

PROFILING GENETIK GEN EGFR EXON 18 DAN 20 PADA SAMPEL URIN PASIEN KANKER PARU

AM Ridwanuloh^{1*}, PK Hikmawati², J Zaini³, SL Andarini³, ARH Utomo⁴

¹Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Bogor.

²Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

³Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi, FKUI /SMF Paru Rumah sakit Persahabatan, Jakarta.

⁴Program Pasca Sarjana Universitas YARSI, Jakarta.

*Email: asep043@brin.go.id

ABSTRAK

Penyakit kanker paru merupakan jenis penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian. Penderita kanker paru umumnya terdiagnosa pada stadium lanjut dan sudah mengalami metastasis sel kanker melalui cairan tubuh seperti plasma dan urin, dan menyebar ke organ lain. Biomarker genetik yang menjadi salah satu standar pemeriksaan kanker paru adalah gen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Daerah mutasi gen EGFR yang paling banyak ditemukan adalah gen EGFR exon 18, 19, 20, dan 21. Dalam penelitian ini dilakukan analisis pro iling genetik gen EGFR pada target sekuen ekson 18 dan ekson 20 menggunakan sampel urin yang dikumpulkan dari pasien kanker paru dari Rumah Sakit Persahabatan Jakarta. Sebanyak 30 sampel urin dikumpulkan kemudian masing-masing sampel diekstraksi menggunakan kit ekstraksi DNA khusus. Amplifikasi sekuen gen target EGFR ekson 18 dan 20 dilakukan dengan menggunakan mesin PCR, kemudian amplicon yang diperoleh dianalisis menggunakan metode sanger sekuensing untuk mengetahui lebih lanjut pro il mutasi titik yang terjadi pada amplicon tersebut. Hasil analisis menunjukkan terjadi mutasi titik G724S sebanyak 6% (2/30), mutasi T790M sebanyak 50% (15/30) dan mutasi Q787Q sebanyak 60% (18/30). Hasil ini menunjukkan bahwa sampel urin memiliki potensi besar digunakan sebagai sampel dalam analisis biomarker genetik pada pasien kanker paru.

Kata kunci: Epidermal Growth Factor Receptor, kanker paru, sampel urin.

PENDAHULUAN

Data GLOBOCAN (*Global Observatory for Cancer*) tahun 2020 mencatat adanya kasus kanker baru di dunia sebesar 19,3 juta orang, dan 11,4% diantaranya adalah penderita kanker paru. Di Indonesia, pada tahun 2020 terdapat sebanyak 34.783 kasus baru pasien kanker paru atau sekitar 8,8% dari jumlah kasus baru penderita kanker (Sung dkk., 2021). Menurut data dari rumah sakit kanker Dharmas tahun 2018, kanker paru menduduki peringkat ketiga dari semua jenis kanker pada pria dan wanita setelah kanker payudara dan kanker serviks (Pusdatin Kemenkes, 2019). Jumlah penderita kanker paru menduduki peringkat pertama pada laki-laki dan peringkat ke-4 pada wanita (Kristianto dan Rahman, 2019).

Terdapat dua jenis kanker paru yaitu karsinoma paru sel kecil (*Small cell Lung Cancer*; SCLC) dan karsinoma paru bukan sel kecil (*Non-Small Cell Lung Cancer*; NSCLC). Beberapa tipe NSCLC umumnya berupa adenokarsinoma, karsinoma sel skuamosa, dan karsinoma sel besar. Tipe sel kanker yang paling banyak dijumpai dan

menimbulkan keganasan adalah sel adenokarsinoma (Hsu dkk., 2018). Pasien yang datang ke rumah sakit pada umumnya terdeteksi sudah berada pada stadium lanjut dan mengalami metastasis (*advanced metastatic lung cancer*). Pengobatan yang dapat dilakukan tidak lagi melalui pengangkatan masa tumor di paru tetapi menggunakan kemoterapi atau obat terapi target yang spesifik (Konig dkk., 2021).

