

Pengaruh Estradiol-17 β dan Kolagen Tipe IV Terhadap Ekspresi Gen PIK3CA untuk Menginduksi Ekspresi c-erbB2 pada Lini Sel Kanker Ovarium SKOV-3 (The Effects of Estradiol-17 β and Type IV Collagen on The Gene Expression of PIK3CA to Induce c-erbB2 Expression in SKOV-3 Ovarian Cancer Cells)

Merry Meryam Martgrita¹⁾ & Marselina Irasonia Tan²⁾

¹⁾Fakultas Bioteknologi, Institut Teknologi Del, Toba Samosir, Indonesia;

²⁾Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia.

E-mail: ¹⁾merry.martgrita@del.ac.id, merrymartgrita@gmail.com, ²⁾marsel@sith.itb.ac.id

Memasukkan: Juli 2015, Diterima: September 2015

ABSTRACT

Ovarian cancer cell metastasis is induced by signaling pathway activated by the binding of type IV collagen to β 1 integrin receptor on the surface of cancer cells and estrogen binding to estrogen receptor. However, the role of estradiol-17 β and type IV collagen on the development of ovarian cancer have not been clearly understood. Therefore, this research was conducted to observe the differential gene expression in SKOV-3 ovarian cancer cells cultured on type IV collagen and treated with estradiol-17 β , and incubated for 12, 24 and 72 hours. Differential display RT-PCR was used to express the differential expression gene after treatment. cDNA fragment that expressed differentially was isolated and sequenced. Sequencing result on one of the cDNA fragment showed that PI3K is one of the gene expressed in SKOV-3 ovarian cancer cell. To verify this result, cDNA was amplified using PIK3CA specific primer. The increasing level of PIK3CA is induced by three kinds of receptor activities, those are c-erbB2 receptor bound to estradiol-17 β , homodimer receptor of c-erbB2, and the activity of integrin receptor bound to type IV collagen. The increasing level and activity of PIK3CA can also increase the expression of c-erbB2 gene. In SKOV-3 cells cultured on type IV collagen for 72 hours, the increasing of PIK3CA and c-erbB2 expression level is very low. The conclusion is that estradiol-17 β gives a more significant effect than type IV collagen to induce the increasing expression of PIK3CA and c-erbB2 genes.

Keywords: ovarian cancer, SKOV-3, type IV collagen, estradiol-17 β , PIK3CA, c-erbB2

ABSTRAK

Metastasis pada sel kanker ovarium diinduksi oleh jalur sinyal yang diaktivasi oleh pengikatan kolagen tipe IV dengan reseptor integrin β 1 di permukaan sel kanker dan pengikatan estrogen dengan reseptor estrogen. Namun demikian, peranan estradiol-17 β dan kolagen tipe IV terhadap perkembangan kanker ovarium belum dapat dipahami secara jelas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengamati perbedaan ekspresi gen pada sel kanker ovarium SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV dan mendapat perlakuan estradiol-17 β , kemudian diinkubasi selama 12, 24 dan 72 jam. Metode *differential display RT-PCR* dilakukan untuk mengamati perbedaan ekspresi gen setelah perlakuan. Fragmen cDNA, yang diekspresikan secara berbeda, diisolasi dan disekuens. Hasil sekuensing salah satu fragmen cDNA memperlihatkan bahwa PI3K adalah salah satu gen yang diekspresikan pada sel kanker ovarium SKOV-3. Untuk memverifikasi hasil tersebut, cDNA diamplifikasi menggunakan primer spesifik PIK3CA. Peningkatan level ekspresi PIK3CA diinduksi oleh aktivitas tiga jenis reseptor, yaitu reseptor c-erbB2 yang berikatan dengan estradiol-17 β , reseptor homodimer c-erbB2, dan aktivitas reseptor integrin yang berikatan dengan kolagen tipe IV. Peningkatan level ekspresi dan aktivitas PIK3CA juga dapat meningkatkan ekspresi gen c-erbB2. Dalam sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV selama 72 jam, peningkatan level ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 sangat rendah. Kesimpulannya adalah bahwa estradiol-17 β memberikan pengaruh yang lebih besar dibandingkan dengan kolagen tipe IV dalam menginduksi peningkatan level ekspresi gen PIK3CA dan c-erbB2.

