

Analisis Ekspresi p21 dan CDK6 pada Karsinoma Payudara Invasif Tipe Luminal A, Luminal B dan HER2/neu

Nasrun Bakri, Nila Kurniasari, Dyah Fauziah

*Departemen/SMF Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
 RSUD. Dr. Soetomo
 Surabaya*

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma payudara adalah keganasan paling sering ditemukan pada wanita. Berbagai literatur menunjukkan bahwa p21 dan CDK6 mempunyai peranan pada proliferasi sel tumor di berbagai keganasan. Korelasi dan perbedaan ekspresi p21 dan CDK6 pada klasifikasi subtipe molekular karsinoma payudara invasif belum banyak diteliti. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi p21 dan CDK6 pada karsinoma payudara invasif tipe luminal A, luminal B dan HER/neu.

Metode

Penelitian ini dilakukan secara retrospektif dengan desain observasional analitik *cross sectional* blok parafin karsinoma payudara invasif subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Hasil penelitian dilakukan dengan uji statistik Kruskal-Wallis untuk uji beda dan uji statistik Spearman untuk uji korelasi.

Hasil

Penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ekspresi p21 ($p=0,402$) dan CDK6 ($p=0,238$) pada subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu. Tidak terdapat korelasi bermakna antara ekspresi p21 dan CDK6 pada luminal A ($p=0,211$), luminal B ($p=0,286$) dan HER2/neu ($p=0,192$).

Kesimpulan

Ekspresi p21 dan CDK6 tidak mempunyai perbedaan bermakna pada karsinoma payudara invasif subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu.

Kata kunci: CDK6, karsinoma payudara invasif, klasifikasi subtipe molekular, p21.

ABSTRACT

Background

Breast carcinoma is the most common malignancy in women worldwide. Literature shows that p21 and CDK6 have role in tumor cells proliferation in various malignancy. The expression and correlation between the expression of p21 and CDK6 in molecular subtypes of invasive breast carcinoma has not yet been widely studied. The purpose of this study was to know the ekspression of p21 and CDK6 in invasive breast carcinoma with luminal A, luminal B and HER/neu subtype.

Methods

The aim of this observational analytic study is to analyze the differences and correlation between p21 and CDK6 in the luminal A, luminal B and HER2/neu subtypes of invasive breast carcinoma on 30 paraffin blocks of invasive breast carcinoma at Anatomical Pathology Laboratory, Dr. Soetomo Hospital. The immunoeexpression are evaluated and analyzed statistically.

Results

The results showed no significant difference in the expression of p21 and CDK6 in luminal A, luminal B and HER/neu subtypes. There was no significant correlation between the expression of p21 and CDK6 in luminal A, luminal B, HER/neu subtypes.

Conclusion

There were no significant differences in the expression of p21 and CDK6 in the luminal A, B and HER2/neu subtype of breast carcinoma.

Key words: CDK6, invasive breast carcinoma, molecular subtypes, p21.

PENDAHULUAN

Karsinoma payudara merupakan keganasan pada wanita yang paling banyak ditemukan di dunia. Insiden kanker payudara semakin meningkat hingga 5% per tahun di negara berkembang.¹

Banyak bukti menyatakan bahwa ekspresi reseptor hormon dan HER-2/neu mempunyai efek langsung terhadap terapi dan tidak ada korelasi yang bermakna bila dibandingkan dengan tipe karsinoma payudara konvensional.² Lima klasifikasi sub tipe molekular karsinoma payudara invasif telah diidentifikasi berdasarkan analisa gen yaitu: (1) luminal A; (2) luminal B; (3) HER-2/neu; (4) basal like; (5) *Breast-like*/tidak terklasifikasi.^{3,4}

P21 adalah suatu protein penekan tumor (*Tumor Supressor Protein*) yang dianggap sebagai efektor terkuat dari p53. Pada kondisi normal p21 berada di dalam nukleus, memiliki fungsi utama dalam penghentian siklus sel, dengan cara berikatan dengan kompleks *Cyclin Dependent Kinase* (CDK).⁵

CDK6 bekerja sama dengan *cyclin* D1, mengendalikan progresi siklus sel fase G1 ke S melalui fosforilasi dan selanjutnya inaktivasi protein Rb1.⁶ Beberapa penelitian mengungkapkan fungsi CDK6, antara lain dalam tumorigenesis, memutus proliferasi seluler dan diferensiasi.^{7,8}

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi p21 dan CDK6 pada karsinoma payudara invasif tipe luminal A, luminal B dan HER/neu.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian menggunakan analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo menggunakan blok parafin karsioma payudara periode Januari-Desember 2015, yang dipilih secara *random sampling* pada kelompok luminal A, luminal B dan HER2/Neu dengan masing-masing 10 sampel.

