

KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER: GEN *SUPPRESSOR* TUMOR (p53) SEBAGAI TARGET GEN DALAM PENGOBATAN KANKER

NLP INDI DHARMAYANTI

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRAK

Sel kanker adalah akumulasi sejumlah perubahan genetik yang berperan terhadap kejadian tumorigenesis, *tumor progression* dan resistensi terhadap kemoterapi. Sebagian besar perubahan genetik ini berakibat terhadap regulasi siklus sel. Pada sel normal, terdapat keseimbangan antara proliferasi sel dengan kematian sel yang diregulasi melalui siklus sel dengan *cellular checkpoint*. Kehilangan beberapa *molecular checkpoint* dapat ditemukan pada perkembangan beberapa tumor, hal ini dikarenakan progresi siklus sel menjadi disregulasi. Akumulasi perubahan genetik juga berperan pada timbulnya kemoresisten, yang mengakibatkan hilangnya kemampuan DNA merespon kerusakan. Deteksi DNA yang mengalami kerusakan diatur oleh tumor *suppressor* p53. Saat DNA *damage*, p53 menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan, atau bila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi program kematian sel (apoptosis). Beberapa perubahan yang telah diidentifikasi, yaitu perubahan pada tumor *suppressor* seperti p53. Dengan hilangnya *growth suppression*, progresi siklus sel tidak terkontrol dan menghasilkan tumorigenesis. Sebagian besar strategi dalam gen terapi untuk kanker difokuskan pada penggantian tumor *suppressor* dalam sel kanker. Strategi terapi p53-gen merupakan tumor *suppressor* yang penting untuk dikembangkan, dan kombinasi dengan kemoterapi atau radioterapi merupakan suatu hal yang menguntungkan. Tetapi p53 tidak selalu merupakan pilihan yang ideal untuk gen terapi pada semua kanker. Pada sel tumor yang mengalami over ekspresi MDM2 atau mempunyai HPV16E6, sebaiknya menggunakan tumor *suppressor* yang lain seperti p21 yang lebih memungkinkan dalam terapi gen sebab MDM2 atau HPV16E6 dapat langsung menginaktivasi p53. Hal lain yang masih perlu dipecahkan. Pertama, desain vektor yang efisien dibutuhkan yang dapat menyebabkan perpanjangan ekspresi yang tinggi dari transduksi gen hanya pada sel kanker target. Kedua, dibutuhkan kriteria lebih lanjut untuk merencanakan keputusan tumor *suppressor* yang akan digunakan untuk gen terapi.

Kata kunci: Gen *suppressor* tumor (p53), gen terapi, kanker

ABSTRACT

MOLECULAR BIOLOGY REVIEW: TUMOR SUPPRESSOR GENE (p53) AS TARGET FOR CANCER GENE THERAPY

Cancer cells are accumulation of numerous genetic alteration that contribute to tumorigenesis, tumor progression and chemotherapeutic drug resistance. Most of these alteration affect the regulation of the cell cycle. In normal cells, a balance is achieved between proliferation and cell death by tightly regulating the progression through the cell cycle with cell cycle with cellular checkpoints. The accumulation of genetic alterations also contributes to enhanced chemoresistance, resulting from the loss of the ability to respond to DNA damage. The detection of DNA damage is governed by tumor suppressor p53. Following DNA damage, p53 arrest the cell to allow time for repair, or if the damage is extensive enough, p53 initiates programmed cell death or apoptosis. Loss of these various molecular checkpoint has been found to underlie the development of many tumors because cell cycle progression becomes dysregulated. Therefore a major strategy in gene therapy for cancer has focused on replacing the tumor suppressors in cancer cells. p53-gene therapy remains the most important tumor suppressor strategy being developed and its combination with chemotherapy or radiotherapy may prove to be even more beneficial. However, p53 may not represent the ideal choice for gene therapy in all cancers. In tumor that overexpress MDM2 or have HPV16 E6, other tumor suppressors such as p21 may be more desirable targets of gene therapy because they can bypass the inactivation of p53. Several problem still need to be resolved. First, an efficient vector needs to be designed that cause prolonged high expression of the transduced gene while only targeting cancer cells. Second, further criteria need to be established in scheduling the decision about which tumor suppressor to employ for gene therapy.

Key words: Tumor suppressor gene (p53), gene therapy, cancer

PENDAHULUAN

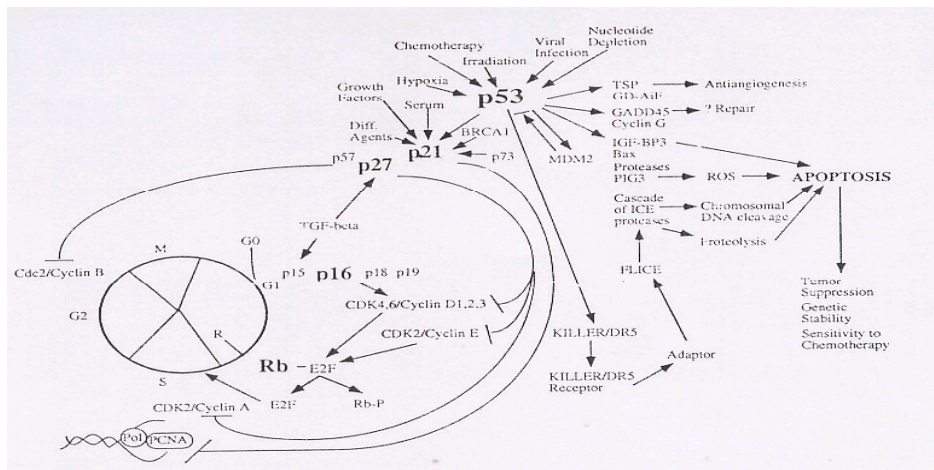
Sel kanker adalah akumulasi sejumlah perubahan genetik yang berperan terhadap kejadian

tumorigenesis, *tumor progression* dan resistensi terhadap kemoterapi. Sebagian besar perubahan genetik ini berakibat terhadap regulasi siklus sel. Pada sel normal, terdapat keseimbangan antara proliferasi sel

dengan kematian sel yang diregulasi melalui siklus sel dengan *cellular checkpoint* (HARTWELL dan KASTAN, 1994). Sebelum sel dapat memasuki fase berikutnya pada siklus sel, harus melalui sebuah *checkpoint* yang memutuskan jika proses pada fase sebelumnya telah selesai. Keputusan untuk memasuki siklus sel dibuat selama fase G1 yang dilakukan oleh *cyclins* dan unit regulatorinya, *cyclin-dependent kinases* (CDKs). Pengendalian oleh CDKs dilakukan dengan fosforilasi pada tempat yang berbeda dari protein dan oleh aktivitas CDK inhibitor, yang tersusun atas dua famili yaitu: protein INK4 yang terdiri dari p15, p16, p18 dan p19 yang terikat pada CDK4 atau CDK6 (MORGAN, 1995). Protein yang lain adalah CIP/KIP yang meliputi p21, p27, dan p57 yang terikat pada cyclin-CDK kompleks (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