Kata Kunci: kanker ovarium, SKOV-3, kolagen tipe IV, estradiol-17 β , PIK3CA, c-erbB2

PENDAHULUAN

Kanker ovarium berada pada urutan ketiga sebagai penyebab kematian akibat kanker pada wanita di negara-negara Asia Tenggara (WHO 2008). Pada kanker ovarium, estrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen berperan dalam proliferasi sel-sel kanker ovarium. Tetapi pada kanker ovarium yang mengalami over ekspresi

gen c-erbB2, proliferasi sel-sel kanker ovarium tidak dapat diregulasi oleh estrogen (Hua *et al.* 1995).

Overekspresi gen c-erbB2 terjadi pada 25%-30% kanker ovarium. Overekspresi reseptor c-erbB2 (suatu reseptor faktor tumbuh tirosin kinase) berkaitan dengan prognosis yang buruk dari kanker ovarium tingkat lanjut (Hua *et al.* 1995; Slamon *et al.* 1989), karena overekspresi c-erbB2 meningkatkan proliferasi sel, migrasi sel,

metastasis, dan laju kematian (Bernstam & Hung 2006). Reseptor estrogen yang berikatan dengan urutan regulator di bagian promoter gen *c-erbB2* diperkirakan berperan dalam mekanisme penurunan ekspresi. Amplifikasi gen yang berkaitan dengan overekspresi *c-erbB2* melampaui ketersediaan reseptor estrogen, sehingga terdapat banyak jalur mitogenik yang menghasilkan regulasi pertumbuhan yang tidak responsif terhadap estrogen dan antiestrogen, seperti yang terjadi pada sel SKOV-3 (Hua *et al.* 1995). Tetapi kemudian telah diketahui bahwa pada sel kanker payudara MCF-7 yang ditransfeksi dengan gen *c-erbB2*, estrogen dapat berikatan dengan reseptor *c-erbB2*, karena estrogen dapat mengenali domain ekstrasel yang secara signifikan mempunyai homologi 36% dengan domain pengikatan ligan pada reseptor estrogen. Interaksi estrogen dengan reseptor *c-erbB2* menyebabkan terjadinya fosforilasi residu tirosin pada reseptor *c-erbB2* dan mengaktifasi jalur selanjutnya. Reseptor *c-erbB2* yang sudah teraktivasi akan mengaktifkan PIK3CA, yang selanjutnya mengaktifkan Akt (Stoica *et al.* 2003). Dalam kondisi ketersediaan reseptor estrogen rendah dan kemungkinan kecil terjadinya pengikatan estrogen dengan reseptor *c-erbB2*, akan terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi AP-2 untuk meregulasi overekspresi gen *c-erbB2* (Perissi *et al.* 2000).

Aktivitas jalur PIK3CA/Akt2 berperan penting dalam perilaku agresif sel malignan. Ekspresi yang tinggi dan stabil dari Akt2 pada lini sel kanker ovarium, termasuk SKOV-3, meningkatkan kemampuannya untuk menginvasi melalui kolagen tipe IV, komponen matriks ekstrasel utama pada membran basal jaringan dan organ manusia. Akt2 dapat meningkatkan invasi melalui peningkatan ekspresi $\beta 1$ integrin, suatu komponen reseptor yang berikatan dengan kolagen tipe IV. Peningkatan ekspresi $\beta 1$ integrin diketahui berkorelasi dengan peningkatan metastasis pada beberapa jenis kanker. Protein Akt juga dapat meregulasi sintesis kolagen tipe IV, menunjukkan bahwa suatu mekanisme autokrin dipengaruhi dalam invasi sel yang diinduksi oleh Akt (Arboleda *et al.* 2003). Sinyaling integrin menyebabkan terjadinya migrasi sel dengan menginduksi perubahan pengaturan sitoskeleton dan dengan meningkatkan kontraktibilitas seluler. Aktivasi FAK (focal adhesion kinase) berperan

penting pada jalur sinyaling integrin yang berbeda yang mempengaruhi terjadinya migrasi. FAK adalah tirosin kinase non-reseptor yang secara langsung atau tidak langsung berhubungan dengan kontak permukaan integrin. Pengikatan ligan pada integrin menyebabkan terjadinya fosforilasi FAK, yang selanjutnya mengaktifasi beberapa jalur sinyaling sel utama, khususnya jalur MAPK (mitogen-activated protein kinase) dan PIK3CA. Aktivitas jalur PIK3CA dan MAPK akan mengaktifasi faktor transkripsi AP-2, yang selanjutnya akan meningkatkan overekspresi gen *c-erbB2* (Brakebusch *et al.* 2002; Stupack & Cheresch 2002; Remaley 2007; Guccione 2002).

