

Peran Telomer dan Telomerase pada Kanker Payudara

¹Ria Kodariah, ²Ayla Putri

¹Departemen Patologi Anatomi

²Program Studi Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran,

Universitas Indonesia

Jakarta

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak terjadi pada wanita di Indonesia. Perubahan sel-sel payudara normal menjadi malignan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah perubahan genetik yaitu mutasi, baik mutasi bawaan maupun yang didapat. Hal-hal yang menjadi faktor risiko penyebab timbulnya kanker payudara diantaranya adalah usia *menarche* yang telalu dini (<12 tahun), obesitas, usia tua, merokok dan konsumsi alkohol. Faktor-faktor ini dapat menimbulkan ketidakstabilan genetik sehingga terjadi perubahan-perubahan pada DNA. Perubahan penting yang terjadi adalah hilangnya fungsi *tumor suppressor gene*, mutasi pada gen signaling pertumbuhan, serta terjadinya kestabilan panjang telomer dan bahkan pemanjangan telomer sehingga sel-sel normal berubah menjadi *immortal* kemudian menjadi sel kanker. Telomer sendiri merupakan struktur yang unik karena telomer menjaga integritas genomik serta berperan sebagai jam biologis untuk menentukan kapan sel akan mati. Telomer adalah struktur heksanukleotida yang terdapat pada ujung-ujung kromosom. Setiap kali sel membelah, maka telomer yang awalnya berukuran 5-10 kb akan bertambah pendek. Ketika ukurannya menjadi sangat pendek (3-4 kb), maka akan dimulai proses apoptosis yang mengarah pada kematian sel. Namun sel-sel tertentu dapat melaikan diri dari proses kematian dengan cara mempertahankan panjang telomernya. Cara sel mempertahankan panjang telomernya adalah dengan mengekspresikan telomerase. Telomerase adalah enzim ribonukleoprotein yang dapat memperpanjang ukuran telomer. Enzim ini secara fisiologis tidak ditemukan pada sel-sel dewasa normal, namun dapat ditemukan pada sel germinal dan dapat pula ditemukan pada sel-sel kanker. Pada sel kanker payudara, telomerase berasosiasi dengan ukuran tumor yang besar dan berasosiasi dengan buruknya angka kesintasan pada pasien kanker mamae.

Kata kunci : Kanker payudara, telomer, telomerase

PENDAHULUAN

Kanker payudara adalah penyakit keganasan yang mengenai epitel duktus dan alveolus payudara. Merupakan keganasan yang paling umum terjadi pada wanita di seluruh dunia dan merupakan 18% dari kasus kanker pada wanita. Setiap tahun, ada satu juta kasus baru di seluruh dunia dan hampir 60.000 pasien meninggal karena penyakit ini. Di AS, ada 600.000 kasus per tahun, di negara maju lainnya ada 350.000 kasus, sementara di negara berkembang ada 250.000 kasus per tahun.¹

Etiologi kanker payudara tidak diketahui dengan pasti. Namun beberapa faktor resiko pada pasien diduga berhubungan dengan kejadian kanker payudara. Resiko kanker payudara meningkat pada wanita yang mengalami menstruasi sebelum usia 12 tahun (*menarche* dini.). Hal ini dikarenakan anak perempuan yang mengalami menstruasi sebelum usia 12 tahun memiliki serum estradiol yang tinggi namun testosteron dan dehydroepiandrosterone yang rendah.^{2,3} Nulipara juga meningkatkan risiko kanker payudara

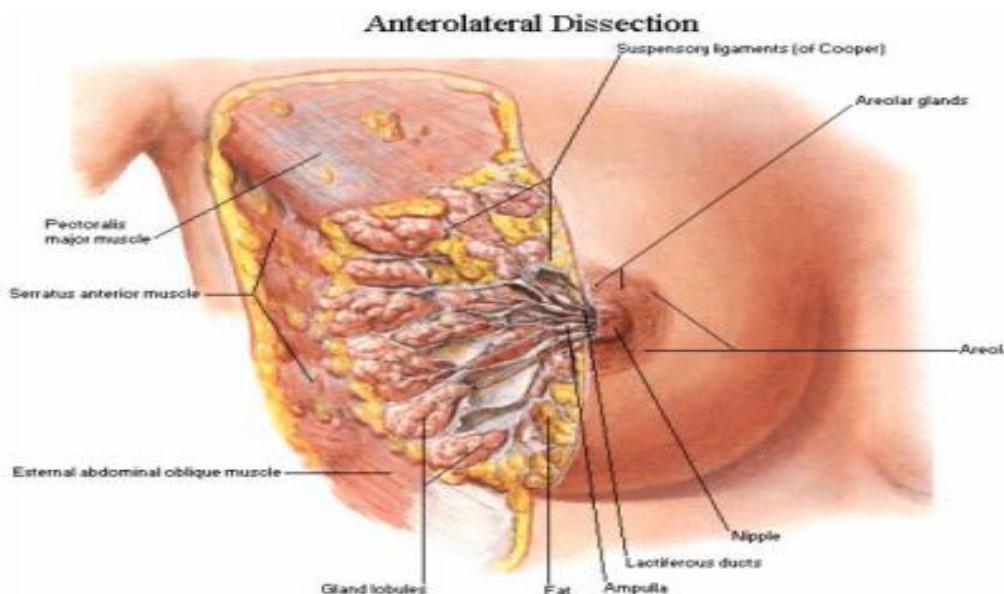
karena saat hamil terjadi diferensiasi pada epitel mamae, jumlah *stem cell mamae* berkurang, meningkatkan respon sel mamae terhadap estrogen, dan mengurangi level hormon estrogen yang bersirkulasi.³ Riwayat tumor payudara jinak dan wanita yang mempunyai tumor payudara disertai perubahan epitel proliferatif mempunyai resiko dua kali lipat untuk mengalami kanker payudara sedangkan wanita dengan hiperplasia tipikal mempunyai resiko empat kali lipat untuk mengalami penyakit ini.^{2,3} Beberapa penelitian menunjukkan bahwa wanita *post-menopause* dengan indeks massa tubuh (BMI) tinggi berasosiasi dengan peningkatan risiko kanker payudara. Sebagai contoh peningkatan 5-unit BMI berhubungan dengan peningkatan risiko sebesar 12%. Diantara wanita *post-menopause* yang obes, risiko meningkat menjadi 20%-40% dibandingkan dengan wanita dengan BMI normal.² Wanita yang menggunakan kontrasepsi oral beresiko tinggi untuk mengalami kanker payudara, karena perkembangan kanker dipengaruhi oleh hormon estrogen dan progesteron. Resiko tinggi ini menurun dengan cepat setelah penghentian medikasi.³ Pada terapi sulih hormone, penggunaan estrogen dalam jangka panjang (Lebih dari 10-15 tahun) dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker payudara.^{2,3} Peningkatan risiko ditemukan pula pada wanita yang menkonsumsi alkohol. Resiko ini dua kali lipat pada wanita yang minum alkohol dengan frekuensi tiga kali sehari. Data epidemiologi

menunjukkan di negara dimana minuman anggur dikonsumsi secara teratur (misal: Perancis dan Italia), Angka kejadian kanker payudara sedikit lebih tinggi. Beberapa temuan menunjukkan bahwa wanita muda yang minum alkohol lebih rentan untuk mengalami kanker payudara pada tahun-tahun berikutnya.^{3,4}

