

ISOLASI dan AMPLIFIKASI GEN PENYANDI DOMAIN C-TERMINUS *Latent Membrane Protein (Imp-1) Epstein-Barr Virus (EBV) DARI PENDERITA KARSINOMA NASOFARING (KNF)*

Aris Haryanto¹, Sofia Mubarika²

Abstrak

Domain C terminus Protein LMP-1 mempunyai peranan yang sangat penting dalam mentransformasi limfosit B melalui aktivasi NFkB yang merupakan protein faktor transkripsi pada sel. Protein ini diekspresikan dari gen *Imp-1* pada genom episom *Epstein-Barr Virus (EBV)* selama infeksi laten. Pada sekuen gen penyandi C terminus LMP-1 ditemukan adanya varian gen berupa delesi nukleotida yang menyebabkan perubahan urutan asam aminonya. Variasi ini berpengaruh pada aktivitas biologis EBV dalam mentransformasi limfosit B. Karakterisasi gen *Imp-1* EBV dari penderita karsinoma nasofaring (KNF) di Indonesia khususnya di Daerah Istimewa Yogyakarta belum pernah dilakukan. Studi untuk menganalisis sekuen gen penyandi C terminus *Imp-1* masih diperlukan agar dapat memberi informasi mengenai patogenesis molekuler EBV dan manifestasi klinis yang ditimbulkan. Bahan penelitian yang digunakan adalah darah tepi penderita KNF dari RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta. Darah penderita KNF dibuat *lymphoblastoid cell line (LCL)*. Dilakukan isolasi DNA dari LCL yang sudah tumbuh imortal, selanjutnya DNA hasil isolasi digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi dengan *polymerase chain reaction (PCR)* menggunakan sepasang primer untuk mendapat sekuen spesifik. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 2% yang ditambah dengan etidium bromida untuk dianalisis secara deskriptif. Dari hasil amplifikasi dan sekuensing DNA didapatkan 1 fragmen DNA spesifik sebesar 421 pasangan basa nukleotida pada sampel kontrol positif (sel *line WIL*). Pada sampel pasien KNF lokal ditemukan variasi gen *Imp-1* pada sejumlah pasangan basa nukleotida.

Kata kunci : *latent membrane protein I (Imp-1)*, karsinoma nasofaring (KNF), *Epstein-Barr virus (EBV)*, *lymphoblastoid cell line (LCL)*, *polymerase chain reaction (PCR)*

1. Bagian Biokimia, FKH-UGM
2. Laboratorium Rekayasa Genetik, PAU Bioteknologi-UGM.

ISOLATION AND AMPLIFICATION GENE ENCODES FOR
C-TERMINUS DOMAIN of Latent Membrane Protein (*Imp-1*) of Epstein-Barr Virus (EBV) IN
Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) PATIENTS

Aris Haryanto, Sofia Mubarika

Abstract

Domain of C terminus LMP-1 protein plays an important role in transforming B cell through NFkB activation as transcription factor in cell. LMP-1 protein was expressed by *Imp-1* gene in Epstein-Barr Virus (EBV) episome during latency infection. There were genes which encoded protein domain. These variants can be deletion or insertion both in nucleotide and amino acid sequences. Deletion in C terminus greatly decrease or completely abolish the ability of LMP-1 to transform B cells. In B cell, the natural host for EBV, C terminus deletion variants have been reported. Study to analyze gene variants in C terminus *Imp-1* from Yogyakarta nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients have not been done yet, furthermore NPC incidence in Indonesia especially in Yogyakarta tends to increase. It is important to analyze gene variants sequence in region C terminus of *Imp-1* gene to study both molecular pathogenesis and clinical symptoms of EBV associated NPC. Nasopharyngeal carcinoma patients' peripheral blood were collected from Dr. Sardjito Hospital in Yogyakarta. Lymphocytes were separated from fresh blood and transformed to lymphoblastoid cell lines (LCL). The DNA was isolated from LCL which were established after 50 generations. DNA was used as template for gen amplification using polymerase chain reaction (PCR) method. The PCR products were run in 2% gel agarose by electroforesis then they were analyzed descriptively. PCR products indicated that there was 1 band of specific fragment with 421 base pairs nucleotides in positif control (WIL cell line) Local NPC patients indicated that there were gene variants in their nucleotides.