Untuk mengetahui pengaruh estradiol-17 β dan kolagen tipe IV terhadap ekspresi gen *c-erbB2* dan PIK3CA pada lini sel kanker ovarium SKOV-3 yang mengalami overekspresi *c-erbB2*, kami melakukan penelitian terhadap ekspresi gen *c-erbB2* dan PIK3CA pada tingkat RNA, setelah sel SKOV-3 diberi perlakuan dengan estradiol-17 β dan kolagen tipe IV.

BAHAN DAN CARA KERJA

Lini sel SKOV-3 dikultur dalam medium DMEM/F-12 (Gibco) yang mengandung 10% FBS (Gibco), 10 U/ml penisilin G dan 10 μ g/ml streptomisin (Sigma-Aldrich), dalam inkubator 5% CO₂. Setelah konfluen, sel dipasasi dengan 0,02% EDTA dan 0,25% tripsin dalam PBS. Untuk kultur *monolayer*, lini sel dikultur dalam botol kultur jaringan Nunclon. Setelah 70-80% konfluen, lini sel disiapkan untuk perlakuan. Perlakuan dibagi menjadi empat (4) kelompok. Dalam kelompok pertama (P), sel ditumbuhkan dalam Nunclon polistiren *six-well plate*. Dalam kelompok kedua (E), sel ditumbuhkan dalam Nunclon polistiren *six-well plate* dan diberi perlakuan dengan 10⁻⁶ M estradiol-17 β . Dalam kelompok ketiga (K), sel ditumbuhkan dalam Nunclon polistiren *six-well plate* yang sebelumnya telah dilapisi dengan kolagen tipe IV (40 μ l/sumur, 0,5 μ g/ μ l kolagen tipe IV dalam 0,5M asam asetat; Sigma-Aldrich). Dan dalam kelompok keempat (KE), sel ditumbuhkan dalam Nunclon polistiren *six-well plate* yang sebelumnya telah dilapisi dengan kolagen tipe IV dan kemudian diberi perlakuan

dengan 10^{-6} M estradiol-17 β . Dalam setiap sumur ditanam 5×10^5 sel, dan ditumbuhkan *overnight* dalam medium DMEM/F-12 yang mengandung 5% FBS. Pagi berikutnya (ditentukan sebagai 0 jam), medium dalam setiap sumur diganti dengan 1998 μ l *serum-free defined medium* (SFDM; 20 μ g/ml insulin, 20 μ g/ml transferin, 10 ng/ml selenit, 5 μ g/ml hidrokortison, 16,11 μ g/ml putrescin, dan DMEM/F-12), ke dalam kelompok pertama dan ketiga ditambahkan 2 μ l etanol absolut (pelarut estradiol-17 β), dan ke dalam kelompok kedua dan ketiga ditambahkan 2 μ l 10^{-3} M estradiol-17 β . Penggantian SFDM dan 10^{-3} M estradiol-17 β dilakukan setiap 24 jam, dan perlakuan diakhiri pada 72 jam.

RNA total diisolasi dari sel kultur menggunakan High Pure RNA Isolation Kit (Roche). RNA total yang diisolasi adalah dari kultur 12 jam, 24 jam dan 72 jam setelah perlakuan. Integritas RNA dikonfirmasi dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan pewarnaan dengan etidium bromida. Konsentrasi RNA total diukur menggunakan spektrofotometer pada $A_{260/280}$. DNA komplementer (cDNA) disintesis dari 1 μ g RNA total menggunakan enzim *reverse transcriptase* (RT) pada 37°C selama 1 jam menggunakan Reverse Transcriptase M-MuLV (Roche). cDNA digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi PCR. PCR dilakukan sebanyak 40 siklus, dengan tahap denaturasi selama 1 menit pada 94°C, tahap penempelan primer selama 1 menit pada 34,5°C, tahap pemanjangan selama 2 menit pada 72°C, dan tahap pemanjangan akhir selama 5 menit pada 72°C. Lima 10-mer *random primer* yang digunakan dalam penelitian ini adalah A15: 5'-ATCCGAACCC-3'; A16: 5'-AGCCAGCGAA-3'; A17: 5'-GACCGCTTGT-3'; A18: 5'-AGCTGACCGT-3'; dan A19: 5'-CAAACGTCGG-3'. Reaksi PCR sebanyak 25 μ l mengandung 1,5X PCR buffer, 0,2 mM untuk setiap dNTP, 0,5 μ M *random primer*, 0,6% cDNA, dan 0,25 unit *Taq polymerase* (Roche). Lima mikroliter produk PCR didenaturasi pada 92°C selama 3 menit, dicampur dengan 5 μ l *loading buffer* (10 mM NaOH, 95% Formamide, 0,05% Bromophenol Blue, 0,05% Xylene Cyanol), dielektroforesis menggunakan gel TBE-urea 7% selama 3 jam, dan divisualisasi menggunakan pewarnaan perak (Benbouza *et al.* 2006). Setiap larik cDNA yang diekspresikan secara berbeda di