Terjadinya proses progresi siklus sel juga dipengaruhi oleh faktor stimulasi dari luar. Jadi, jika sel eukariot diturunkan nutriennya atau *growth factornya*, siklus sel akan memberikan dan mengaktifasi *checkpoint*, yang berperan pada penahanan siklus sel sampai kondisi menjadi memungkinkan untuk melakukan pembelahan sel. Pada sel mamalia, *growth factor* dan mitogens meregulasi tingkat ekspresi dari cyclin D1, yang mengendalikan transisi dari G1 ke S. Pada sel mamalia, G1 tergantung *growth factor* bila akan melanjutkan ke fase berikutnya, kontrol *checkpoint* berupa protein retinoblastoma (SHERR, 1996). Salah satu dari ciri-ciri sel kanker adalah kehilangan kontrol *checkpoint*. Pada viral oncoprotein dan mutasi dalam kanker manusia, terdapat dua target yang spesifik yang saling terkait pada kontrol siklus sel yaitu: *ATM-p53-p21 pathway* dan *p16-cyclin D1-*

CDK4-Rb pathway yang membantu sel progres melalui fase G1. Cyclin D1 terikat pada regulator positif dengan CDK4, yang membantu fosforilasi Rb. Hipofosforilasi dari Rb merupakan regulator negatif progresi siklus sel, karena Rb terikat pada *transcription factors* (faktor transkripsi) yang menjadikan faktor transkripsi inaktif. Saat hiperfosforilasi oleh E-CDK2, Rb menjadi inaktif dan sel dapat melanjutkan siklus ke fase berikutnya yaitu fase S. p16 adalah regulator negatif dari CDK4, yang mencegah Rb mengalami fosforilasi. Abnormalitas masing-masing komponen pada *pathway* ini biasanya ditemukan pada kanker manusia. Deteksi DNA yang mengalami kerusakan diatur oleh tumor *suppressor* p53. Saat terjadi proses kerusakan DNA, p53 menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan, atau bila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi program kematian sel (apoptosis). Kehilangan beberapa *molecular checkpoint* dapat ditemukan pada perkembangan beberapa tumor, hal ini dikarenakan progresi siklus sel menjadi berjalan sebagaimana mestinya. Akumulasi perubahan genetik juga berperan pada timbulnya kemoresisten, yang mengakibatkan hilangnya kemampuan DNA merespon kerusakan (MENG dan EL-DEIRY, 1999). Beberapa perubahan yang telah diidentifikasi, yaitu perubahan pada tumor suppressors seperti p53. Dengan hilangnya *growth suppression*, progresi siklus sel tidak terkontrol dan menghasilkan tumorigenesis. Untuk itu, sebagian besar strategi dalam gen terapi untuk kanker difokuskan pada penggantian tumor *suppressor* dalam sel kanker (Gambar 1).



Gambar 1. Tumor *suppressor* sebagai target dalam terapi gen kanker. Kehilangan *suppressor* tumor yaitu p53 akan menghasilkan perkembangan dan progresi tumor. p53 menjadi perantara respon seluler pada saat DNA rusak yang mengakibatkan ditahannya pertumbuhan atau apoptosis. p21 adalah efektor utama p53 yang menjadi perantara penahanan siklus dan CDK1 dengan p1 dan p27 membantu transisi regulasi G1. Rb membantu menjadi perantara progresi siklus sel dari fase G1 ke fase S (MENG dan EL-DIERY, 1999).

Ada beberapa jenis tumor *suppressor* seperti p53, p21, p16, Rb dan p27. Tulisan ini membahas tumor *suppressor* p53 sebagai target yang berpotensi untuk menggantikan gen dalam kanker.

SEJARAH p53

p53 ditemukan pertama kali pada tahun 1979 yang dikenal sebagai protein 53 kilodalton. Hal ini dihubungkan dengan protein *transforming large T-antigen* dari virus simian 40. LEVINE menemukan bahwa protein 53-kDa mengalami ekspresi berlebih tidak hanya pada *murine SV40 transformed cells* tapi juga dalam sel karsinoma *uninfected embryonic*. Mapping peptida dari protein 53 menunjukkan hasil identik pada *cell lines* yang berbeda, tapi berbeda dari *map peptida SV40 large-Tantigen* (<http://www.lifesciences.napier.ac.uk>).

Pada tahun 1980-an, p53 diketahui sebagai *oncogene*, sebab ketika dikombinasikan dengan ras klon p53 menunjukkan kemampuan transformasi seluler. Akhir tahun 1980an akhirnya menjadi jelas bahwa klon p53 adalah mutan dan p53 wt (*wild type*) (normal) kenyataannya adalah tumor *suppressor* gen. Eksperimen yang menunjukkan kontransfeksi dari plasmid yang mengkode p53 wt menurunkan kemampuan transformasi dari plasmid yang mengkode p53 dan diaktivasi oleh gen Ha-ras. Eksperimen ini menunjukkan bahwa p53 adalah sebagai tumor *suppressor*. Selanjutnya ditemukan secara luas bahwa p53 mengalami mutasi pada berbagai jenis kanker dan kadar p53 meningkat pada sel yang terpapar radiasi sinar ultraviolet. Beberapa laporan juga menyatakan bahwa ekspresi p53 berbeda pada kanker dan ratusan laporan menyatakan terjadinya perubahan gen p53 dalam semua jenis kanker (<http://www.lifesciences.napier.ac.uk>).