Gen EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) diketahui menjadi salah satu biomarker utama pada pemeriksaan kanker paru untuk tujuan pemilihan jenis terapi yang tepat (Hsu dkk., 2018). Mutasi gen EGFR yang umum digunakan dalam pemeriksaan adalah mutasi pada ekson 18, 19, 20, dan 21. Mutasi jenis delesi ekson 19 dan mutasi titik pada ekson 21 L858R dan L861 Q umumnya menjadi penanda pada pemeriksaan pertama saat pasien datang ke rumah sakit. Pemeriksaan mutasi pada ekson 18 G719S dan ekson 20 T790M umumnya berkaitan dengan kemungkinan terjadinya resistensi pengobatan dengan terapi target lini pertama (Zaini dkk., 2019).

Pemeriksaan molekuler pasien kanker paru merupakan standar yang umum digunakan di rumah sakit. Sampel yang digunakan adalah sampel yang berasal dari biopsi jaringan paru. Teknik pengambilan sampel ini bersifat invasif dan menyakitkan jika perlu dilakukan berulang untuk kebutuhan monitoring pengobatan (Mok dkk., 2018). Alternatif sampel untuk pemeriksaan kanker paru telah banyak diteliti diantaranya adalah dari plasma darah dan urin. Kedua sampel ini relatif mudah diperoleh dari pasien tanpa melukai (non-invasif) (Berz dkk., 2016; Wang dkk., 2017; Satapathy dkk., 2021).

Urin merupakan sampel yang mudah diperoleh namun penggunaannya sebagai sumber DNA untuk pemeriksaan biomarker genetik cukup sulit. DNA yang diperoleh dari cairan urin terdapat dalam bentuk *cell free DNA* atau cfDNA. Pada umumnya, cfDNA berada dalam keadaan terfragmentasi sehingga sulit untuk diamplifikasi (Wang dkk., 2017). Penelitian ini dilakukan untuk menyusun suatu metode PCR yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi sekuen target gen EGFR ekson 18 dan 20. Setelah produk amplicon diperoleh kemudian dilakukan profiling jenis mutasi yang ditemui pada sekuen ekson 18 dan 20 menggunakan metode sanger sekuensing. Jenis mutasi yang umum terjadi pada kedua ekson ini adalah mutasi titik G719S, G724S (Zhang dkk., 2018), Q787Q (Wu dkk., 2022), dan T790M (Wang dkk., 2016).

METODE

Pengumpulan Sampel

Sampel urin diambil dari pasien yang telah dinyatakan menderita kanker paru melalui pemeriksaan klinis dan CT Scan. Sebanyak 30 sampel dikumpulkan oleh tenaga klinis dari Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/ Rumah sakit Persahabatan Jakarta dengan izin etika penelitian nomor 396/UN.F1/ETIK/2016.

Ekstraksi DNA

Sebanyak 500 uL-1000 uL cairan urin yang telah dihomogenkan diambil kemudian

diekstraksi menggunakan QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Hilden, Jerman). Proses ekstraksi DNA mengikuti panduan kit yang digunakan. DNA yang telah diperoleh dilarutkan dalam 50 μ L buffer AE yang tersedia di dalam kit, kemudian diukur konsentrasinya menggunakan alat nanodrop lalu disimpan di dalam freezer -20 $^{\circ}$ C sebelum digunakan dalam proses analisis.