antara kelompok-kelompok perlakuan diisolasi menggunakan prosedur berikut. Larik cDNA dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung PCR. Sepotong gel cDNA yang ditambahkan 5 μ l air *deionized* dapat langsung digunakan sebagai *template*. Reaksi PCR sebanyak 20 μ l mengandung 1X PCR buffer, 0,2 mM untuk setiap dNTP, 3 μ M *random primer*, 0,3 unit *Taq polymerase*/ μ l volume PCR. Campuran didenaturasi pada 95°C selama paling sedikit 5 menit sebelum amplifikasi PCR. PCR dilakukan sebanyak 40 siklus selama 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 34,5°C, 2 menit pada 72°C, dan pemanjangan akhir selama 5 menit pada 72°C. Lima mikroliter produk PCR didenaturasi pada 92°C selama 3 menit, dicampur dengan 5 μ l *loading buffer*, dielektroforesis menggunakan gel TBE-urea 7% selama 1,5 jam, dan divisualisasi menggunakan pewarnaan perak. Larik tunggal yang diperoleh dari produk PCR dipurifikasi dan dikirim ke Macrogen Inc. (Korea) untuk dilakukan *direct sequencing*. Setelah diverifikasi menggunakan program Blast di NCBI, salah satu sekuens sesuai dengan gen PI3K manusia.

Primer didesain untuk mengamplifikasi mRNA PIK3CA berdasarkan sekuens PI3K manusia di NCBI. *Forward primer* PIK3CA adalah 5'-CTTTGTGCAACCTACGTG-3' (18-mer) dan *reverse primer* PIK3CA adalah 5'-GTCCAGAAGTCCATAGCC-3' (19-mer), yang akan menghasilkan cDNA teramplifikasi sebanyak sekitar 800 bp. Kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) digunakan untuk amplifikasi cDNA. *Realtime* PCR dilakukan menggunakan kondisi berikut: Tahap I adalah 1 siklus pra inkubasi selama 10 menit pada 95°C; Tahap II adalah 35 siklus amplifikasi, yaitu denaturasi selama 10 detik pada 95°C, penempelan primer selama 7 detik pada 46°C, pemanjangan selama 32 detik pada 72°C (*single mode*); Tahap III adalah 1 siklus *melting curve*, yaitu denaturasi selama 0 detik pada 95°C, penempelan primer selama 15 detik pada 41°C, pemanjangan selama 0 detik pada 95°C (*slope* = 0,1°C/detik; *continuous mode*); dan Tahap IV adalah 1 siklus pendinginan selama 30 detik pada 40°C. Reaksi PCR sebanyak 20 μ l mengandung 2 μ l 10x LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, 6,4 μ l H₂O PCR grade, 1,6 μ l MgCl₂ stock