Salah satu tanda keganasan adalah proliferasi sel yang tidak terkontrol yang diantarnya dipertahankan oleh aktivitas telomerase mempertahankan Panjang telomere. Pada kanker payudara telomer sendiri menurut beberapa penelitian memainkan peran yang penting dalam menentukan luaran klinis pasien seperti derajat keganasan. Telomer diduga kuat menjadi marker buruknya prognosis pasien karena berhubungan dengan penotif kanker yang agresif, ukuran kanker yang lebih besar dan menyumbang sifat resisten terhadap agen-agen kemoterapi cytotoxic.⁴ Tujuan penulisan untuk membahas tentang peran telomer serta telomerase dan kaitannya dengan kanker payudara.

Anatomi dan Fisiologi Payudara

Kelenjar payudara wanita sebagian besar terletak di anterior otot pektoralis mayor. Sebagian kecil dari bagian latero-inferiornya terletak di depan otot seratus anterior. Batas superior, inferior terletak di antara sela iga ke 2-6 atau ke 3-7. Batas medial adalah linea parasternal, batas lateral adalah linea aksilaris anterior, kadang kala mencapai linea aksilaris media.⁵

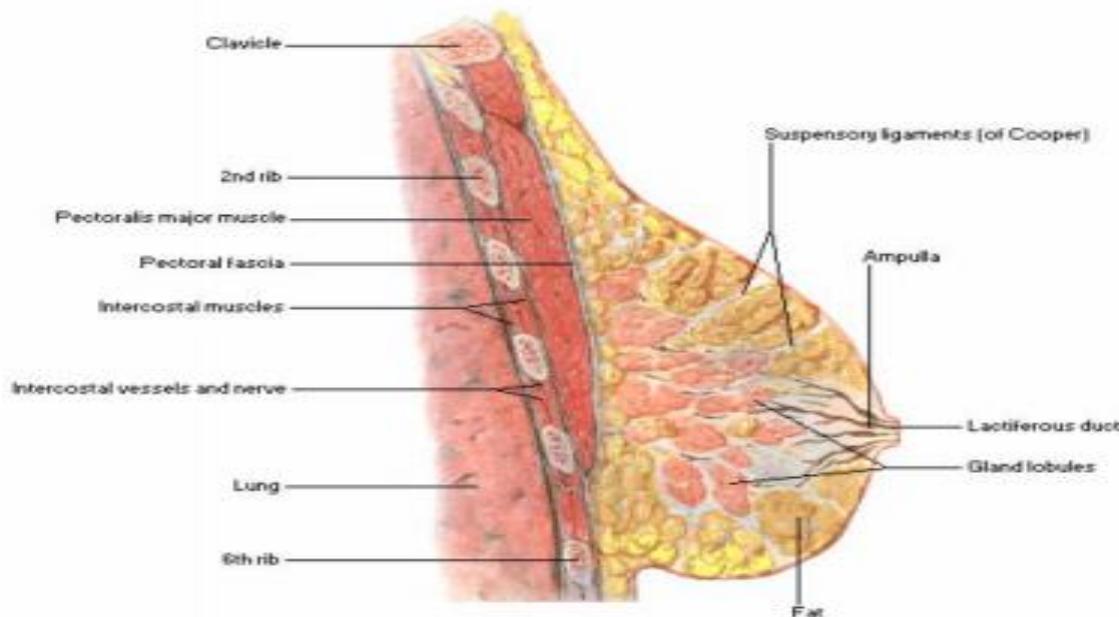


Gambar 1. Anatomi payudara⁵

Sentrum dari kelenjar payudara adalah papila mammae, sekelilingnya terdapat lingakaran areola mammae. Areola mammae memiliki tonjolan kelenjar areolar, saat menyusui dapat menghasilkan sebum yang melicinkan papila mammae. Kelenjar payudara memiliki 15-25 lobulus, yang masing-masing adalah kelenjar campuran tubuloalveolar dipisahkan oleh jaring-

an ikat padat interlobaris. Tiap lobulus merupakan satu sistem tubuli laktiferi yang berawal dari papila mamae. Sistem tubuli laktiferi dapat dibagi menjadi sinus laktiferi, ampula duktus laktiferi, duktus laktiferi besar, sedang, kecil, terminal, dan asinus serta bagian lainnya. Sebagian duktus besar menjelang ke papila saling beranastomosis.⁵

Sagittal Section



Gambar 2. Potongan sagital payudara.⁵

Ketika baru lahir kelenjar payudara normal terdiri dari epitel rudimeter yang terdapat pada jaringan stroma yang *immature*. Pada saat itu reseptor refrakter terhadap pengaruh hormon steroid karena reseptor hormonal belum diekspresikan sampai pasien menjadi dewasa. Berbagai reseptor mulai diekspresikan sebelum pubertas. Dengan diproduksinya hormon steroid dari ovarium wanita dewasa maka epitel payudara memanjang dan membentuk kelenjar epitel duktus payudara yang kemudian di bawah pengaruh progesteron dan prolaktin beserta masing-masing reseptornya maka duktus payudara ini bertambah panjang dan bercabang. Hubungan antara epitel payudara dan stromanya sangat tergantung adanya reseptor hormonal yang berada di stroma dan sel epitel payudara yang sangat kompleks karena melibatkan banyak faktor pertumbuhan lain. Terjadinya pertumbuhan normal dipengaruhi