Key words: latent membrane protein 1 (*Imp-1*), nasopharyngeal carcinoma (NPC), Epstein-Barr virus (EBV), lymphoblastoid cell line (LCL), polymerase chain reaction (PCR)

Pendahuluan

Epstein-Barr virus (EBV) adalah herpesvirus limfotropik yang dapat menginfeksi dan bereplikasi dalam sel epitel dan limfosit B. Keberadaan virus ini selalu dikaitkan dengan berbagai penyakit malignan seperti *Hodgkin's disease*, *Burkitt's lymphoma*, limfoma sel T dan karsinoma nasofaring (KNF) di berbagai daerah di dunia (Epstein & Achong, 1986). Insiden KNF di Indonesia khususnya di Yogyakarta menunjukkan kecenderungan terus meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan data di bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada tercatat bahwa pada tahun 1995 ditemukan sebanyak 103 kasus dan meningkat menjadi 122 kasus pada tahun 1996. Pada tahun 1997 seiring dengan krisis moneter tercatat mengalami penurunan menjadi 91 kasus namun mengalami kenaikan kembali pada tahun 1998 menjadi 131 kasus.

Menurut Old dkk. (1966) keberadaan EBV pada penderita KNF dapat diketahui dari ditemukannya DNA EBV dalam spesimen biopsi jaringan penderita KNF. Virus ini dapat pula menyebabkan pertumbuhan *immortal* limfosit B pada penderita KNF. Pengujian secara serologis menunjukkan hasil positif pada *early antigen* (EA) dan *viral capsid antigen* (VCA) dalam serum penderita KNF.

Genom EBV merupakan DNA linier yang tertutup oleh protein kapsid berbentuk ikosahedral dikelilingi oleh amplop lipid yang mempunyai tonjolan glikoprotein. Genom virus terdiri dari daerah perulangan dan sekuen unik yang panjang serta daerah terminal. Genom virus menyandi lebih dari 100 protein namun pada infeksi laten hanya beberapa gen esensial saja yang mengekspresikan protein, diantaranya adalah LMP-1.

Protein LMP-1 merupakan salah satu protein esensial yang diekspresikan oleh EBV pada infeksi laten limfosit B. Protein ini disandi oleh gen *Imp-1* yang berasal dari episom virus. Struktur LMP-1 adalah protein transmembrane multipel yang terdapat dalam membran plasma. Protein LMP-1 mempunyai N terminus hidrofilik pendek yang terdiri dari kurang lebih 25 asam amino. N terminus berlanjut sebagai enam domain α heliks transmembran hidrofobik yang tersusun dari 20 asam amino yang masing-masing dipisahkan dengan *reverse turn loop* yang terdiri dari 8 sampai 10 asam amino, sehingga pangkal dari molekul protein LMP-1 merupakan domain C

terminus yang terdiri dari 200 asam amino. Domain C terminus sangat kaya akan residu asam amino asam dan beberapa sisi difosforilasi (Moorthy dan Thorley-Lawson, 1993). Protein LMP-1 terdistribusi dalam membran plasma dan berkaitan dengan sitoskeleton vimentin limfosit B. Waktu paruh LMP-1 cukup pendek, yaitu 2 sampai 5 jam dan protein akan mengalami proteolisis pada daerah pengaktif reseptor di ujung C terminus (CTAR-2) (Baichwal & Sugden, 1987; Mann & Thorley-Lawson, 1987; Martin & Sugden, 1991; Liebowitz dkk., 1987).