solution, 4 μ l untuk setiap *forward* dan *reverse* PI3CA primer (2,5 μ M), dan 2 μ l cDNA. Amplifikasi cDNA untuk gen c-erbB2 menggunakan primer berikut, *forward primer* 5'-GGCCCTCAT CCACCATAACACC-3' (22-mer) dan *reverse primer* 5'-AGACCACCCCAAGACCACGACC AG-3' (25-mer), yang akan menghasilkan cDNA sebanyak sekitar 600 bp. *Realtime* PCR dilakukan menggunakan kondisi berikut: Tahap I adalah 1 siklus prainkubasi selama 10 menit selama 95°C; Tahap II adalah 35 siklus amplifikasi, yaitu denaturasi selama 10 detik pada 95°C, penempelan primer selama 7 detik pada 62°C, pemanjangan selama 24 detik pada 72°C (*single mode*); Tahap III adalah 1 siklus *melting curve*, yaitu denaturasi selama 0 detik pada 95°C, penempelan primer selama 15 detik pada 57°C, pemanjangan selama 0 detik pada 95°C (*slope* = 0,1°C/detik; *continuous mode*); dan Tahap IV adalah 1 siklus pendinginan selama 30 detik pada 40°C. Volume setiap komponen campuran PCR sama seperti untuk reaksi PI3K. Amplifikasi cDNA juga dilakukan untuk glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (GAPDH), sebagai *housekeeping gene*. *Forward primer* adalah 5'-GGTCATCATCTCT GCCC CCTCTGC-3' (24-mer) dan *reverse primer* adalah 5'-CGACGCCTGCTTCACCAC CTTCTT-3' (24-mer) yang akan menghasilkan cDNA sebanyak sekitar 500 bp. *Realtime* PCR dilakukan menggunakan kondisi berikut: Tahap I adalah 1 siklus prainkubasi selama 10 menit pada 95°C; Tahap II adalah 35 siklus amplifikasi, yaitu denaturasi selama 10 detik pada 95°C, penempelan primer selama 7 detik pada 70°C, pemanjangan selama 20 detik pada 72°C (*single mode*); Tahap III adalah 1 siklus *melting curve*, yaitu denaturasi selama 0 detik pada 95°C, penempelan primer selama 15 detik pada 65°C, pemanjangan selama 0 detik pada 95°C (*slope* = 0,1°C/detik; *continuous mode*); dan Tahap IV adalah 1 siklus pendinginan selama 30 detik pada 40°C. Volume setiap komponen campuran PCR sama seperti untuk reaksi PI3K. Sepuluh mikroliter produk PCR dicampur dengan 2 μ l *loading buffer*, dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1%, divisualisasi dengan pewarnaan etidium bromida, dan ukuran serta konsentrasi cDNA teramplifikasi diestimasi dengan membandingkannya dengan DNA *molecular weight marker* (Promega). Gel divisualisasi menggunakan lampu

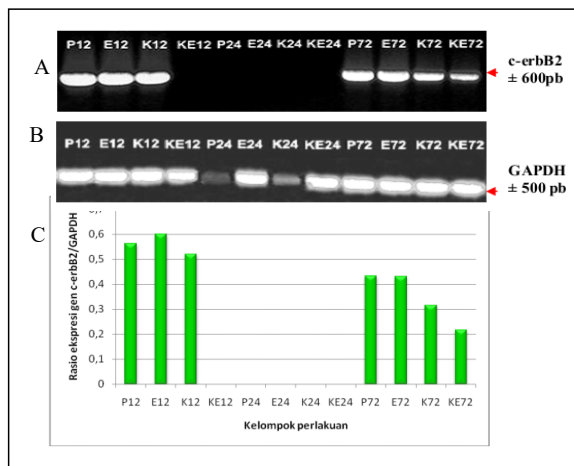
UV dan difoto. Foto gel dianalisis dengan melakukan pengukuran ketebalan setiap larik menggunakan program Scion Image, dan ratio ketebalan larik c-erbB2 dan PI3K ditentukan dengan membandingkannya dengan ketebalan larik GAPDH.

HASIL

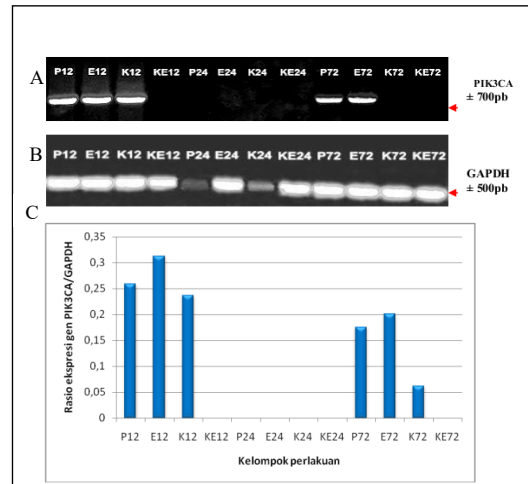
Ekspresi gen c-erbB2 pada sel kanker ovarium SKOV-3

RNA c-erbB2 diekspresikan pada sel SKOV-3 kelompok P, E, dan K yang diinkubasi selama 12 jam, dan pada semua kelompok perlakuan yang diinkubasi selama 72 jam (Gambar 1). Pada sel kanker ovarium SKOV-3 yang dikultur di polistiren *six-well plate* dan diinkubasi selama 12 jam (P12), gen c-erbB2 diekspresikan sangat tinggi (Gambar 1). Pada sel SKOV-3 yang diberi perlakuan dengan estradiol-17 β (E12), ekspresi c-erbB2 lebih tinggi dibandingkan dengan P12, dan pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV (K12), ekspresi c-erbB2 lebih rendah dibandingkan dengan P12 dan E12. Hasil ini menunjukkan bahwa estradiol-17 β dapat menginduksi peningkatan ekspresi c-erbB2, sedangkan sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV tidak dapat meningkatkan ekspresi c-erbB2.