Amplifikasi Sekuen Gen EGFR Ekson 18 dan 20

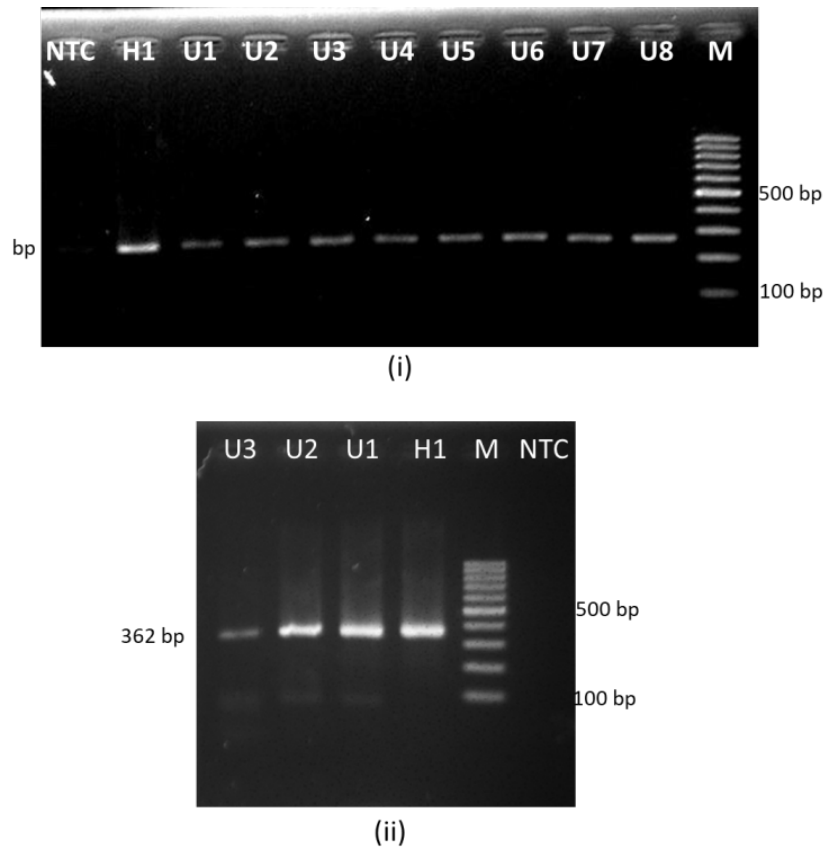
Amplifikasi target sekuen gen EGFR ekson 18 dan 20 dilakukan dengan menggunakan mesin PCR Biorad T100. Reagensia yang digunakan untuk amplifikasi ekson 18 adalah 1 μ l primer forward (5'-AGCATGGTGAGGGCTGAGGTGAC-3'), 1 μ l primer reverse (5'-ATATACAGC TTGCAAGGACTCTGG-3') 2,5 μ l buffer PCR, 0,5 μ l dNTPs, 0,15 μ l enzyme polimerase, dan 18,85 μ l H₂O. Reagensia yang digunakan untuk amplifikasi ekson 20 adalah 0,4 μ l primer forward (5'-GATCGCATTCATGCGTCTTCACC-3'), 0,4 μ l primer reverse (5'-TTGCTATCCCAGGAG CGCAGACC-3'), 2,5 μ l buffer PCR, 0,5 μ l dNTPs, 0,5 μ l enzyme polimerase, dan 19,7 μ l H₂O. Kedua gen target tersebut diamplifikasi menggunakan protokol pra-PCR pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 15 menit, 40 siklus PCR dengan tahapan denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 20 detik, annealing pada suhu 62 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan extension pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 1 menit serta post-PCR pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 3 menit. Sebagai kontrol posisi proses amplifikasi PCR digunakan DNA yang diekstraksi dari sel kultur ATCC H1975 yang diperoleh dari koleksi sel Pusat Riset Rekayasa Genetika - BRIN. Proses analisis elektroforesis gel agarose 2% dilakukan untuk mengetahui keberhasilan proses amplifikasi. Sebagai control proses amplifikasi digunakan NTC (*no template control*) untuk mengetahui jika terjadi kontaminasi dalam proses amplifikasi yang dapat diketahui dari adanya pita pada NTC. Sampel yang menghasilkan produk amplifikasi dengan pita yang jelas kemudian dilanjutkan dengan analisis menggunakan sekuensing.

Analisis Data

Data sekuensing yang diperoleh berupa kromatogram dari ampikon gen target dan deretan basa nukleotida yang berhasil diamplifikasi. File data kemudian dibuka dengan software bioedit dan dianalisis secara deskriptif untuk melihat terjadinya perubahan pada basa nukleotida.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA sampel urin pasien kanker paru yang diperoleh memiliki konsentrasi yang relatif rendah sekitar 5-20 ng/ μ L, namun secara umum memiliki tingkat kemurnian yang cukup bagus yang ditunjukkan dengan data perbandingan absorbansi 260/280 berada diantara nilai 1,8 - 2,0. DNA sampel kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sesuai dengan formula dan protocol yang telah dioptimasi. Sebanyak 30 sampel pasien kanker paru berhasil diamplifikasi menggunakan primer yang telah didesain pada ekson 18 dan ekson 20. Ampikon gen EGFR ekson 18 berukuran sekitar 262 bp dan ampikon gen EGFR ekson 20 berukuran sekitar 362 bp. Hasil analisis gel elektroforesis kedua jenis ampikon tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Amplikon sekuen gen EGFR ekson 18 (i) dan ekson 20 (ii)