Luminal A ditandai dengan ER positif, PR positif, HER2/neu negatif serta ekspresi KI67 <14%, Luminal B ditandai dengan ER positif, PR bisa positif bisa negatif, HER2/neu positif dan KI67 >14% dan HER-2/neu Positif ditandai dengan ER negatif, PR negatif dan HER-2/neu positif.⁹ Penelitian menggunakan pulasan imunohistokimia p21 dan CDK6. Imunohistokimia p21 diperiksa dengan antibodi *Monoclonal*

Mouse Anti-Human p21WAF1/Cip1 Code-Nr. M 7202 (Dako) dengan dilusi 1:100 dan dinyatakan positif jika terpulas pada inti sel. CDK6 diperiksa dengan antibodi *policlonal* CDK6 (C-21): sc-177 (Santa Cruz Biotechnology) dengan dilusi 1:100 dan dinyatakan positif jika terpulas positif pada inti sel. Ekspresi p21 dan CDK6 dihitung dari rata-rata 5 lapang pandang besar, pada area *hotspot* di tumor, dan dinyatakan dalam persentase.¹⁰ Pembacaan IHK dilakukan oleh 2 observer dengan metode pulasan menggunakan mesin dan memakai sistem Avidin biotin.

Analisis data untuk mengetahui perbedaan ekspresi p21 dan CDK6 pada sub tipe luminal A, luminal B dan HER2/neu digunakan uji statistik Kruskal-Wallis, sedangkan untuk mengetahui korelasi antara p21 dengan CDK6 pada sub tipe luminal A, luminal B dan HER2/neu dan digunakan uji korelasi Spearman (bermakna jika p<0,05).

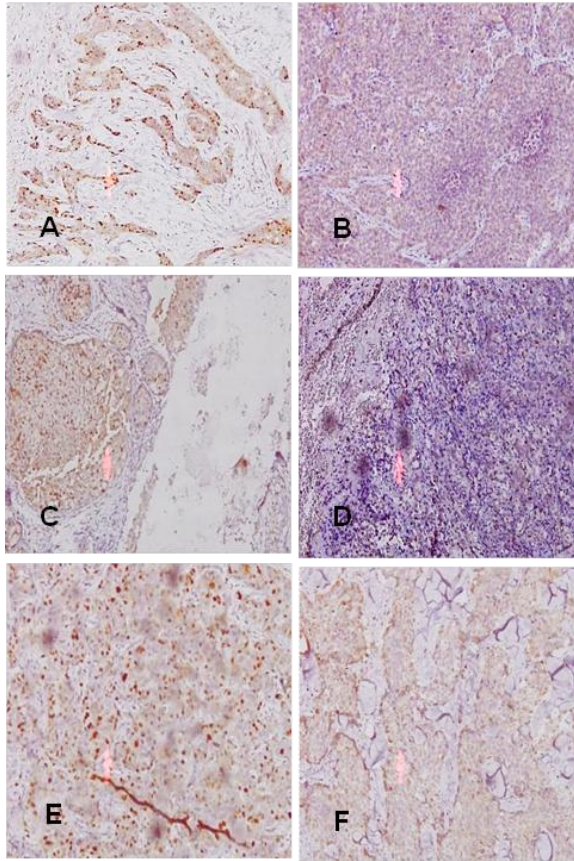
HASIL

Penelitian ini menggunakan 30 sampel karsinoma payudara invasif dari derajat I sampai dengan derajat III, dengan sampel terbanyak pada derajat II (46,7%). Usia penderita mulai dari 37 tahun sampai dengan 76 tahun dengan penderita terbanyak usia 41-50 tahun (40,0%). Sampel terutama diperoleh dari bahan biopsi (70,0%). Karakteristik sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kliniko patologi pasien