Kecenderungan yang serupa tampak pada sel SKOV-3 yang diinkubasi selama 72 jam. Pada sel SKOV-3 yang dikultur di polistiren *six-well plate* (P72) dan pada sel SKOV-3 yang diberi perlakuan dengan estradiol-17 β (E72), ekspresi c-erbB2 lebih rendah dibandingkan dengan yang diekspresikan pada sel SKOV-3 yang diinkubasi selama 12 jam. Namun ekspresi c-erbB2 dalam kelompok ini lebih tinggi daripada pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV dan diinkubasi selama 72 jam (K72). Ekspresi c-erbB2 pada sel yang dikultur di atas kolagen tipe IV tidak setinggi ekspresi c-erbB2 pada sel yang diberi perlakuan dengan estradiol-17 β . Pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV dan diberi perlakuan dengan estradiol-17 β (KE72), ekspresi c-erbB2 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Dari hasil ini, tampak bahwa pengaruh kolagen tipe IV terhadap peningkatan ekspresi c-erbB2 tidak setinggi pengaruh pengaruh



Gambar 1. Elektroferogram hasil realtime PCR sampel cDNA menggunakan primer c-erbB2 (A) dan primer GAPDH (B), dan rasio ekspresi gen c-erbB2 dibandingkan dengan GAPDH sebagai kontrol internal pada sel SKOV-3 (C).



Gambar 2. Elektroferogram hasil PCR sampel cDNA menggunakan primer PIK3CA (A) dan primer GAPDH (B), dan rasio ekspresi gen PIK3CA, dibandingkan dengan GAPDH sebagai kontrol internal pada sel SKOV-3 (C).

estradiol-17 β , dan penambahan estradiol-17 β pada kelompok KE72 tidak cukup untuk meningkatkan ekspresi c-erbB2.

Ekspresi gen PIK3CA pada sel kanker ovarium SKOV-3

RNA PIK3CA (Gambar 2) diekspresikan pada sel SKOV-3 kelompok P, E, dan K yang diinkubasi selama 12 jam dan pada kelompok P dan E yang dikultur selama 72 jam. Pada sel SKOV-3 yang diberi perlakuan dengan estradiol-17 β dan diinkubasi selama 12 jam (E12), ekspresi PIK3CA lebih tinggi dibandingkan dengan pada kelompok P12, sedangkan pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV (K12) peningkatan ekspresi PIK3CA lebih rendah dari pada di kelompok P12 dan E12. Kecenderungan yang serupa terjadi pada sel SKOV-3 yang dikultur selama 72 jam. Pada sel SKOV-3 yang diberi perlakuan dengan estradiol-17 β (E72), ekspresi PIK3CA lebih tinggi dibandingkan pada kelompok P72, sedangkan pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV (K72), ekspresi PIK3CA sangat rendah. Berdasarkan hasil ini, perlakuan estradiol-17 β terhadap sel SKOV-3 meningkatkan ekspresi c-erbB2 dan PIK3CA lebih tinggi dibandingkan ekspresi c-erbB2 dan PIK3CA pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV.

PEMBAHASAN

Ekspresi yang tinggi dari c-erbB2 dari sel SKOV-3 dalam kelompok P12, E12, dan K12 cukup dapat meningkatkan ekspresi PIK3CA. Peningkatan ekspresi PIK3CA disebabkan oleh aktivitas reseptor c-erbB2 yang berikatan dengan estradiol-17 β dan aktivitas homodimer reseptor c-erbB2. Selain itu, peningkatan PIK3CA juga diinduksi oleh aktivitas reseptor integrin yang berikatan dengan kolagen tipe IV. Ekspresi PIK3CA yang tinggi pada kelompok P12 sel SKOV-3 disebabkan aktivitas reseptor homodimer c-erbB2. Kemungkinan terbentuknya homodimer reseptor c-erbB2 lebih tinggi dibandingkan dengan pembentukan heterodimer dengan EGFR, c-erbB3 atau c-erbB4. Pembentukan heterodimer memerlukan pengikatan dengan ligan, seperti pengikatan EGF pada EGFR, atau pengikatan Heregulin pada c-erbB3 atau c-erbB4. Selama perlakuan, sel dikultur dalam *serum-free defined medium*, sehingga tidak terdapat penambahan faktor tumbuh selama perlakuan (Wang *et al.* 1999; Stern 2000; Olayioye 2001).