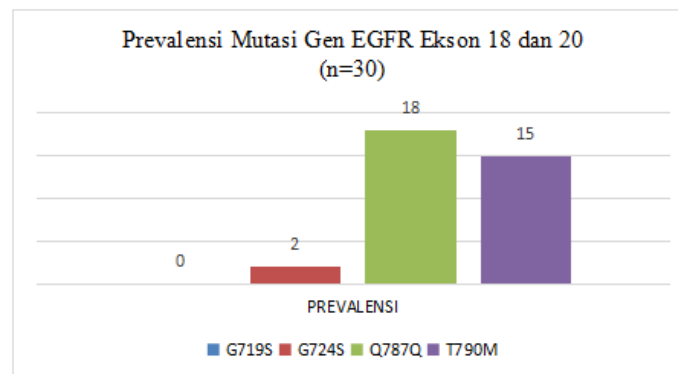
Hasil analisis sanger sekuensing menggunakan software bioedit diperoleh kromatogram dan urutan basa nukleotida. Adanya mutasi pada basa nukleotida ditandai dengan munculnya puncak tambahan pada puncak nukleotida tersebut (*double peak*). Kontrol positif digunakan DNA yang berasal dari sel ATCC H1975 yang sudah diketahui memiliki mutasi pada ekson 20 T790M.

Hasil analisis profiling gen EGFR ekson 18 dan 20 diketahui memiliki mutasi titik pada G724S (ekson 18) serta Q787Q dan T790M (ekson 20). Mutasi pada beberapa titik lain di dalam sekuen gen target tidak ditemukan. Mutasi G724S terletak pada kodon 724 dimana asam amino *glycine* berubah menjadi *serine*. Perubahan asam amino ini terjadi akibat substitusi basa *guanine* menjadi *adenine*. Mutasi Q787Q berupa *silent mutation* yang terletak pada kodon 787 dimana tidak ada perubahan asam amino yang dikodekan (asam amino *glutamine*) akan tetapi terjadi perubahan basa pada *triplets* penyusunnya yaitu basa *guanine* yang disubstitusikan dengan basa *adenine*. Mutasi T790M terjadi pada kodon 790 dimana asam amino *threonine* berubah menjadi *methionine*. Perubahan asam amino ini terjadi akibat substitusi basa *cytosine* menjadi *timin*. Pola kromatogram gen yang mengalami mutasi dan gen yang tidak mengalami mutasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pola kromatogram gen EGFR normal (i) dan mutan (ii)

Jumlah prevalensi mutasi yang diperoleh dari 30 sampel urin pasien kanker paru adalah mutasi titik G724S sebanyak 6% (2/30), mutasi T790M sebanyak 50% (15/30) dan mutasi Q787Q sebanyak 60% (18/30) (Gambar 3). Jumlah prevalensi mutasi ini lebih besar jika dibandingkan dengan prevalensi mutasi titik yang sama pada sampel plasma. Zaini dkk. (2019) melaporkan temuan 5,4% mutasi gen EGFR T790M pada plasma sampel pasien dari rumah sakit Persahabatan Jakarta. Sementara itu, jumlah prevalensi mutasi gen EGFR T790M pada sampel biopsi pasien kanker Rumah Sakit Persahabatan sebesar 3,4% (61/1779) (Syahrudin dkk., 2018).