Tidak sampai pada tahun 1990-an diketahui bahwa p53 meregulasi siklus sel *checkpoint* yang bertanggung jawab terhadap kerusakan DNA. Pada awal tahun 1990an penelitian-penelitian dilakukan untuk mengetahui fungsi biokimia p53 sebagai *sequence-specific DNA-binding protein* dengan kemampuannya mengaktivasi ekspresi gen. Beberapa gen target yang spesifik ditemukan, hal ini menjelaskan beberapa efek biologis dalam penahanan siklus sel, apoptosis dan supresi tumor (<http://www.lifesciences.napier.ac.uk>).

p53 manusia adalah 393-*amino acid nuclear protein* yang berperan secara biokimia sebagai faktor transkripsi. Molekul p53 terdiri dari 3 mayor domain yaitu: *N-terminal transactivation domain*, *DNA binding domain* yang terletak dalam bagian tengah molekul dan *C-oligomerization domain* (HOLLSTEIN *et al.*, 1991). p53 secara spesifik terikat pada konsensus *DNA binding sequence*, yang terdiri dari dua ulangan 10

basepairs (bp) motif 5'-PuPuPuC(A/T)(t/A)GpyPyPy-3' dan ekspresi transaktivasi dari target gen. Beberapa fungsi biologi p53 adalah menginduksi penahanan pertumbuhan (*growth arrest*) atau mengaktivasi *14-3-3 σ* (untuk penahanan pada posisi G2) (KERN *et al.*, 1997), menginduksi apoptosis, dan pada sisi lain menjadi perantara aktivasi *Bax*, *KILLER/DR5* dan gen yang terlibat dalam menghasilkan oksigen reaktif. p53 juga meregulasi angiogenesis dan metastasis tumor dengan regulasi transkripsional dari gen yang mengkode epidermal *growth factor receptor* (EGFR), thrombospondin, matrix metalloproteinases (MMPs), cathepsin D, Kang ai (KAI1), *basic fibroblast growth factors* dan *multidrug resistant gene 1* (MDR1). Mutasi p53 ditemukan pada kanker yang terkumpul pada *specific DNA binding domain* yang mengakibatkan menghilangnya transaktivasi dan *p53 specific DNA binding* (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

LATAR BELAKANG DIGUNAKANNYA p53 SEBAGAI GEN TERAPI

Tiga alasan dipertimbangkannya p53 sebagai *tumor suppressor* untuk mengganti gen dalam malignansi. Pertama, p53 berperan sangat penting dalam menentukan nasib sel ketika DNA mengalami kerusakan, yakni menentukan sel rusak akan memperbaiki diri atau sel akan mengalami program kematian sel (apoptosis), apabila kerusakan terlalu ekstensif (ALMOG dan ROTTER, 1997). Sehingga apabila p53 hilang atau p53 mengalami mutasi, maka secara nyata akan berperan terhadap perkembangan tumor, progresi dan resistensi kemoterapi. Pada survei terhadap toksisitas 100 obat kanker dilaporkan bahwa lebih dari 60 kanker manusia dan *leukemia cell lines* menunjukkan sebagian besar obat tersebut bermanfaat atau lebih efektif pada sel yang mengekspresikan *wild-type* p53 (WEINSTEIN *et al.*, 1997). Kedua, pada sebagian besar perubahan genetik dalam tumor, baik delesi atau mutasi pada lebih dari 50% kanker pada manusia ternyata p53 mengalami mutasi transmisi *germline* dari alel mutan p53 yang merupakan faktor predisposisi dari individu dengan *Li-Fraumeni syndrom* yang mempunyai resiko tinggi terhadap kanker (MALKIN *et al.*, 1990). Secara rekayasa genetik pada tikus yang kedua alela p53 didelesi atau *knocked-out*; 75% berkembang menjadi tumor pada umur 6 bulan dan semua mati pada umur 2 tahun (DNEHOWER *et al.*, 1992). Ketiga, kehilangan p53 mengakibatkan penurunan apoptosis dan menurunkan sensitifitas terhadap radioterapi atau kemoterapi (LOWE *et al.*, 1993).

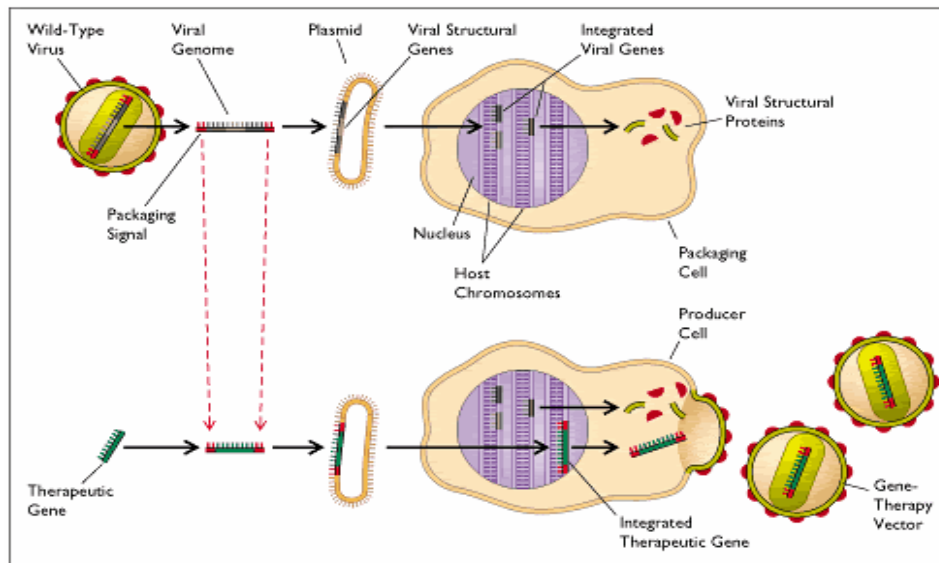
Terapi penggantian gen dengan p53 adalah *inducer* yang berpotensi untuk apoptosis sel kanker yang efektif meskipun terdapat berbagai perubahan genetik dalam sel kanker (BAKER *et al.*, 1990). p53

dapat meregulasi pertumbuhan sel kanker secara in vivo, sehingga penggantian p53 atau overekspresi p53 ketidaknormalan kontrol siklus sel dapat diregulasi kembali. Oleh karena itu terapi kanker dari p53 sangat penting untuk direalisasikan walaupun kekuatan *p53-gene therapy* mempunyai keterbatasan, dalam pengembangan *anticancer agent*.