Protein LMP-1 mempunyai beberapa peranan penting, yaitu menginduksi imortalisasi limfosit B pada manusia, mentransformasikan sel dan menginduksi up-regulasi beberapa marker yang mengaktifasi limfosit B. Meskipun mempunyai peran yang sangat penting dalam menginfeksi limfosit, fungsi LMP-1 secara biokimiawi masih belum jelas. Peng-Pilon dkk. (1995) menyatakan bahwa bukan domain N terminus yang berperan dalam mengaktifasi limfosit B namun domain C terminus sitoplasmik dari protein LMP-1 yang berperan penting dalam mengaktifasi limfosit. Kemampuan dalam mengaktifasi limfosit B dipengaruhi juga oleh adanya variasi gen penyandi C terminus LMP-1. Delesi nukleotida pada C terminus gen *Imp-1* menyebabkan penurunan bahkan menghentikan kemampuan untuk mentransformasi fibroblas Rat-1 (Moorthy dan Thorley-Lawson, 1993).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengamplifikasi gen penyandi domain C terminus *Imp-1* pada EBV dari penderita KNF dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), sehingga didapatkan satu fragmen spesifik yang menyandi gen tersebut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keberadaan episom EBV pada sampel darah pasien KNF, sehingga dapat dipelajari keterkaitan antara infeksi EBV dengan insidensi KNF di Indonesia khususnya di Yogyakarta dan dapat mempelajari patogenisitas molekuler EBV dalam menginduksi terjadinya kanker karsinoma nasofaring.

Materi dan Metode

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah darah perifer penderita KNF dari RSUP. Dr. Sardjito Yogyakarta, *lymphoblastoid cell line* penderita KNF lokal dan sel *line* WIL dari *Queensland Institute of Medical Research* (QIMR), yang sudah tumbuh imortal secara *in*

vitro, primer spesifik untuk mengamplifikasi C terminus gen *Imp-1* dari *Bresatec*, Swedia.

Prosedur penelitian meliputi beberapa tahap kegiatan. Mula-mula dilakukan pembuatan LCL sebagai sumber untuk isolasi DNA dari pasien KNF tipe *undifferentiated carcinoma* (tipe 3) dikoleksi dalam tabung venoject berheparin. Limfosit diisolasi dari komponen darah yang lain dengan *ficcol-histopaque 1077* (*Sigma*).

Limfosit dikultivasi pada 96 *microwell plate* dengan konsentrasi tiap-tiap sumuran 10^6 sel/ml didalam medium yang mengandung 10% FBS + RPMI + Penstrep (*Gibco BRL*) + FK 506 (*Gibco BRL*). Limfosit B dipelihara dalam inkubator CO₂ dengan medium diganti sampai limfosit menjadi imortal. Setelah kurang lebih 50 kali generasi limfosit dan mengalami immortalisasi menjadi LCL maka dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA dilakukan dari LCL yang sudah imortal, dengan cara diresuspensi dengan 1 volume bufer digesti dan ditambah proteinase K (*Boehringer Mannheim*) kemudian diinkubasi dalam inkubator shaking pada suhu 50°C selama 12-18 jam. Sel LCL diekstraksi dengan *Phenol/CIAA* (*Merck*) dengan volume yang sama kemudian disentrifus pada kecepatan 1700 g selama 10 menit. Supernatan bagian atas dipindah dalam tabung Eppendorf yang baru dengan ditambah ½ volume ammonium asetat (*Merck*) dan 2 volume etanol absolut (*Merck*) sehingga membentuk presipitat DNA, selanjutnya disentrifus kembali pada kecepatan 1700 x g selama 2 menit. Supernatan dibuang kemudian pelet DNA yang diperoleh dicuci dengan etanol 70% kemudian dikeringkan. Setelah kering presipitat DNA dilarutkan dalam Tris-EDTA (*Merck*) dengan digoyang pada suhu kamar kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan. Kandungan DNA hasil isolasi dapat ditentukan dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose 0,8% (*Gibco*).