hormon steroid apabila sel epitel dan stromanya mempunyai reseptor hormonal.⁵

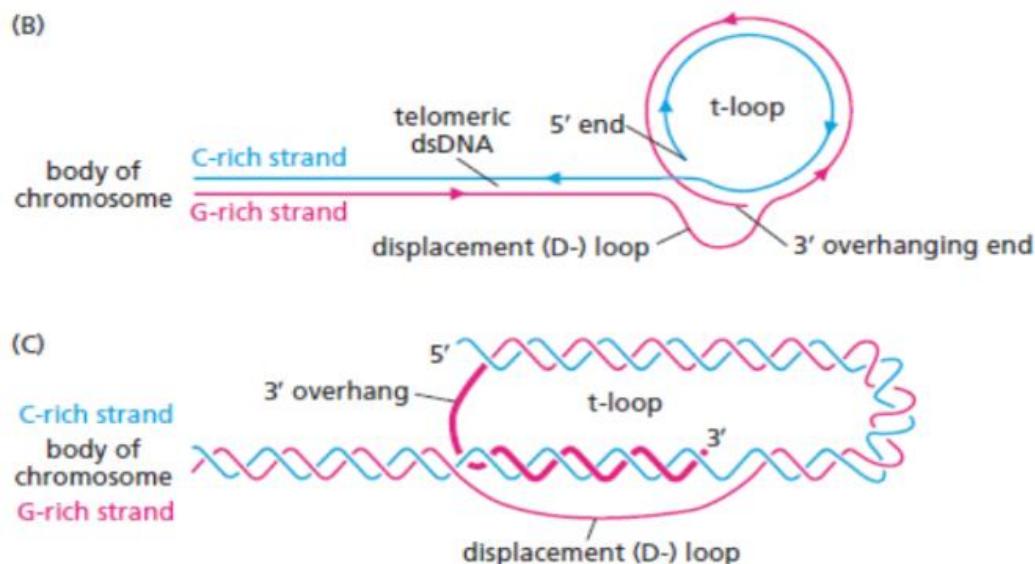
Perubahan histologi payudara erat hubungannya dengan variasi perubahan endokrin, sesuai dengan proses fisiologi mulai dari awal menstruasi sampai *post-menopause*. Pada waktu pubertas di bawah pengaruh *folicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH), fase folikuler ovarium akan menghasilkan hormon steroid estrogen sehingga terjadi proliferasi epitel payudara, peningkatan mitosis, sintesis RNA, pembesaran nukleus dan perubahan organel intraseluler seperti pertambahan dan pembesaran badan golgi, ribosom, dan mitokondria. Puncak kedua perubahan payudara adalah fase mid-luteal, ketika korpus luteum menghasilkan progesteron. Peningkatan progesteron ditandai dengan dilatasi duktus, percabangan duktus dan perubahan sel-sel alveolar menjadi sel-sel sekretorik. Perubahan ini tidak hanya terjadi pada epitel

payudara, tetapi juga pada stromanya melalui mekanisme yang melibatkan banyak molekul yang bersifat endokrin, parakrin dan autokrin. Pada keadaan *menopause* estrogen dibentuk karena ada aktivitas enzim aromatase yang terdapat pada jaringan stroma payudara dari sel fibroblast dan sel lemak.^{5,6,7}

Telomer dan Perannya pada Kanker Payudara

Pada sel-sel normal terdapat sebuah kontrol molekuler yang mengatur usia dan laju proliferasi sel. Mekanisme pengaturan usia dan proliferasi sel ini diantaranya adalah melalui telomer. Telomer adalah bagian ujung DNA linear yang mengandung nukleotida berulang. Pada ujung-ujung tiap kromosom terdapat

sekuens heksanukleotida terdiri dari 5'-TTAGGG-3' pada satu strand (*G-rich strand*), dan rantai komplemen 5'-CCCTAA-3' di rantai lainnya (*C-rich strand*) yang diulang beribu-ribu kali, dan bersama dengan protein tertentu membentuk telomer yang fungsional. *G-rich strand* lebih panjang beberapa ratus nukleotida, menghasilkan *single stranded 3'-overhang*. Strand yang menggantung ini biasanya ditemukan dalam konfigurasi yang tidak biasa, dinamakan t-loop. Konfigurasi t-loop muncul pada ujung semua telomer. T-loop pada telomer melindungi DNA yang linear dari enzim yang dapat memodifikasi DNA, dikarenakan regio ujung dari untai tunggal pendek yang menggantung tersebut terlipat kedalam regio untai ganda.⁸

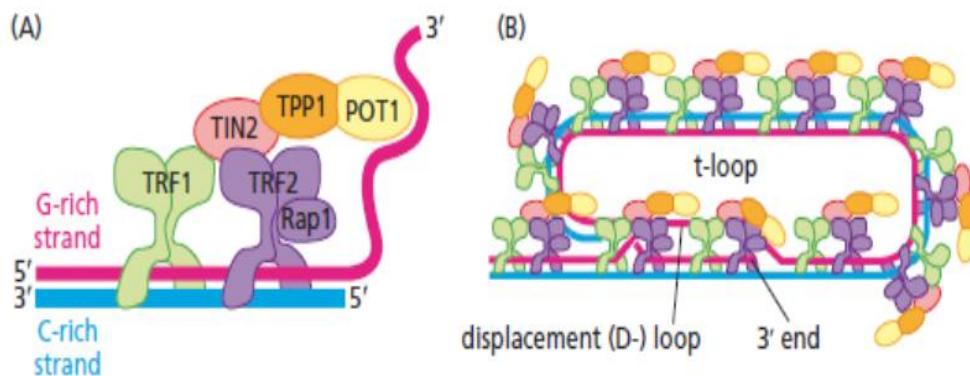


Gambar 3. Istruktur telomer: t-loop, G-rich dan C-rich strand.⁷

Baik untai ganda yang panjang maupun ujung untai tunggal yang menggantung, terikat pada beberapa protein spesifik. Protein ini antara lain memiliki domain yang secara spesifik mengenali dan terikat pada sekuens heksanukleotida yang ada di regio untai tunggal dan untai ganda pada DNA telomer. DNA telomer membentuk kompleks nukleoprotein yang disebut telomer.²⁴

Telomer dikelilingi oleh protein-protein tertentu. DNA telomerik dilindungi dari proses

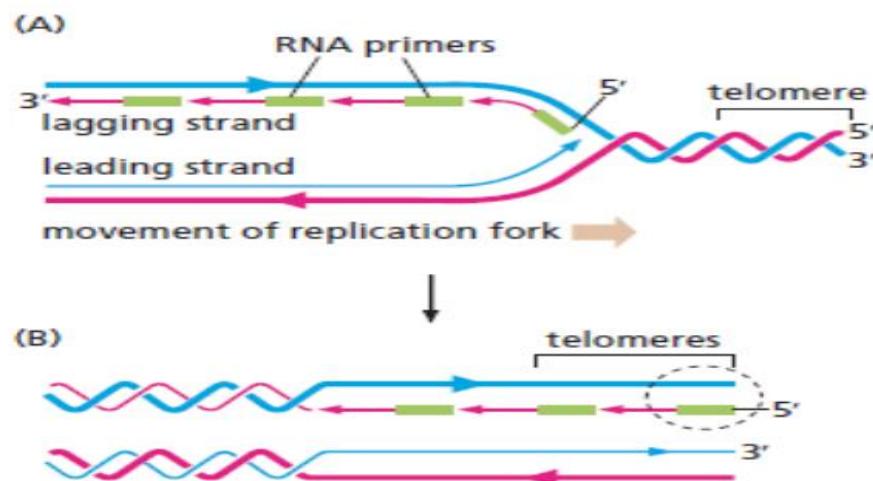
degradasi oleh protein-protein yang membentuk kompleks shelterin. Protein TRF1 dan TRF2 menempel pada DNA untai ganda bagian telomer, sedangkan protein lain yaitu POT1 menempel pada kedua *single strand 3'overhang*, diciptakan oleh *G-rich strand* serta ssDNA pada *displacement (D-) loop*. Ikatan antara POT1 dengan ssDNA membantu menstabilkan D-loop.⁸