VEKTOR TERAPI GEN p53

Pada awalnya terapi gen dengan p53 adalah menggunakan retrovirus untuk membawa gen *tumor suppressor* masuk ke dalam berbagai *cancer cell lines* (CAI *et al.*, 1993). Dua kelompok peneliti memasukkan p53 melalui vektor retrovirus ke dalam *non-small lung cancer line* dan menekan pertumbuhan tumor secara in vitro maupun in vivo dalam *a nude mouse model*. Ini juga ditunjukkan dalam fase I percobaan klinik yaitu *retrovirus-transferred p53* dapat digunakan untuk menginfeksi *non-small lung cancer line* pada manusia melalui injeksi intratumoral dan juga efektif membatasi pertumbuhan pada sebagian kecil penderita dengan stadium kanker terminal (ROTH *et al.*, 1996). Sekarang, sebagian besar strategi *p53-directed gene replacement* telah diganti dengan menggunakan vektor adenovirus (Gambar 2) sebab adenovirus dapat menginfeksi berbagai tipe sel dan dapat diproduksi dalam titer yang

tinggi. Dilaporkan bahwa adenovirus mengekspresikan β -galaktosidase (Ad-LacZ) yang dapat menginfeksi sel tumor dari berbagai macam jaringan termasuk otak, paru-paru, payudara, ovarium, kolon, dan prostat (BLAGOSKLONNY *et al.*, 1996). Selanjutnya kemampuan adenovirus dalam menginfeksi sel tumor tidak tergantung pada status p53 dari sel inang. Beberapa *cell lines*, secara turun temurun resisten terhadap infeksi adenovirus, misalnya pada 2 *leukemia* dan 2 *lymphoma cell line* MDA-MB-435 dengan p53 yang mengalami mutasi (NIELSEN *et al.*, 1997) dan *choriocarcinoma cell line* JEG3 dengan *wild-type* p53. Penjelasan mengenai resistensi terhadap infeksi adenovirus seluruhnya belum diketahui. Awalnya karena reseptor seluler yang bertanggung jawab terhadap binding adenovirus tidak diketahui. Diperkirakan bahwa α -integrin yang dibutuhkan untuk internalisasi yang efisien adenovirus (WICKMAM *et al.*, 1993) tetapi analisis *Fellow of the American College of Surgeon* (FACS) tidak menunjukkan penurunan ekspresi integrin pada *breast cancer cell line* yang diinfeksi dengan dosis rendah p53 adenovirus (Ad-p53) (NIELSEN *et al.*, 1997). Walaupun mekanismenya tidak diketahui, inefisiensi infeksi adenovirus pada sel merupakan hal yang penting, mengingat pengobatan p53 menjadi tidak responsif (MENG dan EL-DEIRY, 1999).



Sumber: ECK (1999)

Gambar 2. Strategi vektor viral dalam terapi gen. Virus akan kehilangan beberapa gen strukturalnya (sekuen atas) sehingga dapat dikemas dalam sel yang dapat mensintesa protein virus. Dalam genom virus, gen terapi ditempatkan pada gen struktural (sekuen bawah). *Construct* ini dipelihara menjadi sel produsen yang dapat menghasilkan virion yang mengandung gen terapi

Untuk membantu menentukan keberhasilan terapi Ad-p53, pertanda untuk produktifitas infeksi p53 telah dan sedang dipelajari. Hal yang tidak menguntungkan adalah pemeriksaan kadar p53 setelah infeksi Ad-p53 menjadi sulit sebab sebagian besar sel kanker pada manusia telah mengalami overekspresi dari p53, hal ini dikarenakan p53 telah mengalami mutasi sehingga pemeriksaan kadar protein p53 menjadi tidak berguna. Ekspresi protein p21^{WAF/CIP1} telah dievaluasi sebagai pertanda untuk efisiensi transduksi p53 wild type. p21 adalah CDK inhibitor, yaitu target *downstream* p53 yang secara transkripsional menginduksi tingginya p53 yang bertanggung jawab terhadap kerusakan DNA (EL-DIERY *et al.*, 1993). p21 berlaku sebagai regulator negatif dari pertumbuhan selama fase G1 siklus sel *checkpoint* yang terikat dan menghambat cyclin/CDKs. Dihipotesiskan bahwa p21 adalah marker yang baik untuk transduksi p53 sebab sel tumor mengekspresikan p53 mutan sedangkan p21 diekspresikan dalam kadar yang rendah (EL-DIERY *et al.*, 1994). Akibatnya, setelah infeksi Ad-p53 pada *cancer cell lines* yang berbeda, ekspresi p21 tinggi diinduksi secara *in vitro* dan *in vivo*, yang dideteksi dengan *immunocytochemistry* atau *western blot* yang menggambarkan keberadaan p53 (BLAGOSKLONNY *et al.*, 1996).

Penahanan siklus sel dan apoptosis yang diinduksi oleh p53

Beberapa studi telah mencatat efikasi infeksi Ad-p53 pada penghambatan pertumbuhan sel kanker (ROTH *et al.*, 1997). Penahanan siklus sel tergantung dosis dan waktu. BLAGOSKLONNY *et al.*, 1996 melaporkan bahwa tingkat apoptosis diperkecil pada sel yang mempunyai p53 *wild-type* saat dibandingkan dengan p53 mutan, dan memberikan kesan bahwa beberapa sel dengan p53 *wild-type* adalah resisten Ad-p53 jika DNA tidak ada yang mengalami kerusakan. Sebaliknya penghambatan pertumbuhan oleh Ad-p53 tidak terlihat pada p53 yang terdapat pada *prostate cancers cell* (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