Parameter	Frekuensi	Persentase (%)
Usia		
30-40	1	3,3
41-50	12	40,0
51-60	9	30,0
61-70	3	10,0
71-80	5	8,0
Derajat histologik		
Grade I	5	16,6
Grade II	14	46,7
Grade III	11	36,7
Jenis sampel		
Biopsi	21	70,0
Operasi	9	30,0

Positivitas p21 pada karsinoma payudara sub tipe luminal A, luminal B, dan HER2/neu sangat bervariasi mulai dari 0% sampai dengan 70% dengan intensitas lemah sampai kuat. Hasil pulasan Imunohistokimia p21 dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan distribusi ekspresi p21 pada ketiga sub tipe dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Ekspresi P21 pada inti karsinoma payudara invasif (imunohistokimia, 400x). A. Ekspresi p21 sebanyak 70% pada luminal A; B. Ekspresi p21 sebanyak 10% pada luminal A; C. Ekspresi p21 sebanyak 70% pada luminal B; D. Ekspresi p21 sebanyak 10% pada luminal B; E. Ekspresi p21 persentase 70% pada HER2/neu; F. Ekspresi p21 sebanyak 5% pada HER2/neu.

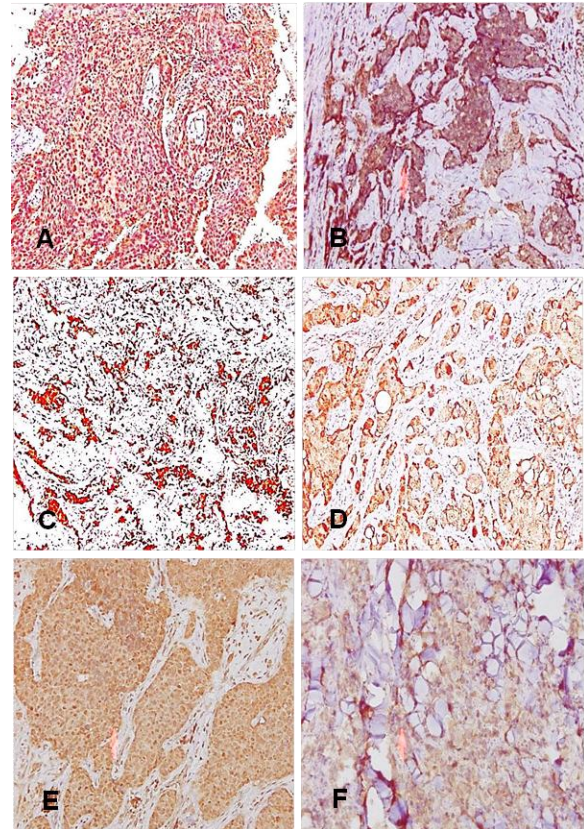
Tabel 2. Distribusi karsinoma payudara invasif berdasarkan ekspresi p21.

Subtipe molekular	n	p21				P
		Mean	SD	Min	Maks	
Luminal A	10	37,20	28,72	1	70	0,402
Luminal B	10	23,50	21,99	0	70	
HER2/neu Positif	10	19,90	21,11	1	70	

Uji analisis statistik Kruskal-Wallis, didapatkan hasil $p=0,402$ atau $p>0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi p21 dengan subtipe luminal A, luminal B, dan HER2/neu.

Positivitas CDK6 pada karsinoma payudara subtipe luminal A, luminal B, dan HER2/neu sangat bervariasi mulai dari 0%

sampai dengan 80% dengan intensitas lemah sampai kuat. Hasil pulasan imunohistokimia CDK6 dapat dilihat pada Gambar 2, sedangkan distribusi ekspresi CDK6 pada ketiga subtipe dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 2. Ekspresi CDK6 pada inti karsinoma payudara invasif (imunohistokimia, 400x). A. Ekspresi CDK6 sebanyak 80% pada luminal A; B. Ekspresi CDK6 sebanyak 0% pada luminal A; C. Ekspresi CDK6 sebanyak 70% pada luminal B; D. Ekspresi CDK6 sebanyak 10% pada luminal B; E. Ekspresi CDK6 sebanyak 80% pada HER2/neu; F. Ekspresi CDK6 sebanyak 2% pada HER2/neu.