Setelah 12 jam inkubasi, estradiol-17 β juga meningkatkan ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 pada sel SKOV-3. Estradiol-17 β mengenali domain ekstrasel dari reseptor c-erbB2 receptor yang memiliki sekitar 36% homologi dengan domain pengikatan ligan reseptor estrogen (Stoica *et al.*

2003). Terdapat kemungkinan terjadi kompetisi antara estradiol-17 β yang berikatan dengan reseptor c-erbB2 dan pembentukan homodimer reseptor c-erbB2. Belum diketahui apakah jalur PIK3CA lebih dipengaruhi oleh aktivitas reseptor c-erbB2 yang berikatan dengan estradiol-17 β , atau oleh homodimer reseptor c-erbB2 yang teraktivasi secara spontan karena terdapat mutasi pada domain transmembrannya (Wang *et al.* 1999). Peningkatan ekspresi dan aktivitas PIK3CA juga dapat meningkatkan ekspresi gen c-erbB2, karena PIK3CA akan mengaktivasi faktor transkripsi AP-2 (Remaley 2007), dan kemudian aktivitas AP-2 akan meningkatkan ekspresi gen c-erbB2. Oleh karena itu, peningkatan ekspresi PIK3CA dipengaruhi oleh dua aktivitas reseptor yang berbeda, yaitu reseptor c-erbB2 yang berikatan dengan estradiol-17 β , dan homodimer reseptor c-erbB2.

Pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV selama 12 jam (K12), ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 lebih rendah dibandingkan dengan ekspresinya pada kelompok P12 dan E12. Hal ini mengindikasikan bahwa ekspresi PIK3CA hanya diinduksi oleh satu jalur sinyaling, melalui aktivitas reseptor integrin di permukaan membrane sel yang berikatan dengan kolagen tipe IV. Pengikatan kolagen tipe IV dan protein reseptor β 1 integrin akan mengaktivasi jalur sinyaling di dalam sel. Sebaiknya, jalur sinyaling yang teraktivasi tersebut akan meningkatkan afinitas pengikatan kolagen tipe IV pada protein reseptor β 1 integrin, hal ini menyebabkan terjadinya penguatan aktivitas jalur sinyaling di dalam sel. Peningkatan aktivitas jalur PIK3CA di dalam sel terjadi bersamaan dengan peningkatan ekspresi protein reseptor c-erbB2. Aktivitas jalur PIK3CA, yang dimulai ketika kolagen tipe IV berikatan dengan protein reseptor β 1 integrin, akan menyebabkan sel-sel kanker ovarium meningkatkan sintesis kolagen tipe IV dan meningkatkan ekspresi protein reseptor β 1 integrin (Arbodela *et al.* 2003).

Pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV, juga terdapat aktivitas reseptor homodimer c-erbB2 untuk meningkatkan ekspresi PIK3CA. Bila aktivitas reseptor homodimer c-erbB2 terjadi, maka aktivitasnya tidak cukup kuat untuk meningkatkan ekspresi PIK3CA. Tampaknya aktivitas reseptor homodimer c-erbB2 untuk

meningkatkan ekspresi PIK3CA sangat rendah dibandingkan dengan aktivitas reseptor c-erbB2 yang mengikat estradiol-17 β . Pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV dan diberi perlakuan dengan estradiol-17 β (KE12), peningkatan ekspresi PIK3CA masih tidak terdeteksi. Kemungkinan hal ini disebabkan terjadinya komunikasi antara jalur sinyaling yang diaktivasi oleh reseptor integrin dan jalur sinyaling yang diaktivasi oleh reseptor c-erbB2 yang saling menekan aktivitas masing-masing.