Gambar 4. Protein spesifik yang terikat pada DNA telomer.⁸

Kompleks shelterin muncul sangat banyak pada tiap telomer dan bertanggung jawab untuk mempertahankan struktur t-loop. Dengan menempelnya D-loop, POT1 dapat menstabilkan struktur ini, dan t-loop secara keseluruhan.⁸

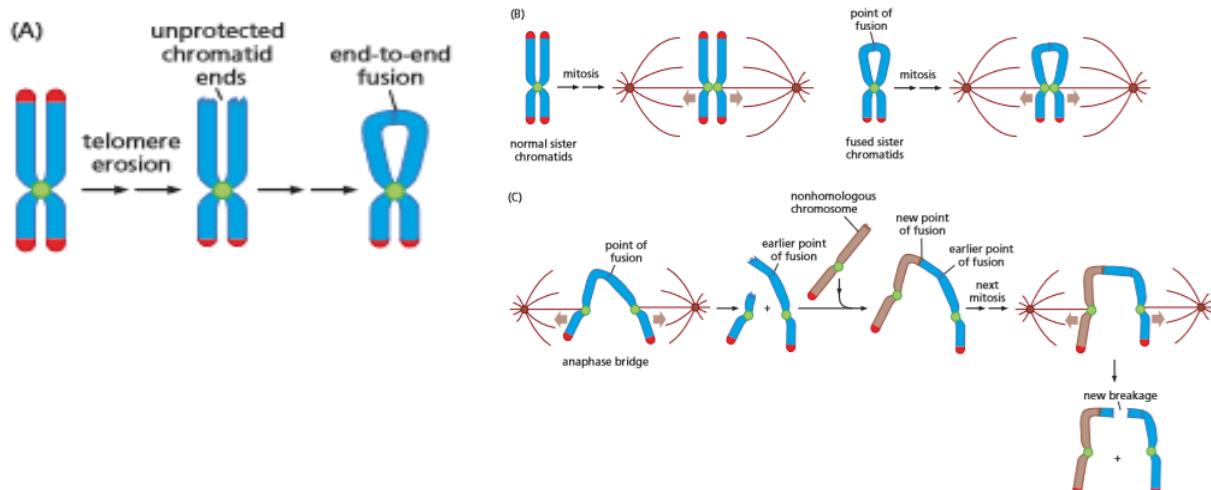
Saat replikaasi terjadi, pada fase S dari siklus sel sedang aktif mengkopi sekuen pada bagian tengah molekul DNA linear, terdapat kesulitan dalam mengkopi bagian ujung dari kromosom. Kesulitan dalam mengkopi bagian ujung ini dapat ditelaah dengan melihat apa saja yang dibutuhkan dalam sintesis rantai DNA saat replikasi, diantaranya adalah harus diinisiasi pada ujung 3'-hidroksil pada rantai DNA yang bersangkutan yang berperan sebagai primer untuk memperpanjang rantai DNA. Jika tidak ada primer DNA, ujung 3' RNA dapat berperan sebagai primer untuk sintesis DNA. Enzim primase yang bertanggung jawab meletakan primer RNA pendek kemudian malah meletakan primer RNA pada titik tertentu dari 3' terminal dari rantai template dimana tempat terjadinya

sintesis lagging strand. Di sini sebuah DNA polimerase akan menginisiasi sintesis DNA rantai baru yang kekurangan sejumlah basa tertentu yang komplementer terhadap ujung 3' pada rantai template. Walaupun primase menempel dan membuat primer RNA pada ujung rantai template, sekuen selanjutnya kurang lebih 10 nukleotida dari RNA primer tidak akan muncul pada rantai baru yang sedang disintesis, karena primer RNA akan didegradasi setelah menyelesaikan tugasnya menginisiasi elongasi rantai DNA. Hasil akhirnya sekuen nukleotida pada ujung setiap dua rantai template DNA tidak akan direplikasi seutuhnya. Masalah replikasi pada bagian ujung inilah yang memberikan penjelasan molekular mengapa telomer memendek pada setiap siklus sel. Selain masalah ini, ada eksonuklease yang secara perlahan mendegradasi DNA telomer dan mengakibatkan erosi telomer. Hampir semua sel manusia normal akan kehilangan telomer 50-100 pasang basa DNA disetiap regenerasi sel.

Gambar 5. Ilustrasi replikasi sel dan pemendekan telomer.⁹

Telomere disfungisional muncul akibat pemendekan telomer pada sel somatik normal selama pembelahan sel yang progresif, menimbulkan respons kerusakan DNA (DDR, *DNA Damage Response*) yang memicu penuaan sel. Sel-sel yang mendapatkan perubahan onkogenik melalui penuaan dan terus membelah (periode masa hidup yang diperpanjang) sampai telomer sangat pendek pada beberapa generasi sel dan sel memasuki masa krisis (periode *complete replicative senescence, chromosome end-to-end*

fusions, dan apoptosis yang luas). Hal ini menyebabkan *breakage-fusion-bridge cycles* di mana dua *sister chromatids* kekurangan telomer menyatu bersama-sama, membentuk jembatan dengan koneksi kromatin. Selama anafase, *sister chromatids* ditarik terpisah karena gerakan menuju kutub berlawanan, menghasilkan pembentukan kromosom derivatif yang tidak merata, yang mengarah ke ketidakstabilan genom. Periode krisis menghasilkan kematian sel yang luas.