Tabel 3. Distribusi karsinoma payudara berdasarkan ekspresi CDK6.

Subtipe molekular	n	CDK6				P
		Mean	SD	Min	Maks	
Luminal A	10	62,00	22,51	10	80	0,238
Luminal B	10	49,00	26,01	10	70	
HER2/neu Positif	10	41,20	33,22	0	80	

Analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis Test diperoleh nilai p sebesar 0,238 atau $p>0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan

bermakna antara ekspresi CDK6 dengan subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu.

Korelasi ekspresi p21 dan CDK6 pada karsinoma payudara invasif subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu, diuji dengan uji korelasi Spearman (Tabel 4).

Tabel 4. Korelasi ekspresi p21 dengan CDK6 pada karsinoma payudara invasif.

Subtipe molekular	n	Korelasi p21 dengan CDK6	
		<i>r_s</i>	p
Luminal A	10	0,433	0,211
Luminal B	10	0,375	0,286
HER2/Neu	10	0,450	0,192

Hasil analisis uji korelasi Spearman menunjukkan tidak didapatkan adanya korelasi yang bermakna ($p > 0,05$) antara ekspresi p21 dengan ekspresi CDK6 pada subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu.

DISKUSI

Dalam siklus sel, *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI) merupakan protein yang dapat menghambat aktivitas *cyclin-dependent kinase* (CDK). Terdapat 2 kelompok protein CDK yaitu INK4 (p15, p16, p18, p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Kelompok INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan CDK sehingga mencegah CDK mengikat *cyclin D*. Kelompok CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 *cyclin* –CDK dan *cyclin B-CDK1*.¹¹

P21 dikenal juga sebagai p21^{WAF1/Cip1}, memicu penghentian siklus sel sebagai respon terhadap berbagai stimulus. p21 menghambat siklus sel melalui hambatan terhadap aktivitas CDK2 dan CDK1 menyebabkan hambatan dari fase G1 ke S. Selain itu, p21 berikatan dengan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), p21 mengganggu aktivitas PCNA-dependent DNA polymerase, sehingga menghambat replikasi DNA.¹²

Pada penelitian ini didapatkan persentase ekspresi p21 pada subtipe luminal A, luminal B, dan HER2/neu tidak bermakna secara statistik. Hal ini didukung oleh penelitian yang memberi informasi bahwa peran prognostik dari p21 pada kanker payudara masih belum jelas karena didapatkan hasil yang berbeda dari penelitian-penelitian sebelumnya. Beberapa peneliti mengaitkan ekspresi p21 yang meningkat dengan diferensiasi buruk dan *survival* yang

lebih rendah, sedangkan peneliti lain menemukan kaitan dengan peningkatan diferensiasi dan keluaran penyakit yang lebih baik. Sampel pasien, antibodi, metode analisis, serta nilai *cut off* berbeda yang digunakan pada penelitian-penelitian p21 bisa menjelaskan perbedaan antara penelitian sebelumnya. Ekspresi p21 yang tinggi pada sel dengan proliferasi tinggi dapat mencerminkan kegagalan usaha untuk menghambat siklus sel oleh p21. Selain itu, ekspresi berlebih dari CDK2 dan *cyclin A* dilaporkan menghambat efek inhibisi dari ekspresi p21 yang tinggi. Mutasi dari protein *retinoblastoma* (pRb) juga dapat menyebabkan peningkatan ekspresi p21 melalui deregulasi faktor transkripsi E2F-1, dan efeknya dapat diganti dengan menghilangnya pRb. Sebaliknya, ekspresi p21 dipicu oleh faktor-faktor di mana ekspresinya diketahui berkaitan dengan progresi penyakit pada kanker payudara, seperti *transforming growth factor b1* dan reseptor *epidermal growth factor*. p21 juga diduga memediasi aktivasi jalur sinyal estrogen pada sel tumor dengan estrogen negatif.¹³

P21 (disebut juga sebagai CIP1 atau SDI1) adalah sebuah protein nukleus dengan peran penting dalam regulasi siklus sel. p21 bertindak sebagai inhibitor universal dari CDK, secara langsung menghentikan siklus sel pada fase G1/S.¹⁴