Hasil isolasi DNA dari LCL penderita KNF digunakan sebagai *template* untuk diamplifikasi menggunakan PCR. Primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi fragmen DNA virus domain C terminus gen *Imp-1*. Primer yang digunakan merupakan produk dari *Bresatec*, Swedia dengan urutan sebagai berikut:

<i>sense</i> :	5'-CTG CTC
TCA AAA CCT AGG CG-3'	
<i>antisense</i> :	5'-TAG CTT
AGC TGA ACT GGG C-3'	

Campuran enzim taq polimerase yang digunakan dilarutkan dalam 9,5 ml akuabides, 10 X bufer + BSA (*Promega*) sebanyak 0,5 µl dan enzim taq polimerase 5 unit sebanyak 0,9 µl, sehingga perbandingannya adalah 19 : 1 : 1,8. Larutan ini mengandung 5 unit enzim/µl, sehingga konsentrasi akhir adalah 0,5 unit/25 µl.

Larutan dNTP (*Promega*) terdiri dari 230 µl akuabides yang ditambah dengan 5 µl dATP, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP dan 5 µl dTTP sehingga konsentrasi larutan dNTP yang digunakan adalah 2 mM. Larutan MgCl₂ (*Merck*) dibuat dengan konsentrasi 25 mM sehingga konsentrasi larutan MgCl₂ yang digunakan adalah 1,5 mM/25µl. Konsentrasi larutan buffer ini terdiri dari buffer PCR 10 X ditambah dengan 2,5 mg/ml gelatin.

Sebelum dilakukan amplifikasi terlebih dahulu ditambahkan satu tetes minyak mineral (*Gibco BRL*) menutupi permukaan atas campuran PCR. Perlakuan *hot start* pada suhu 95°C dilakukan selama 5 menit untuk memberi kesempatan denaturasi yang sempurna *template* DNA. Proses amplifikasinya dilakukan sebanyak 35 siklus dalam *thermocycler*. Pada setiap putaran terdiri dari suhu denaturasi pada 94°C selama 15 detik, suhu *annealing* pada 53°C selama 30 detik dan suhu ekstensi pada 72°C selama 30 detik. Pada akhir siklus ke-35 suhu ekstensi ditambah 10 menit untuk mendapatkan polimerisasi yang sempurna diakhir siklus. Selanjutnya suhu diturunkan menjadi 4°C untuk menyimpan DNA sebelum dikeluarkan dari *thermocycler*. Tabung Eppendorf dipindahkan dari *thermocycler* dan dilakukan pembuangan minyak mineral (*deoil*) untuk membersihkan larutan DNA atau produk PCR dari minyak mineral dengan menggunakan kertas parafilm. Hasil PCR dapat diketahui dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 2% yang sudah ditambah dengan etidium bromida.

Hasil dan Pembahasan

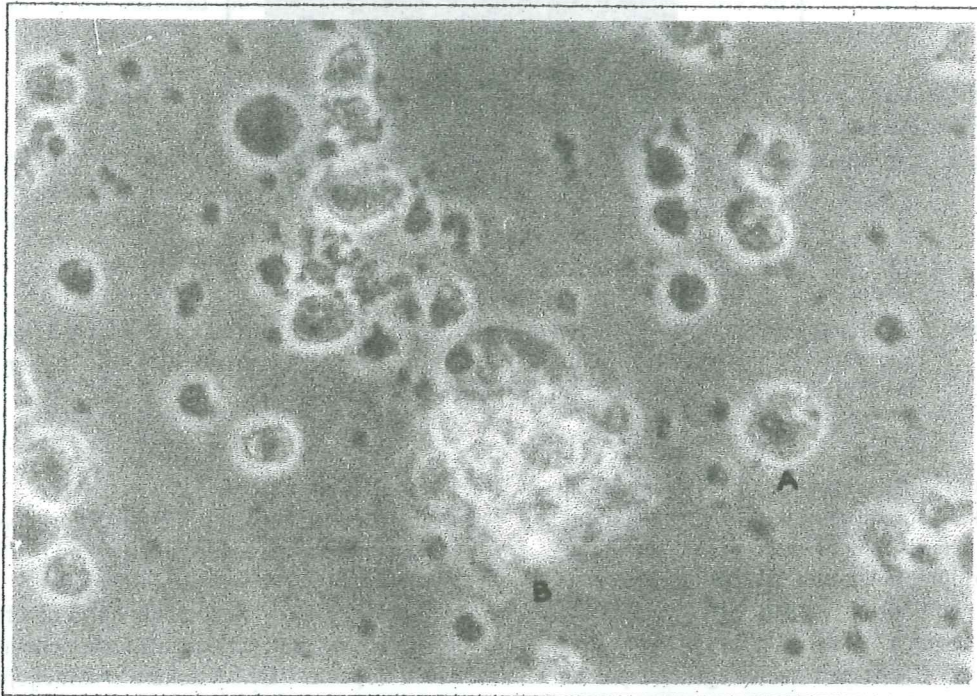
Limfosit B yang tumbuh *confluen* akan mengalami immortalisasi dan transformasi menjadi LCL. Sel LCL yang sudah mengalami transformasi dan membawa genom EBV dalam bentuk episom digunakan sebagai sumber untuk isolasi DNA. Gambaran mikroskopik LCL yang sudah mengalami transformasi dan menjadi LCL yang imortal selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Teknik PCR dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen DNA virus yang terintegrasi atau membentuk episom dalam LCL. Melalui cara