Setelah inkubasi selama 72 jam, sel SKOV-3 pada kelompok P72 dan E72 tetap memperlihatkan tingkat ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 yang serupa dengan ketika sel diinkubasi selama 12 jam. Dan pada sel SKOV-3 yang diberi perlakuan estradiol-17 β (E72), tingkat ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 tetap lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang dikultur di atas polistiren (P72). Tampak bahwa setelah inkubasi 72 jam, estradiol-17 β tetap mempunyai peranan untuk meningkatkan ekspresi PIK3CA dan c-erbB2.

Pada sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV selama 72 jam (K72), peningkatan tingkat ekspresi PIK3CA dan c-erbB2 sangat rendah dibandingkan dengan kelompok K12. Walaupun masih memerlukan penelitian lebih lanjut, terdapat kemungkinan bahwa ketika memasuki waktu inkubasi 72 jam mulai terjadi degradasi kolagen tipe IV oleh enzim metalloproteinase. Degradasi tidak bisa dicegah, karena selama percobaan tidak dilakukan penggantian lapisan kolagen tipe IV. Kolagen tipe IV dapat didegradasi oleh MMP-2 dan MMP-9 pada kanker ovarium. Aktivitas MMP-2 dan MMP-9 yang tinggi pada kanker ovarium diregulasi oleh dua mekanisme. Aktivitas MMP-2 akan meningkat pada kanker ovarium karena penurunan relatif ekspresi TIMP-2 dibandingkan dengan MMP-2. Sedangkan peningkatan aktivitas MMP-9 disebabkan oleh peningkatan ekspresi MMP-9 sendiri (Okamoto *et al.* 2003). Perlakuan estradiol-17 β terhadap sel SKOV-3 yang dikultur di atas kolagen tipe IV dan diinkubasi selama 72 jam (KE72) tidak memperlihatkan peningkatan ekspresi PIK3CA, walaupun masih memperlihatkan ekspresi c-erbB2 yang lebih rendah dibandingkan ekspresi c-erbB2 pada kelompok P72, E72 dan K72.

DAFTAR PUSTAKA

- Arboleda, MJ., JF. Lyons, FF. Kabbinavar, MR. Bray, BE. Snow, R. Ayala, M. Danino, BY. Karlan & DJ. Slamon. 2003. Overexpression of Akt2/protein kinase Bb leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Reserach*. 63: 196-206.
- Benbouza, H., JM. Jacquemin, JP. Baudoin, & G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 10: 77-81.
- Bernstam, FM. & MC. Hung. 2006. Advances is targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clinical Cancer Reserach*. 12: 6326-6330.
- Brakebusch, C., D. Bouvard, F. Stanchi, T. Sakai & R. Fässler. 2002. Integrins in invasive growth. *Journal of Clinical Investigation*. 109: 999-1006.
- Guccione, M., S. Silbiger, J. Lei, & J. Neugarten. 2002. Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 282: F164-F169.
- Hua, W., T. Christianson, C. Rougeot, H. Rochefort & GM. Clinton. 1995. SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *Journal Steroid Biochemical and Molecular Biology*. 55: 279-289.
- Okamoto, T., R. Niu & S. Yamada. 2003. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in clear cell carcinoma of the ovary. *Molecular Human Reproduction*. 9: 569-575.
- Olayioye, MA. 2001. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research*. 3: 385-389.
- Perissi, V., N. Menini, E. Cottone, D. Capello, M. Sacco, F. Montaldo & M. De Bortoli. 2000. AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene*. 19: 280-288.
- Remaley, AT. 2007. Old drug, new tricks: the unexpected effect of doxazosin on high-density lipoprotein. *Circulation Research*. 101: 116-118.
- Slamon, DJ., W. Godolphin, LA. Jones, JA. Holt, SG. Wong, DE. Keith, WJ. Levin, SG. Stuart, J. Udove, A. Ulrich & MF. Press. 1989. Studies of the HER-2/*neu* Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science*. 244: 707-712.
- Stern, DF. 2000. Tyrosine kinase signaling in breast cancer ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Research*. 2: 176-183.
- Stoica, GE., TF. Franke, A. Wellstein, F. Czubayko, HJ. List, R. Reiter, E. Morgan, MB. Martin & A. Stoica. 2003. Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Molecular Endocrinology*. 17: 818-830.
- Stupack, DG. & DA. Cheresh. 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science*. 115: 3729-3738.
- Wang, Z., L. Zhang, TK. Yeung & X. Chen. 1999. Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-erbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1621-1636.
- WHO. 2008. *World Cancer Report 2008*. P. Boyle & B. Levin (Eds.). International Agency for Research in Cancer. Lyon.