Gambar 6. *Chromosome end-to-end fusion and breakage-fusion-bridge cycles*.¹⁰

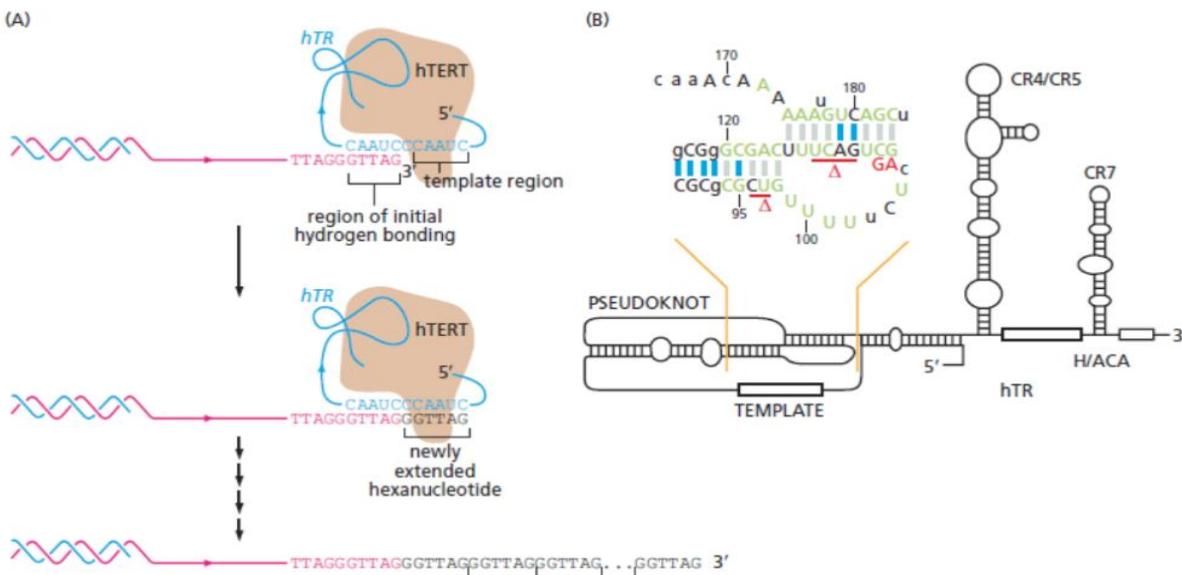
Jadi seharusnya, pada sel normal telomer memiliki panjang sekitar 5-10 kB dan akan memendek setiap kali sel tumbuh dan membelah (menjadi 3-4 kB). Ketika telomer menjadi sangat pendek, maka hal inilah dinamakan krisis sel. Krisis sel akan memicu penuaan dan kaskade kematian sel. Pada sel-sel abnormal, sel tersebut dapat melarikan diri dari krisis dan menjadi *immortal*. Salah satu cara untuk menjadi *immortal* adalah dengan memperpanjang telomer, dan mempertahankannya. Cara untuk menambah panjang telomer adalah dengan mensintesis dan mengaktifkan enzim telomerase. Pada penelitian Lingeng Lu *et al* menunjukkan bahwa pasien yang mempunyai telomer panjang ataupun pendek memiliki kesintasan hidup yang hampir sama, baik dalam tingkat rekurensi penyakit ataupun kematian.¹⁰ Namun demikian terdapat studi lain yang menyatakan bahwa mortalitas pada kanker payudara meningkat dengan pertambahan panjang telomer ($n= 176$, HR= 2.29; 95% CI, 1.33-6.41).¹¹

Peran Telomerase pada Kanker Payudara

Telomerase adalah enzim ribonukleoprotein yang tersusun atas subunit katalitik TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) dan komponen RNA TERC (*Telomerase RNA Component*) distabilisasi oleh dyskerin dan menempel dengan 3' overhang *G-rich strand*. Aktivitas telomerase diatur oleh beberapa hal termasuk level ekspresi gen koding subunit telomerase, level post-translasi dan fosforilasi protein. Ada banyak faktor transkripsi dan koregulator ekspresi telomerase seperti onkogen Myc, onkoprotein HPV E6, NF kappaB dan beta-katenin. Beberapa jalur *tumor suppressor* seperti Rb, Wt1, jalur beta TGF meregulasi telomerase secara negatif dan kehilangan jalur ini dapat menyebabkan upregulasi telomerase. Pada keadaan fisilogis, sel-sel germinal memiliki kadar dan aktivitas telomerase yang tinggi. Pada sel normal dan terdiferensiasi, telomerase tidak ditemukan atau kadarnya sangat sedikit. Banyak tumor mempertahankan telomer dengan mengekspresikan telomerase.¹² Survey aktivitas kanker pada manusia menunjukkan bahwa kebanyakan kanker memiliki level telomerase

yang cukup tinggi untuk dapat terdeteksi menggunakan TRAP assay. Minoritas tumor melawan limitasi Hayflick dengan jalur alternatif pemanjangan telomer. Mekanisme pemeliharaan panjang telomer adalah basis untuk potensi

replikasi yang tak terbatas-*hallmark* kanker. Banyak adenokarsinoma mengekspresikan aktivitas telomerase termasuk kanker payudara.^{13,14}



Gambar 7. Struktur holoenzim telomerase manusia.¹⁵

Pada gambar diatas tampak struktur holoenzim telomerase yang terdiri dari dua subunit inti yaitu hTERT dan subunit RNA hTR. Holoenzim melekat pada *end of 3' overhang G-rich strand*. Dengan adanya sekuens *reverse transcriptase* pada subunit hTR, hTERT dapat memperpanjang rantai-G sebanyak enam nukleotida. Dengan proses ini dilakukan berulang-ulang, telomerase mampu diperpanjang sampai ribuan nukleotida.^{15,16}

Subunit hTR dibentuk hanya dari 451 ribonukleotida. Pada bagian tengahnya, pseudoknot, merupakan struktur kompleks topologi yang memiliki tiga rantai helix. Perbandingan telomerase pada 51 spesies memperlihatkan sejumlah nukleotida yang dipertahankan seperti pada gambar diatas, lebih dari 95% (warna hijau), lainnya 80-95% (hitam), sisanya yang tidak terlalu dipertahankan kurang dari 80% (hitam, bagian bawah). Pada gambar dapat terlihat kondisi patologis pada manusia yang muncul akibat mutasi (warna merah) pada sekuens hTR yang terlibat akibat adanya substitusi atau delesi, meningkatkan fungsi telomerase.¹⁵

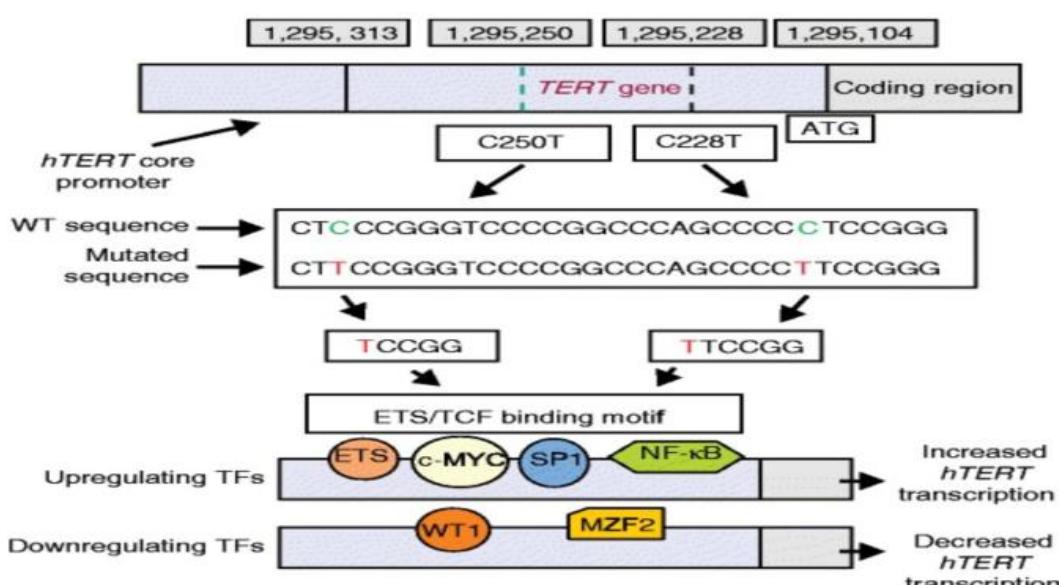
Sebelum sel memasuki krisis, sel manusia sebetulnya tidak memiliki telomerase