Berkaitan dengan toksisitas Ad-p53 pada sel normal, maka sebuah vektor harus mempunyai kemampuan spesifik terhadap sel target yaitu sel kanker, karena apabila infeksi yang dilakukan kurang hati-hati tentunya akan menimbulkan efek samping terhadap sel normal. Satu studi yang membandingkan respon *human fibroblast cell line GM38* dengan dua *nasopharyngeal cell lines* terhadap infeksi Ad-p53 dan menemukan bahwa terdapat efisiensi transfeksi yang rendah dan ekspresi *transgene* setelah diinfeksi dengan Ad-p53 (LI *et al.*, 1997). Akibatnya, fibroblast tersebut resisten terhadap sitotoksitas yang diperantarai oleh p53, walaupun beberapa sel yang diamati ada yang mengalami kematian. Siklus sel tidak terpengaruh oleh Ad-p53 seperti yang diamati pada *human fibroblast cell*

line yang lain (CHANG *et al.*, 1997). Studi terbaru juga menyatakan bahwa infeksi Ad-p53 terhadap *human keratinocytes* sangat rendah (BLAGOSKLONNY *et al.*, 1998). Sepertinya sel normal mungkin lebih resisten terhadap infeksi Ad-p53 dan kemungkinan sel normal mempunyai mekanisme yang *intact* untuk tetap bertahan hidup meskipun terdapat ekspresi p53 *wild-type*. Sebagai contoh, sel normal menginduksi MDM2 yang berperan terhadap degradasi p53.

p53 berbeda dengan *tumor suppressor* yang lain, karena kemampuannya menginduksi apoptosis. Apoptosis adalah hal yang sangat dipertimbangkan dalam terapi kanker. p53 terlibat dalam beberapa jalur apoptosis. Walaupun p53 dapat meregulasi ekspresi gen yang terlibat apoptosis, seperti BAX atau FAS/APO1, p53-*dependent apoptosis*, masih dapat secara langsung menyebabkan apoptosis pada sel target (KNUDSON *et al.*, 1995).

APLIKASI TERAPI MEMANFAATKAN GEN-p53

Overekspresi MDR1 pada sel kanker

Terapi gen dengan menggunakan p53 berguna untuk infeksi pada sel kanker yang mengalami overekspresi *multidrug resistance gene*, MDR1 (EL-DIERY, 1998). MDR1 adalah membran glikoprotein yang terdapat pada permukaan sel yang dapat menurunkan konsentrasi intraseluler agen kemoterapi. Telah dilaporkan pada kanker kolon dan *breast cancer cell lines* yang 1000 kali lebih resisten terhadap adriamycin dikarenakan overekspresi MDR1 dan secara cepat terinfeksi dengan Ad-p53 dan kemudian mengalami apoptosis, sebagaimana telah diperiksa dengan adanya fragmentasi nuklear. Menariknya, ternyata p53 dapat meregulasi MDR1, sehingga apabila kehilangan p53 maka akan terjadi upregulasi dari MDR1 dan akibatnya akan meningkatkan khemoresisten (CHIN *et al.*, 1992; THOTTASSERY *et al.*, 1997).

p53 dan kemoterapi

Walaupun pemberian Ad-p53 sebagai agen tunggal yang dapat berkembang menjadi strategi pengobatan antikanker, kombinasi p53-*gene therapy* dengan pengobatan tradisional kanker adalah logis dan praktis. p53 tampaknya berperan penting dalam kerusakan DNA yang diakibatkan berbagai macam obat dikarenakan mutasi atau kehilangan p53 dikaitkan dengan menurunnya kepekaan terhadap kemoterapi (WEINSTEIN *et al.*, 1997). Untuk itu penggantian p53 dalam *cell lines* yang fungsi p53-nya hilang mungkin akan memperbaiki kepekaan terhadap kemoterapi. Pertama kali dilaporkan pada *human-non small cell*

lung cancer lines dengan p53 mutan menjadi lebih sensitif terhadap cisplatin setelah dilakukan transduksi dengan p53 *wild-type*. Dalam laboratorium, MENG dan EL-DEIRY (1999) juga mengamati bahwa kombinasi antara agen yang menyebabkan kerusakan DNA (*DNA damaging agent*) dan infeksi p53 secara umum menghasilkan efek sinergi terhadap kematian sel kanker. Dengan demikian diharapkan kombinasi Ad-p53 dengan *DNA damaging chemotherapeutic agent* mungkin akan lebih efektif dan berguna pada pengobatan penderita kanker (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

p53 dan radiotherapy

Pada awalnya kombinasi p53 dan *radiotherapy* digunakan karena terapi kanker dengan radio terapi yang ditunjukkan oleh *thymocytes* yang siap untuk apoptosis setelah paparan dengan iradiasi γ , tetapi karena hilangnya ekspresi p53 *wild-type* dalam *thymocytes* secara dramatis menurunkan jumlah sel yang akan apoptosis (LOWE *et al.*, 1993). Pada eksperimen yang lain, transfeksi pada *human papiloma virus* (HPV) 16E6 *gene*, yang terikat dengan p53 dan menginaktifkan p53, di dalam *human diploid fibroblast* ternyata merubah sel menjadi resisten terhadap iradiasi, ini disebabkan karena hilangnya p53. Sehingga hilangnya p53 merubah sel kanker menjadi lebih resisten terhadap radioterapi. Kombinasi terapi gen-p53 dengan radioterapi telah difokuskan pada meningkatnya kepekaan sel kanker terhadap paparan iradiasinya. Jadi p53 yang ditransduksikan ke dalam *ovarian cancer cells* yang kehilangan fungsi p53, ternyata merubah sel tersebut menjadi lebih sensitif terhadap radioterapi. Iradiasi dan transfeksi Ad-p53 juga menurunkan pertumbuhan *head* dan *neck cancer line* yang mengalami radioresisten secara *in vivo* pada tikus model yang ternyata lebih efektif bila dibandingkan perlakuan tunggal (CHANG *et al.*, 1997).

