lippincott Company (1988).
2. Kasid, U., Pirolo, K., Dritschilo, A., and Chang, E. Oncogenic basis of radiation resistance, Advances in cancer research 61 (1993) 195-233.
3. Cooper, G. M., Oncogenes. Boston; John and Bartlett Publishers (1990).
4. Kasid, U., Pfeifer, A., Brennan, T., Beckett, M., Weichselbaum, R.R., Dritschilo, A., and Mark, G.E., Effect of antisense c-raf-1 on tumorigenicity and radiation sensitivity of a human squamous carcinoma, Science 243 (1989) 1354-1356.
5. Sklar, M.D., The ras-oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH-3T3 cells to ionizing radiation, Science 239 (1988) 645-647.
6. Kasid, U., Pfeifer, A., Weichselbaum, R.R., Dritschilo, A., and Mark, G.E., The *raf* oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. Science 237 (1987) 1039-1041.
7. Rapp, U.R., Goldsbrough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H., and Stephensen, J.R., Structure and biological activity of v-*raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus, Proc. Natl. Acad. Sci. 80 (1983) 4218-4222.
8. Albright, N., Computer program for the analysis of cellular survival data, Radiation Research 112 (1987) 331-340.

DISKUSI

M. Faruq :

Penambahan onkogen meningkatkan radiosensitivitas. Apakah tidak bertentangan, menurut saya radioimunitas dari sel meningkat, karena yang ditambahkan adalah gen kanker.

Zubaidah Alatas :

Penambahan/transaksi c-raf-1 bukan meningkatkan radiosensitivitas tetapi meningkatkan index radiosensitivitas (Do), yaitu meningkatnya daya tahan hidup sel kanker tersebut terhadap radiasi. Semakin besar Do , semakin besar radiosensitivitas sel terhadap radiasi.