(telomerase negatif) dan tidak mengekspresikan hTERT mRNA. Namun ketika terdapat sel yang *immortal* dalam populasi sel-sel tersebut, maka biasanya turunan sel *immortal* tadi akan mengekspresikan level hTERT mRNA yang signifikan dan memunculkan aktivitas enzim telomerase.¹⁵ Aktivitas enzim telomerase yang terdapat pada sel dapat membantu sel tersebut menjadi *immortal*, sifat *immortal* inilah yang akan mengarah pada keadaan neoplastik.¹⁷

hTERT adalah gen 40 kb yang terdiri dari 15 intron dan 16 ekson. hTERT terletak di lengan pendek kromosom manusia 5 (5p15.33) sekitar 1,2 megabases dari telomere, tertanam dalam *nuclease-resistant chromatin domain*. Promotor hTERT adalah *GC-rich* dan tidak memiliki kedua TATA (ditemukan di daerah promotor gen yang menyandikan protein yang ditemukan di eukariota dan prokariota) dan CAAT (yang jarang pada daerah promotor eukariota tetapi benar-benar tidak ada di prokariota) tetapi mengandung mengikat situs untuk beberapa faktor transkripsi, menunjukkan bahwa ekspresi hTERT berada di bawah berbagai tingkat kontrol dan dapat diatur oleh berbagai faktor dalam konteks seluler yang berbeda.¹⁸

Daerah proximal 260 bp yang ditunjuk sebagai inti promotor hTERT bertanggung jawab untuk sebagian besar aktivitas transkripsi-nya. Ini berisi setidaknya lima kotak GC (GGGCGG), yang merupakan situs pengikatan untuk faktor transkripsi *zinc finger* SP1, dan sangat penting untuk aktivitas promotor hTERT. Dua kotak E (5'-CACGTG-3'), terletak pada posisi -165 dan +44, sekuans nukleotida hTERT relatif terhadap situs awal transkripsi (TSS), menyediakan situs pengikatan untuk beberapa *enhancer binding protein* seperti MYC/MAX/ MXD1 keluarga dan USF1/2. *E-box* tidak hanya penting untuk aktivasi promotor hTERT oleh c-MYC, tetapi juga mengikat ke MAD1 dan USF1 untuk memediasi represi hTERT. Inti promotor hTERT juga mengandung satu TSS yang mengikat faktor transkripsi multifungsi TFII-I. Transkripsi promotor hTERT diatur oleh beberapa faktor transkripsi dan lingkungan telomer kromatin. Namun, tetap tidak terpecahan

bagaimana interaksi antara faktor transkripsi dan lingkungan *telomere chromatin* mendukung transkripsi hTERT. Beberapa faktor transkripsi berikan dengan inti promotor hTERT untuk mengaktifkan atau menekan transkripsi hTERT. Faktor transkripsi yang meningkatkan transkripsi termasuk anggota keluarga c-MYC, SP1, E-twenty-six (ETS), NF- κ B, AP-2 dan HIF-1. Faktor-faktor transkripsi seperti p53 (juga dikenal sebagai TP53; merepresi transkripsi dengan cara yang bergantung pada SP1), MAD (faktor transkripsi yang terlibat dalam jaringan yang mengontrol progresi siklus sel), WT1, MZF-2, SIP1 dan menin telah terbukti menurunkan regulasi transkripsi hTERT. Sebagian besar faktor transkripsi yang meningkatkan gen telomerase diekspresikan secara luas namun tidak sepenuhnya bertanggung jawab untuk ekspresi dan aktivasi hTERT yang tinggi selama tumorigenesis.¹⁸⁻²¹



Gambar 8. Transkripsi hTERT dan mutasi promoter.¹⁹

Observasi terbaru dari dua mutasi rekuren pada dua lokasi di dalam wilayah promotor inti dari hTERT menunjukkan satu mekanisme utama yang mungkin berperan dalam aktivasi telomerase sel kanker. Mutasi yang terjadi pada -124 bp dan -146 bp *upstream* dari situs awal ATG, adalah transisi C>T (pada posisi 1,295,228 (C228T) dan 1,295,250 (C250T) pada kromosom 5), dan setiap mutasi menghasilkan muatan 11 bp identik. *Nucleotide stretch* (5'-CCCTTCCGGG-3') yang mengandung con-

sensus *binding motif* (GGA (A/T)) untuk faktor transkripsi ETS yang dapat berfungsi sebagai represor transkripsi, aktivator atau keduanya untuk mengatur ekspresi telomerase. Ekspresi telomerase yang tinggi berperan dalam mempertahankan panjang telomer, dan tumorigenesis.²¹

Aktivitas telomerase pada tumor dan jaringan tubuh manusia berbeda-beda. Pada Jaringan germinal (ovarium dan testis) dan hampir semua tumor stadium lanjut menunjuk-

kan aktivitas positif telomerase, sedangkan pada tumor jinak dan jaringan yang berdekatan

dengan tumor umumnya negatif. (Tabel 1).²²

Tabel 1. Aktivitas telomerasi pada berbagai jaringan tubuh dan jaringan tumor.²²

Tissue type	Telomerase activity (no. positive/no. tested)	Tissue type	Telomerase activity (no. positive/no. tested)
Fetal testis	2/2	Normal breast tissue (from noncancer patients)	0/8
Adult testis	1/1	Prostate cancer	2/2
Fetal ovary	2/2	Prostatic intraepithelial neoplasia type 3	3/5
Ovarian follicle	1/1	Benign prostatic hyperplasia	1/10
Gastrointestinal malignancies		Normal prostatic tissue	0/8
Hepatocellular carcinoma*	1/1	Neuroblastoma	5/5
Colon cancer	8/8	Brain tumors	6/8
Adjacent colonic tissue	0/7	Lung small-cell carcinoma	4/4
Colonic tubular adenoma	0/1	Rhabdomyosarcoma	1/1
Colonic polyp	0/1	Leiomyosarcoma	3/3
Squamous cell carcinoma (head and neck)	14/16	Leiomyoma (fibroids)	0/11
Adjacent tissue	6/16	Normal myometrium	0/10
Wilms tumor	6/6	Hematological malignancies	
Adjacent kidney tissue	2/6	Acute lymphocytic leukemia	14/16
Breast cancer (ductal and lobular, node positive)	18/20	Chronic lymphocytic leukemia	2/2
Breast cancer (axillary node negative)	1/4	Lymphoma (adult)	5/5
Adjacent tissue	2/20		

Secara klinis terdapat hubungan antara aktivitas telomerase dan ukuran tumor. Aktivitas telomerase yang tinggi disertai Estrogen reseptor (ER) positif menunjukkan jenis kanker payudara yang agresif. Selain itu tumor dengan aktivitas telomerase yang tinggi ditambah dengan HER-2/neu positif juga menunjukkan tingkat agresivitas yang tinggi dan prognosis yang buruk.^{23,24}