GEN TERAPI p21 SEBAGAI ALTERNATIF UNTUK p53

Dalam evaluasi tentang terapi gen dengan menggunakan p21, sebagian besar kelompok membandingkannya dengan Ad-p53. Ad-p21 hanya menyebabkan sedikit atau tidak menyebabkan apoptosis. Tetapi p21 adalah *suppressor* pertumbuhan kanker yang potensial. Jadi Ad-p21 adalah sebuah alternatif yang penting bagi p53 dalam beberapa situasi yang khusus apabila p53 inaktif. Pada beberapa *cell lines*, p53 tidak mengalami mutasi tapi tidak berfungsi. Ini dikarenakan didegradasi oleh HPV tipe 16 atau tipe 18 atau disebabkan karena diikat untuk diinaktifkan oleh protein seluler seperti oncoprotein *mouse double*

minute-2 (MDM2). Pada situasi seperti ini bila protein tersebut overekspresi maka akan menginaktifkan transduksi p53 eksogen sehingga p21 mungkin dapat menjadi alternatif (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

HPV16E6 menginaktifkan p53

Infeksi oleh HPV tipe 16 atau tipe 18 yang secara epidemiologi berhubungan dengan sebagian besar penyebab kanker mulut rahim (*cervical cancer*) di dunia. Protein E6 dari HPV mempunyai target pada p53 manusia untuk didegradasi melalui *ubiquitin-mediated proteolysis*. Protein seluler E6 yang disebut *E6-associated protein* (E6AP) terikat pada p53 dan fungsinya sebagai *E3 ubiquitin ligase* menjadi perantara degradasi p53 (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

p53 menghasilkan *ovarian cancer cells* yang stabil mengekspresikan protein HPV16E6, yang berperan pada degradasi p53 endogen (WU dan EL-DEIRY, 1996). Infeksi *ovarian cancer cells* dengan Ad-p53 hanya memproduksi hambatan sintesis DNA yang sangat sedikit, dan ekspresi p21 sangat sedikit diinduksi (PRABHU *et al.*, 1996). Sebaiknya, infeksi pada sel yang mengalami overekspresi E6 dengan Ad-p21-341 menekan sintesis DNA secara signifikan pada banyak *Mechanism of Injury* (MOI) yang lebih rendah. Sel yang mengalami overekspresi E6 tetap berproliferasi pada tiga hari setelah infeksi dengan Ad-p53 pada MOI dengan kadar 150, infeksi dengan Ad-p21-341 adalah sitotoksik terhadap sel pada waktu yang sama, dan menyebabkan beberapa DNA mengalami fragmentasi yang mengindikasikan terjadi apoptosis. Dengan demikian HPV yang dikaitkan dengan kanker, bila E6 overekspresi maka akan menginaktifkan p53, sehingga mungkin dapat diganti dengan Ad-p21 (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

Overekspresi MDM2 menginaktifkan p53

p53 dapat diinaktifkan oleh keberadaan MDM2, yang juga merupakan target p53 untuk degradasi. Onkogen MDM2 adalah target untuk aktivasi transkripsi oleh p53 (BARAK *et al.*, 1993). Selain itu, MDM2 juga menghentikan transaktivasi domain p53 dan menghambat aktivasi transkripsi yang tergantung p53 (MOMAND *et al.*, 1992). Jadi walaupun p53 mengaktifkan MDM2, MDM2 adalah *downregulation* p53 dan berbalik menghambat fungsi p53 dalam penahanan pertumbuhan dan apoptosis. Walaupun ditemukan berbagai macam tumor, overekspresi MDM2 adalah umum dilaporkan dalam jaringan lunak sarkoma, kejadiannya lebih dari 30% dari keseluruhan kasus. Sehingga apabila dalam tumor, MDM2 meningkat, terapi gen dengan p53 bukanlah terapi yang terbaik (OLINER *et al.*, 1992).

Untuk menguji hipotesis ini digunakan Ad-p53 untuk menginfeksi beberapa *human cancer cell lines* yang mempunyai ekspresi protein MDM2 yang tinggi kemudian dibandingkan dengan *cell lines* dengan MDM2 dengan kadar yang rendah. Sel tumor dengan MDM2 yang tinggi ternyata resisten terhadap efek penghambatan pertumbuhan oleh Ad-p53 (MENG *et al.*, 1998). Walaupun sel kanker yang MDM2 overekspresi masih dapat terinfeksi dengan Ad-p53 dan menginduksi ekspresi protein p53 yang tinggi seperti yang diperoleh dari *Western immunoblotting*. Rata-rata sintesis DNA hanya menurun sangat sedikit bila dibandingkan dengan sel yang terinfeksi Ad-LacZ dan mereka menunjukkan induksi p21 yang terhambat. Sebab pengaruh hambatan dari p53 eksogen dihambat pada *cell lines* ini. Jika p21 yang diuji, dimana p21 merupakan *downstream* target dari p53 dapat langsung berpengaruh terhadap MDM2 yang menghambat p53. Infeksi sel yang mengalami overekspresi MDM2 dengan p21 menghasilkan overekspresi p21, yang mempunyai kekuatan yang besar untuk menghambat siklus sel, dan menurunkan viabilitas seluler (MENG *et al.*, 1998). Hiperfosforilasi protein Rb berhubungan dengan resistensi tumor terhadap infeksi Ad-p53. Hal ini memberikan suatu indikator bahwa status fosforilasi Rb merupakan indikator yang baik bagi penghambatan pertumbuhan yang diperantarai p53 (MENG dan EL-DEIRY, 1999).

SV40 Large T Antigen menginaktifkan p53

Gen *suppressor* tumor, p53 pertama kali ditemukan pada tahun 1979 sebagai 53-kilodalton simian virus 40 (SV40) *large T antigen-associated protein*. SV40 *large T antigen* (Tag) diketahui terikat dan menginaktif beberapa gen *suppressor* tumor termasuk p53 (TIEMANN *et al.*, 1995). Dilaporkan bahwa lebih dari 60% *human mesothelioma* mengekspresikan sekuen SV40-like. Pada beberapa sampel mesothelioma menunjukkan bahwa p53 koekspresi dengan Tag, dan Tag mengkopresipitasi p53 sehingga menjadikan p53 inaktif (CARBONE *et al.*, 1997).

Virus Hepatitis B “Protein X” dan retensi sitoplasma dari p53

Virus Hepatitis B “Protein X” adalah regulasi negatif terhadap p53 sehingga protein X menghambat fungsi p53 (WANG *et al.*, 1994). Penempelan protein X pada p53 menyebabkan p53 keluar dari nukleus. Dengan demikian, kanker hati yang disebabkan oleh virus hepatitis menyebabkan p53 tidak berfungsi. Dalam kondisi ini maka penggunaan p21 sebagai terapi dibanding p53 lebih mungkin dilaksanakan.