Gambar 3. Grafik prevalensi mutasi titik gen EGFR ekson 18 dan 20 pada sampel urin

Mekanisme ditemukannya DNA pada urin terjadi akibat adanya cfDNA. cfDNA terbagi menjadi dua jenis yaitu cfDNA darah dan cfDNA bukan darah. cfDNA bukan darah merupakan fragmen DNA tumor yang berada pada cairan tubuh seperti urin, saliva, sputum, cairan pleura dan cairan *cerebrospinal* (CSF) (Peng dkk., 2017). Setiap pasien yang menderita tumor maupun kanker memiliki cfDNA termasuk dalam hal ini adalah pasien kanker paru. Ketika sel kanker pecah atau mati, sel akan mengalami lisis sehingga melepaskan isi sel termasuk DNA yang berisi kode unik dari sel kanker tersebut ke dalam aliran darah. DNA inilah yang akan bebas di dalam aliran darah yang kemudian dinamakan cfDNA.

cfDNA yang terkandung di dalam urin berasal dari plasma darah yang dapat melewati filtrasi ginjal. Selama sirkulasi, cDNA disaring dari darah ke dalam urin melalui filtrasi ginjal yang memiliki membran *permeable* terhadap molekul DNA. Akan tetapi, mekanisme translokasi DNA dari aliran darah ke urin belum diketahui. Secara teoritis, senyawa yang melewati filtrasi ginjal akan tersaring oleh membran basal dan membran celah diantara tangkai *podocytes*, hanya molekul yang berdiameter lebih kecil dari 6,4 nm dan dengan berat molekul tidak lebih dari 70kDa yang dapat melewati ginjal dan memasuki nefron (Bryzgunova dan Laktionov, 2015). Selain itu, cfDNA yang bermuatan negatif dapat melewati membran karena muatan negatif dari membran basal glomerulus. Hal ini dapat terjadi karena bentuk non-globular atau oleh deformabilitas kompleks DNA. Penjelasan lain adalah bahwa cfDNA dilapisi oleh liposom yang membuat cfDNA dapat melalui ginjal. Selain itu, permeabilitas ginjal dapat meningkat untuk beberapa kondisi fisik dan patologis, seperti kehamilan, kanker, dan peradangan (Lichtenstein dkk., 2001). Su dkk. (2004) melaporkan dua kategori DNA yang terdapat di dalam urin yaitu DNA urin dengan berat molekul rendah dan DNA urin dengan berat molekul tinggi. Kelas rendah DNA urin adalah antara 150 hingga 250 bp dan berasal dari sirkulasi, sedangkan DNA urin dengan berat molekul tinggi berukuran lebih besar dari 1 kb dan sebagian besar dari sel-sel yang ditumpahkan ke saluran kemih.

Adanya penemuan DNA di dalam sampel urin pasien kanker paru yang dapat digunakan dalam analisis lebih lanjut untuk pemeriksaan biomarker spesifik menunjukkan bukti bahwa sampel urin memiliki potensi untuk digunakan secara rutin dalam pemeriksaan biomarker genetik pasien. Data validasi teknik analisis yang tepat serta analisis perbandingan dengan menggunakan sampel standar biopsi jaringan paru menjadi hal penting yang dapat memperkuat penggunaan urin sebagai alternatif sampel pasine kanker paru terutama pada pasien *Advanced Metastatic Lung Cancer* untuk keperluan pemilihan jenis terapi dan monitoring selama menjalani pengobatan.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini diperoleh kesimpulan bahwa mutasi gen EGFR dapat ditemukan pada sampel urin pasien kanker paru. Profil genetik mutasi gen EGFR ekson 19 dan 20 pada sampel urin pasien kanker paru ditemukan adanya mutasi titik G724S pada 6% (2/30), mutasi T790M sebanyak 50% (15/30) dan mutasi Q787Q sebanyak 60% (18/30).