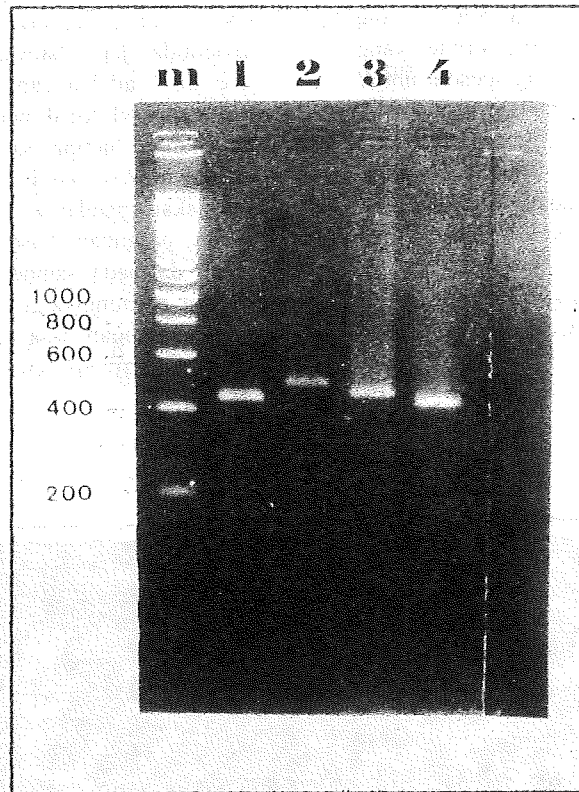
amplifikasi ini diharapkan fragmen spesifik dari DNA virus dapat diperbanyak yang panjangnya sesuai dengan jarak antar kedua primer yang digunakan (Sambrook dkk., 1989). Primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi domain C terminus gen *lmp-1*, sehingga diharapkan dapat dihasilkan suatu fragmen DNA sebesar 421 pasangan basa nukleotida. Hasil PCR yang didapatkan dari LCL dan biopsi segar jaringan KNF selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 memperlihatkan band-band produk PCR yang diamplifikasi. *Line* ke-1 adalah sampel WIL sebagai kontrol positif mempunyai

panjang 421 pasangan basa nukleotida. *Line* ke-2 adalah sampel ML yang merupakan penderita KNF lokal mempunyai jumlah pasangan basa nukleotida lebih banyak daripada sampel WIL. *Line* ke-3 adalah sampel ID yang merupakan penderita KNF lokal mempunyai jumlah pasangan basa yang hampir sama dengan sampel WIL sedangkan *line* ke-4 adalah sampel SK yang merupakan penderita KNF lokal mempunyai jumlah pasangan basa nukleotida yang lebih sedikit daripada sampel WIL. Hasil amplifikasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat variasi jumlah pasangan basa nukleotida gen penyandi domain C terminus gen *lmp-1*.