PERCOBAAN KLINIK

Rute pemberian gen terapi p53 biasanya melalui injeksi intratumor (NGUYEN *et al.*, 1996), tetapi CHEN dan MIXON (1998) melakukan pemberian p53 melalui injeksi intravena dan hasilnya ternyata terjadi penurunan dari pertumbuhan tumor.

Pioner yang bekerja dengan gen p53 terapi banyak dilakukan. Percobaan klinik pertama dilakukan oleh JACK ROTH dan koleganya pada M.D. Anderson Cancer Center menggunakan p53 dengan vektor Retrovirus untuk mengobati penderita dengan *non-small-cell lung cancer* yang diberi secara intratumor ternyata tidak menyebabkan toksis sampai 5 bulan kemudian. *Wild type* p53 dideteksi dalam biopsi paru-paru dengan hibridisasi insitu dan amplifikasi PCR, sedangkan apoptosis yang ditentukan dengan pemeriksaan TUNEL berdasarkan sampel biopsi *post-treatment*. Dari enam penderita pada studi ini, 3 penderita menunjukkan stabilisasi pertumbuhan tumor dan 3 penderita menunjukkan regresi tumor yang perlahan (NGUYEN *et al.*, 1996). Dilaporkan bahwa penghambatan pertumbuhan tumor diperkuat ketika terapi p53 gen terapi dikombinasi dengan cisplatin sistemik. Pada percobaan klinik phase II pada kanker paru-paru dan kepala leher. Percobaan klinik yang lain dilakukan dengan menggunakan adenovirus *E1b-deleted*, yang menunjukkan target mutan p53-*expressing cells* (BISCHOFF *et al.*, 1996). Hasil pendahuluan menunjukkan tidak terdapat efek samping yang nyata pada vektor ini (KIRN *et al.*, 1999).

KESIMPULAN

Penggunaan tumor *suppressor* dalam terapi gen menunjukkan strategi yang penting untuk melawan kanker. Strategi terapi p53-gen penting untuk dikembangkan, dan kombinasi dengan kemoterapi atau radioterapi merupakan suatu hal yang menguntungkan. Hingga tulisan ini disusun terapi p53 gen terapi yang dikembangkan secara progresif pada percobaan klinik, walaupun p53 tidak selalu merupakan pilihan yang ideal untuk gen terapi pada semua kanker. Pada sel tumor yang mengalami over ekspresi MDM2 atau mempunyai HPV16E6, sebaiknya digunakan tumor *suppressor* yang lain seperti p21 yang lebih memungkinkan dalam terapi gen sebab MDM2 atau HPV16E6 dapat langsung menginaktivasi p53.

Dibutuhkan desain vektor yang efisien sehingga dapat menyebabkan perpanjangan ekspresi yang tinggi terhadap gen tertransduksi hanya terjadi pada sel kanker target. Disamping itu diperlukan pula kriteria lebih lanjut untuk merencanakan keputusan tumor *suppressor* yang akan digunakan untuk terapi gen.

Penggunaan tumor *suppressor* menunjukkan kemampuan yang sangat potensial bagi treatment anti kanker dan membutuhkan penelitian lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- ALMOG, N and V. ROTTER. 1997. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *BBA-Reviews on Cancer*. 1333 (1) F1–F27
- BAKER, S.J., S. MARKOWITZ, E.R. FEARON, J.K. WILLSON and B. VOGELSTEIN. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53. *Science*. 249: 912–915.
- BARAK, Y., T. JUVEN, R. HAFNER and M. OREN. 1993. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO. J.* 12: 461–468.
- BISCHOFF, J.R., D.H. KIRN, A. WILLIAMS, C. HEISE, S. HORN, M. MUNA, L. NG, T.A. NYE, A. SAMSPON-JOHANNES, A. FATTAEY and F. MCCORMICK. 1996. An Adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Sciences*. 274: 373–376.
- BLAGOSKLONNY, M.V. and W.S. EL-DEIRY. 1996. In vitro evaluation of a p53-expressing adenovirus as an anti-cancer drug. *Int. J. Cancer*. 67: 386–392.
- BLAGOSKLONNY, M.V. and W.S. EL-DEIRY. 1998. Acute overexpression of wt p53 facilitates anticancer drug-induced death of cancer and normal cancer. *Int. J. Cancer*. 75: 933–940.
- CAI, D.W., T. MUKHOPADHYAY, Y.J. LIU, T. FUJIWARA and J.A. ROTH. 1993. Stable expression of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 4: 617–624.
- CARBONE, M., P. RIZZO, P.M. GRIMLEY, A. PROCOPIO, D.J.Y. MEW, V. SHRIDHAR, A. DEBARTOLOMEIS, V. ESPOSITO, M.T. GIALIANO, S.M. STEINBERG, A.S. LEVINE, A. GIARDANO and H.I. PASS. 1997. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat. Med.* 3: 908–912.
- CHANG, E.H., Y.J. ANG, Z. HAO, G. MURPHY, A. RAIT, W.E. FEE JR., H.H. SUSSMAN, P. RYAN, Y. CHIANG and K.F. PIROLLO. 1997. Restoration of the G1 checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild-type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 123: 507–512.
- CHEN, Q.R. and J. MIXSON. 1998. Systemic gene therapy with p53 inhibit breast cancer: recent advances and therapeutic. *Frontiers in Bioscience* 3. pp. 997–1004.
- CHIN, K.V., K. UEDA, I. PASTAN and M.M. GOTTESMAN. 1992. Modulation of activity of promoter of the human mDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 255: 459–462.
- DONEHOWER, L.A., M. HARVEY, B.L. SLAGLE, M.J. MCARTHUR, MONTGOMERY, C.A., JR. BUTEL, J.S. and BRADLEY, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*. 356: 215–221.
- ECK, S.L. 1999. The Prospects for Gen Therapy. <http://www.hosprract.com/genetics/giomme.htm>.
- EL-DEIRY, W.S., J.W. HARPER, P.M. O'CONNOR, V.E. VELCULESCU, C.E. CANMAN, J. JACKMAN, PIETENPOL, M. BURRELL, D.E. HILL, Y. WANG, K.G. WIMAN, W.E. MERCER, M.B. KASTAN, K.W. KOHN, S.J. ELLEDGE, K.W. KINZLER and B. VOGELSTEIN. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p-53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54: 1169–1174.
- EL-DEIRY, W.S., T. TOKINO, V.E. VELCULESCU, D.B. LEVY, R. PARSONS, J.M. TRENT, D. LIN, W.E. MERCER, K.W. KINZLER and B. VOGELSTEIN. 1993. WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75: 817–825.
- HARTWELL, L.H. and M.B. KASTAN. 1994. Cell cycle control and cancer, *Science*. 266.1821–1828.
- HOLLSTEIN, M., D. SIDRANSKY, B. VOGELSTEIN and C.C.HARRIS. 1991. p53 mutation in human cancers. *Science*. 253: 49–53.
- <HTTP://WWW.LIFESCIENCES.NAPIER.AC.UK/COURSES/PROJECTSO/P53/HISTORY.HTM>. Discovery of p53 (I). Historical Perspective.
- KERN, S.E., J.A. PIETENPOL, S. THIAGALINGAN, A. SEYMOR, K.W. KINZLER and B. VOGELSTEIN. 1992. Oncogenic from of p53-regulated gene expression.
- KIRN, D., I. GANLEY, J. NEMUNAITIS, R. OTTO, D. SOUTAR, J. KUHN, C. HEISE, M. PROPST, C. MAACK, G. ECKHARDT, S. KAYE and D. VON HOFF. 1997. A phase I clinical trial with ONYX-015 (a selectively replicating adenovirus) administered by intratumoral injection in patient with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 4: 05.
- KNUDSON, C.M., K.S. TUNG, W.G. TOURTELLOTE, G.A. BROWN and S.J. KORSMEYER. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 270: 96–99.
- LI, J.H., P. LI, H. KLAMUT and F.F. LIU. 1997. Cytotoxic effect of AdCMV-p53 xpression in two human nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 3: 507–514.
- LOWE, S.W., E.M. SCHIMITT, S.W. SMITH, B.A. OSBORNE and T. JACK. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 362: 847–849.
- MALKIN, D., F.P. LI, L.C. STRONG, J.F. JR. FRAUMENI, C.E. NELSON, D.H. KIM, C. KASSEL, M.A. GRYKA, F.Z. BISCHOFF, M.A. TAINSKY and S.H. FRIEND. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer sarcomas and other neoplasms. *Science*. 250: 1233–1238.