Studi lain menunjukkan pasien kanker payudara dengan aktivitas telomerase yang tinggi memiliki angka harapan hidup yang rendah (<10 tahun) dibandingkan dengan pasien yang aktivitas telomerasenya tidak tinggi.²⁵ Studi yang dilakukan Lu *et al*, menunjukkan aktivitas telomerase yang tinggi berhubungan dengan peningkatan risiko kematian (*hazard ratio* (HR)=3.15; 95% CI: 1.34 to 7.40) diantara pasien yang diberikan kemoterapi, berapapun usianya, stadium tumornya, tipe histologis dan status reseptor hormon. Hasil yang berbeda ditemukan pada pasien yang diterapi dengan terapi endokrin, di mana telomerase yang tinggi berhubungan dengan angka kesintasan hidup yang tinggi. Sebaliknya pasien yang menerima terapi adjuvant, dengan kadar telomerase yang tinggi menyebabkan penurunan angka kesintasan hidup.²⁶

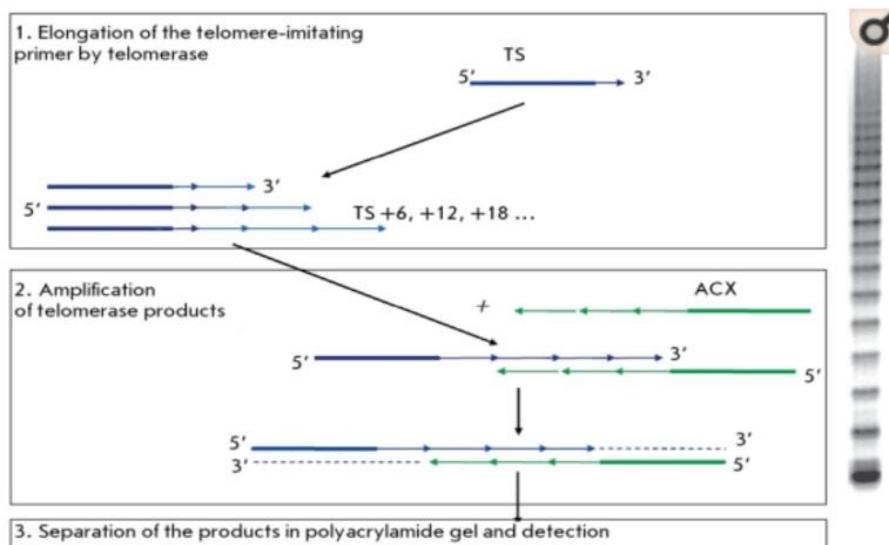
Diskrepansi ini menunjukkan bahwa telomerase mungkin mengganggu pengobatan adjuvant. Sudah diketahui bahwa telomerase dapat mempertahankan kestabilan genom dengan cara memperpanjang telomer pada sel

normal, namun bukti-bukti terbaru menyebutkan bahwa telomerase mungkin memiliki pengaruh yang berbeda dalam perkembangan tumor, dan efeknya adalah independen terhadap panjang telomer. Enzim ini mempengaruhi transformasi sel-sel malignan dan menyebabkan sel mampu menghindar dari apoptosis.^{11,27}

Pemeriksaan untuk mendeteksi aktivitas telomerase.

a. TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocols*).

TRAP merupakan metode berbasis polymerase chain reaction (PCR) dan merupakan metode standar untuk pemeriksaan diagnostik yang berkaitan dengan telomerase. Protokol TRAP dapat dibagi menjadi tiga tahap utama yaitu: pemanjangan primer (elongasi), amplifikasi DNA yang disintesis dengan telomerase, dan deteksi. Pada tahap elongasi, pengulangan telomerik ditambahkan ke *telomere-imitating oligonucleotide* pada ekstrak sel yang mengandung telomerase. Kemudian, *PCR-amplification of telomerase-synthesized DNA* dilakukan dengan penggunaan primer spesifik (*telomere-imitating and reverse primers*). Pada tahap ini, label yang berbeda dapat dimasukkan ke dalam DNA yang disintesis melalui telomerase, seperti radioaktif, fluorescent, atau label affine.²⁸

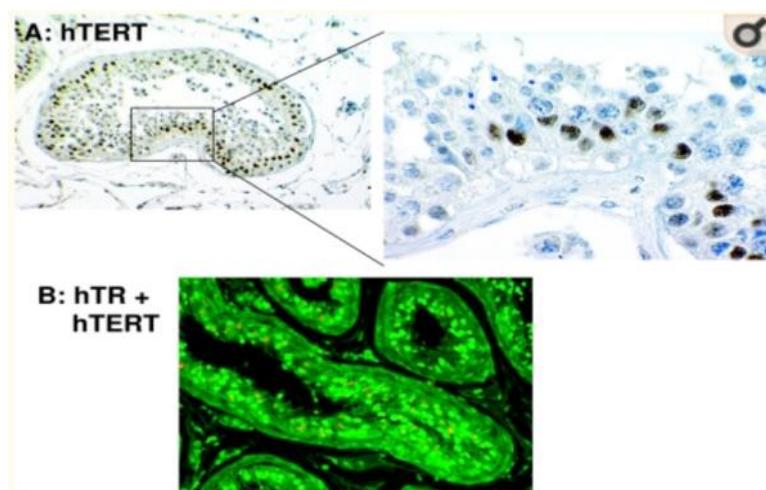
Gambar 9. TRAP assay.²⁸

b. Deteksi aktivitas telomerase dengan *telomerase-synthesized DNA*.

Metode ini didasarkan pada kemampuan telomerase untuk memperpanjang oligonukleotida dengan adanya dNTP. Jika oligonukleotida atau salah satu dNTP (biasanya, dGTP), karena *telomerase-synthesized telomeres* kaya akan residu guanin) mengandung label radioaktif, aktivitas telomerase dapat dinilai secara elektroforetis oleh penggabungan ke dalam DNA. Kelemahan utama metode ini karena menggunakan isotop radioaktif dan dalam banyak kasus dengan kandungan telomerase rendah kurang sensitif.²⁹

c. Deteksi subunit hTERT telomerase dengan imunohistokimia.