Gambar 1. Mikrograf *lymphoblastoid cell line* (LCL) imortal penderita KNF, (perbesaran 400 X). A = LCL. B = LCL yang membentuk agregat.



Gambar 2. Hasil amplifikasi domain C terminus gen *Imp-1* dengan primer CaO dari sampel DNA LCL. Keterangan : m=Marker 200 bp, 1=WIL prototipe dari Australia, 2= ML pasien KNF lokal, 3= ID pasien KNF lokal, 4= SK pasien KNF lokal.

Sebelum pelaksanaan PCR dilakukan beberapa kali optimasi suhu *thermocycler* untuk mendapat hasil amplifikasi yang sempurna. Kondisi optimum untuk mengamplifikasi C terminus gen *Imp-1* adalah sebagai berikut. Langkah pertama adalah perlakuan *hot start* pada suhu 95°C selama 5 menit agar didapatkan denaturasi *template* DNA yang sempurna. Suhu diturunkan pada suhu denaturasi 94°C selama 15 detik, kemudian diturunkan lagi pada suhu *annealing* pada 53°C selama 30 detik untuk memberi kesempatan pada semua primer untuk menempel pada *template* DNA. Suhu dinaikkan lagi pada suhu ekstensi 72°C selama 30 detik agar terjadi polimerisasi untai DNA yang disintesis. Siklus PCR dijalankan selama 35 kali dan pada akhir putaran diberi perlakuan ekstra ekstensi pada suhu 72°C selama 10 menit agar didapatkan polimerisasi untai DNA yang sempurna.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc. Ph.D. Kepala laboratorium Rekayasa Genetika PAU Bioteknologi UGM atas semua biaya dan fasilitas laboratorium yang diberikan untuk penelitian ini dan kepada Dr. Sukarti Moeljopawiro. M.Appl.Sc. atas sunbangan pemikiran dan pemberian enzim taq polimerase yang digunakan untuk PCR.

Daftar Pustaka

- Baichwal, V.R., & Sugden, B., (1987). Post-translation processing of an *Epstein-Barr* virus-encoded membran Protein Expressed in cells transformed by *Epstein-Barr* virus. J. Virol. 61: 866-75

- Chen, X.Y., Pepper, S.D. & Arrand, J.R. (1992). Prevalence of the A and B types of *Epstein-Barr virus* DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from Southern China. *J. Gen. Virol.* 73: 463-6.
- Epstein, M. & Achong, B. (1986). *The Epstein-Barr virus*. Recent Advances. London. Heinemann.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J. & Kieff, E. (1987). An *Epstein-Barr virus* transforming protein associates with vimentin in lymphocyte. *Mol. Cell Biol.* 7: 2299-308.
- Mann, K.P. & Thorley-Lawson, D. (1987). Posttranslational processing of the *Epstein-Barr virus* encoded p63/LMP protein. *J. Virol.* 61: 2100-08.
- Martin, J. & Sugden, B., (1991). Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization and cytoskeletal association. *J. Virol.* 65: 3246-58.
- Moorthy, R.K. & Thorley-Lawson, D., (1993). Biochemical, genetic and functional analyses of the phosphorylation sites on the *Epstein-Barr virus* encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J. Virol.* 67: 2637-45.
- Old, L.J., Clifford, P. & Boyse, E.A. (1966). Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56. 1699-704.
- Peng-Pilon, M., Ruuth, K., Lundgren, E. & Brodin, P. (1995). The Cytoplasmic C-terminal domain but not the N-terminal domain of latent membrane protein 1 of *Epstein-Barr virus* is essential for B Cell Activation. *J. Gen. Virol.* 76: 767-77.
- Sambrook, J., Fritsh, E.. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. ed. 2. Cold Spring Harbour. N.Y. Cold Spring Harbour Laboratory Press.