- MENG, R.D. and E.S. EL-DEIRY. 1999. Tumor Suppressor Genes as Targets for Cancer Gene Therapy. *In: Gene Therapy of Cancer*. Academic Press. San Diego. pp. 3–15.
- MOMAND, J., G.P. ZAMBETTI, D.C. OLSON, D. GEORGE and A.J. LEVINE. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 69: 1237–1245.
- MORGAN, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374. pp. 132–134.
- NGUYEN, D.M., F.R. SPLITZ, N. YEN, R.J. CRISTIANO and J.A. ROTH. 1996. Gene therapy for lung cancer: Enhancement of tumor suppression by a combination of sequential systemic cisplatin and adenovirus-mediated p53 gene transfer. *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.* 112: 1372–1376.
- NIELSEN, L.L., J. DELL, E. MAXWELL, L. ARMSTRONG, D. MAEVAL and J.J. CATINO. 1997. Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. *Cancer Gene Ther.* 4: 129–138.
- OLINER, J.D., K.W. KINZLER, P.S. MELTZER, D.L. GEORGE and B. VOGELSTEIN. 1992. Amplification of the gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 358. 80–83.
- PRABHU, N.S., M.W. BLAGOSKLONNY, Y.X. ZENG, G.S. WU, T. WALDMAN and EL-DEIRY. 1996. Suppression of cancer cell growth by adenovirus expressing p21WAF1/CIP1 deficient in PCNA interaction. *Clin. Cancer Res.* 2: 1221–1229.
- ROTH, J.A., D. NGUYEN, D.D. LAWRENCE, B.L. KEMP, C.H. CARRASCO, D.Z. FERSON, W.K. HONG, R. KOMAKI, J.J. LEE, J.C. NESBITT, K.M. PISTERS, J.B. PUTNAM, R. SCHEA, D.M. SHIN, G.L. WALSH, M.M. DOLORMENTE, C.I. HAN, F.D. MARTIN, N. YEN, K. XU, L.C. STEPHENS, T.J. MCDONNELL, T. MUKHOPADHYAY and D. CAI. 1996. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patient with lung cancer. *Nat. Med.* 2: 974–974.
- SHERR, C.J. 1996. Cancer cell cycle. *Science*. 1672–1677.
- TAN, M., Y. WANG, K. GUAN and Y. SUN. 2000. PTGF- β , a type β transforming growth factor (TGF- β) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF- β signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(1): pp. 109–144.
- THOTTASSERY, J.V., G.P. ZAMBETTI, K. ARIMORI, F.G. SCHUETZ and J.D. SCHUETZ. 1997. p53 dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 11037–11042.
- TIENMANN, F., J. ZERRAHN and W. DEPERT. 1995. Cooperation of simian virus 40 large and small T antigens in metabolic stabilization of tumor suppressor p53 during cellular transformation. *J. virol.* 69: 6115–6121.
- WANG, X.W., K. FORRESTER, H. YEH, M.A. FEITELSON, J. GU and C.C. HARRIS. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2230–2234.
- WEINSTEIN, J.N., T.G. NIERS, P.N. O'CONNOR, S.H. FRIEND, A.J. JR. FORNACE, K.W. KOHN, T. FOCO, S.E. BATES, L.V. RUBINSTEIN, N.L. ANDERSON, J.K. BUOLAMWINI, W.W. VAN OSDOL, A.P. MONKS, D.A. SCUDIERO, E.A. SAUSVILLE, W.W. ZAHAREVITZ, B. BUNOU, V.N. VISWANADHAN, G.S. JOHNSON, R.E. WITTES and K.D. PAULL. 1997. An Information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 275: 343–349.
- WICKHAM, T.J., P. MATHIAS, D.A. CHERESH and G.R. NEMEROW. 1993. Integrins α v β 3 and α v β 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 73: 309–319.
- WU, G.S. and W.S. EL-DEIRY. 1996. Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clin. Cancer Res.* 2: 623–633.