Prinsip penggunaan imunohistokimia adalah dengan menggunakan ikatan antigen dan antibodi baik secara langsung ataupun tidak langsung. Dapat digunakan antibodi poliklonal atau monoklonal terhadap hTERT. Antibodi yang digunakan dapat dilabel dengan enzim atau zat fluoresensi. Evaluasi dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop cahaya bila pelabel yang digunakan enzim serta mikroskop fluoresensi bila pelabel yang digunakan zat fluoresensi intensitas *immunostaining* dievaluasi dengan mikroskop cahaya.³⁰

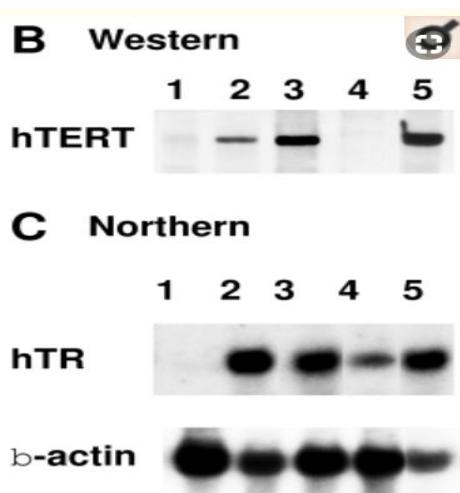
Gambar 10. Pulasan imunohistokimia hTERT pada testis normal. A. Pulasan IHK dengan pelabel enzim B. Pulasan IHK dengan pelabel zat fluoresensi.³⁰

d. Analisis Northern blot.

Northern Blot digunakan untuk analisis total RNA hTR. RNA yang telah diekstraksi dari jaringan beku dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%. 10 µg total RNA ditransfer ke dalam filter nitroselulosa dan dihibridisasi dengan probe hTR berlabel 32P. Pembacaan dilakukan dengan autoradiografi menggunakan analisis pencitraan posfor. Evaluasi dilakukan dengan membandingkan dengan pita housekeeping gene β -aktin.³¹

e. Analisis Western Blot.

Analisis western blot dilakukan terhadap ekstrak protein telomerase. Dilakukan elektroforesis pada 20 µg protein pada gel poliakrilamid natrium dodesil sulfat (SDS) - 7,5% yang dipindahkan ke filter nitroselulosa. Immunoblotting dilakukan untuk mendeteksi hTERT Pita spesifik hTERT selanjutnya dideteksi dengan menggunakan sistem chemiluminescence³¹.



Gambar 11. Hasil analisis western blot dan northern blot pada sel HT1080.³¹

2. Pemeriksaan panjang telomer

Beberapa metode dapat digunakan untuk mengukur panjang telomer meliputi *telomere restriction fragment (TRF) length analysis* memakai analisis Southern blot, amplifikasi copy gen tunggal berulang telomere dengan quantitative PCR (qPCR) dan *fluorescent in situ hybridization (FISH)* untuk menghitung jumlah copy telomere dalam sel atau kromosom dengan metode flow cytometry (FlowFISH) atau menghitung dalam tahap metaphase sel (Q-FISH).³²

KESIMPULAN

Telomer dan telomerase memiliki peran penting dalam patogenensis dan luaran klinis pasien kanker payudara. Keterkaitan panjang telomer dan aktivitas telomerase dengan kejadian, prognosis dan outcome klinis kanker payudara masih belum sepenuhnya diketahui. Beberapa uji telah dikembangkan untuk memeriksa aktivitas telomerase dan Panjang telomere seperti PCR, Northern Blot, Western Blot, IHK, Flow-FISH dan Q-FISH.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aksan A, Aryandono. Prognostic factors of locally advanced breast cancer patients receiving neoadjuvant and adjuvant chemotherapy. Asian Pac J Cancer Prev. 2010; 11(3):759-61.
2. Brinton LA, Cook MB, McCormack V, et al. Anthropometric and hormonal risk factors for male breast cancer: male breast cancer pooling project results. J Natl Cancer Inst 2014; 106(3):djt465.
3. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2007;14:907-33.
4. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. Science. 2007;315:1850-3.
5. Guyton, Arthur C, John E Hall. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta: ECG. 2014; 2045-56.
6. Kumar. Robbins. Basic Pathology. Elsevier. 2007; 7890-99.
7. Tortora, Gerald J, Brian D. Principle of anatomy and physiology. USA, John Wiley and Sons Inc. 2011. 3456-78
8. Weinberg RA. The Biology of Cancer. Garland Science. New York. 2014; 435-89.
9. Mokbel K, Ghilchik M, Williams G, Akbar N, Parris C, Newbold R. The association between telomerase activity and hormone receptor status and p53 expression in breast cancer. Int J Surg Investig. 2000;1:509-16.
10. Lu L, Zghang C, Zhu G, Irwin M, Risch H, Menato G, et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their association with adjuvant treatment and disease outcome. NCBI. 2011; 67: 5-7.
11. Murillo-Ortiz B, Astudillo-De la Vega H, Castillo-Medina S, Malacara JM, Benitez-

- Bribiesca L. Telomerase activity, estrogen receptors (alpha, beta), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. *BMC Cancer.* 2006;6:206. doi: 10.1186/1471-2407-6-206.
12. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene.* 2002;21:564-79.
13. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:12683-8.
14. Mokbel K, Ghilchik M, Williams G, Akbar N, Parris C, Newbold R. The association between telomerase activity and hormone receptor status and p53 expression in breast cancer. *Int J Surg Investig.* 2000;1:509-16.
15. Weinberg RA. The Biology of Cancer. Garland Science. New York. 2014; 435-89.
16. Svenson U, Nordfjall K, Stegmayr B, Manjer J, Nilsson P, Tavelin B, et al. Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells. *Cancer Res.* 2008;68:2318-23.
17. Wright WE, Shay JW: The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol.* 1992; 27: 383-9.
18. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:407-25.
19. Vinagre J, Almeida A, Popula H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
20. Huang D, Wang Z, Heb XJ, Diplas BH, Yang R, Killela PJ. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumor types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer.* 2015;51:969-76.
21. Heidenreich B, Rachakondan PS, Hemmink K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2014;24:30-7.
22. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE, Shay JW. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) *Methods Cell Sci.* 1995;17:1-15.
23. Liu J, Baykal A, Fung KM, Thompson-Lanza JA, Hoque A, Lippman SM, Sahin A. Human telomerase reverse transcriptase mRNA is highly expressed in normal breast tissues and down-regulated in ductal carcinoma in situ. *Int J Oncol.* 2004;24:879-84.
24. Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 8222-7.
25. Ortiz BM, De La Vega HA, Medina SC, Malacara JM, Bribiesca LB. Telomerase activity, estrogen receptors (α , β), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. *BMC Cancer.* 2006;6:206. doi: 10.1186/1471-2407-6-206.
26. Lu L, Zghang C, Zhu G, Irwin M, Risch H, Menato G, et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their association with adjuvant treatment and disease outcome. *NCBI.* 2011; 67: 5-7.
27. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:177-208
28. Kim NW and Wu F, Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 2595-7.
29. Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome.* 1989;31(2):553-60.
30. Yan P, Benhattar J, Seelentag W, Stehle JC, Bosman FT. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues. *Histochem Cell Biol.* 2004;121:391-7
31. Chromczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
32. Lina J , Smitha DL, Estevesb K, and Drury S, Telomere length measurement by qPCR-Summary of critical factors and recommendations for assay design. *Psychoneuroendocrinol.* 2019; 99: 271-8.