DAFTAR PUSTAKA

- Berz D., Raymond V.M., Garst J.H., and Erlander M.G., (2016), Non-invasive Urine Testing of *EGFR* Activating Mutation and T790M Resistance Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer, *Exp Hematol Oncol.*, 5:24.
- Bryzgunova O.E., and Laktionov P.P., (2015), Extracellular Nucleic Acids in Urine: Sources, Structure, Diagnostic Potential, *Acta Naturae*, 7, pp. 48–54.
- Hsu W.H., Yang J.C., Mok T.S., and Loong H.H., (2018), Overview of Current Systemic Management of EGFR-Mutant NSCLC., *Ann. Oncol.*, 29, pp. i3–i9.
- Konig D., Prince S.S., and Rothschild S., (2021), Targeted Therapy in Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer an Update on Treatment of the Most Important Actionable Oncogenic Driver Alterations, *Cancers*, 13(4), 804.
- Kristianto A., and Rahman A., (2019), Pembrolizumab sebagai Imunoterapi pada Nonsmall Cell Lung Carcinoma, *Indonesia Journal Chest*, 6(2), pp. 96-106.
- Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., and Umansky S.R., (2001), Circulating Nucleic Acids and Apoptosis, *Ann N Y Acad Sci.*, 945, pp. 239–249.
- Mok T.S., Cheng Y., Zhou X., Lee K.H., Nakagawa K., Niho S., Lee M., Linke R., Rosell R., Corral J., Migliorino M.R., Pluzanski A., Sbar E.I., Wang T., White J.L., and Wu Y.L., (2018), Improvement in Overall Survival in a Randomized Study that Compared Dacomitinib with Gefitinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations, *J. Clin. Oncol.*, 36, pp. 2244–2250.
- Peng, Muyun., Chen Chen., A. Hulbert., M. V. Brock., and Yu F., (2017), Non-Blood Circulating Tumor DNA Detection in Cancer, *Oncotarget Impact Journal*, 8(40), pp. 69162 – 69173.
- Pusdatin Kemenkes, (2019), *Beban Kanker di Indonesia*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, ISSN 2442-7659.
- Satapathy S., Singh V., Nambirajan A., Malik P.S., Tanwar P., Mehta A., Suryavanshi M., Thulkar S., Mohan A., and Jain D., (2021), EGFR Mutation Testing on Plasma and Urine Samples: A Pilot Study Evaluating the Value of Liquid Biopsy in Lung Cancer Diagnosis and Management, *Curr Probl Cancer*, 45(6), 100722.
- Su Y.H., Wang M., Brenner DE., Ng A., Melkonyan H., Umansky S., Syngal S., and Block TM., (2004), Human Urine Contains Small, 150-250 Nucleotide-Sized, Soluble DNA Derived from the Circulation and May be Useful in Detection of Colorectal Cancer. *Journal Molecular Diagnosis*, 6, pp. 101-107.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., and Bray F., (2021), Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin.*, 71(3), pp. 209-249.
- Syahrudin E., Wulandari L., Muktiati N.S., Rima A., Soeroso N., Ermayanti S., Levi M., Hidajat H., Widjajahakim G., and Utomo A.R.H., (2018), Uncommon EGFR Mutations in Cytological Specimens of 1,874 Newly Diagnosed Indonesian Lung Cancer Patients, *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 9, pp. 25–34.
- Wang S., Cang S., and Liu D., (2016), Third-Generation Inhibitors Targeting EGFR T790M Mutation in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, *Journal of Hematology & Oncology*, 9, 34.
- Wang W., Wang S., and Zhang M., (2017), Identification of Urine Biomarkers Associated with Lung Adenocarcinoma, *Oncotarget.*, 8(24): pp. 38517–38529.
- Wu W.J., Yang S.H., Chung H.P., Yen C.T., Chen Y.T., Chang W.C., Su J., and Chen H.Y., (2022), EGFR Q787Q Polymorphism is a Germline Variant and a Prognostic Factor for Lung Cancer Treated with TKIs, *Front. Oncol.*, 21, 12, 816801.
- Zaini J., Syahrudin E., Yunus M., Andarini S.L., Hudoyo A., Masykura N., Yasril R., Ridwanuloh A.M., Hidajat H.Nurwidya F., Suharsono S., and Utomo A.R.H., (2019), Evaluation of PCR-HRM, RFLP, and Direct Sequencing as Simple and Cost-Effective Methods to Detect Common EGFR Mutations in Plasma Cell-Free DNA

of Non-Small Cell Lung Cancer Patients, *Cancer Report*, 2(1).
Zhang Y., He B., Zhou D., Li M., and Hu C., (2018), Newly Emergent Acquired EGFR Exon 18 G724S Mutation After Resistance of a T790M Specific EGFR Inhibitor Osimertinib in Non-Small-Cell Lung Cancer: a Case Report, *OncoTargets and Therapy*, 12, pp. 51–56.