Cyclin-dependent kinase (CDK6) merupakan keluarga serine/threonin protein kinase yang terlibat dalam siklus sel, transkripsi dan proses biologis lain seperti translasi, neurogenesis dan apoptosis. Ekspresi CDK6 akan meningkat di beberapa tipe kanker. Beberapa bukti menunjukkan bahwa sel tumor tertentu membutuhkan CDK6 untuk proliferasi.¹⁵

Penelitian tentang CDK6 pada karsinoma payudara, khususnya yang dikaitkan dengan subtipe molekular belum banyak dilakukan. Penelitian oleh Murphy menjelaskan peran Rb, *cyclin D1* dan CDK4/6 pada siklus sel. Progresi dari G1 ke fase S membutuhkan fosforilasi Rb oleh CDK4 atau CDK6 beserta dengan *activating subunit Cyclin D1, D2, atau D3*. Hipofosforilasi Rb menurunkan fungsi E2F family, menyebabkan penurunan ekspresi gen yang terlibat dalam progresi siklus sel dari G1 ke fase S, selanjutnya replikasi dan progresi mitosis, dan ini berlaku sebaliknya. Pada penelitian ini, ditemukan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna dari ekspresi CDK6 pada

subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu. Hal ini dimungkinkan karena fungsi CDK6 dalam mempengaruhi proliferasi sel berhubungan dengan banyak jalur di antaranya Rb, E2F, CIP/KIP family yang merupakan inhibitor CDK universal serta INK4 family yang merupakan inhibitor spesifik dari CDK4/6, sehingga proliferasi sel tidak hanya berdasar pada aktivitas CDK6 saja.¹⁶

Pada penelitian yang dilakukan oleh Pardis yang meneliti ekspresi CDK6 pada kelenjar liur menyebutkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara ekspresi CDK6 pada berbagai jenis tumor ($p=0,2$), hal ini disebabkan karena adanya disregulasi jalur pRb yang berperan dalam onkogenesis tumor kelenjar liur. Disorientasi dalam regulasi siklus-sel adalah proses mendasar dalam pertumbuhan tumor. Pada penelitian Pardis, ekspresi CDK6 diamati pada jaringan tumor menunjukkan bahwa jalur siklus dan Rb ini memiliki peran dalam tumorigenesis. Fosforilasi pRb pada transisi G1/S biasanya didorong oleh kompleks CDK4 dan CDK6 dengan *cyclin* D1 yang menyebabkan pelepasan protein terkait seperti E2F-1 yang mengaktifkan gen yang diperlukan untuk perkembangan sel melalui fase G1.¹⁷

Pada penelitian ini tidak didapatkan adanya korelasi yang bermakna ($p>0,05$) antara ekspresi p21 dengan ekspresi CDK6 pada masing-masing kelompok sampel subtipe molekular. Hal ini didukung oleh berbagai kepustakaan karsinoma payudara sebelumnya yang melaporkan peran p21 dan CDK6 sebagai faktor prognosis yang saling *independent* antara satu dengan lainnya.¹⁸

KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi p21 dan CDK6 pada karsinoma payudara invasif subtipe luminal A, luminal B dan HER2/neu. ttidak terdapat korelasi p21 dan CDK6 pada ketiga subtipe molekular payudara.

DAFTAR PUSTAKA

1. Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol.* 2009; 33: 315-8.
2. Onitilo AA, Engel MJ, Greenlee TL, Mukesh NB. Breast cancer subtypes based on ER/PR and HER-2 expression: Comparison

- of clinopathologic features and survival. *Clin Med Res.* 2009; 7: 4-13.
3. Pusztai, Lajos. Current status of prognostic profiling in breast cancer. *Oncol.* 2008; 13: 350-60.
4. Raica M, Jung L, Cimpean MA, Suciuc C, Muresan MA. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol.* 2009; 50: 5-13.
5. Abukhdeir, Park, P21 and p27 roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 1-18.
6. Meyerson M, Harlow ED. Identification of G1 kinase activity for CDK6 a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol.* 1994; 2077-86.
7. Ericson KK, Krull D, Slomiany P, Gressel MJ. Expression of cyclin-dependent kinase 6, but no cyclin-dependent kinase 4, alters morphology of cultured mouse astrocytes. *Mol Cancer Res.* 2003; 1: 654-64.
8. Slomiany P, Baker T, Elliot ER, Gressel MJ. Changes in motility, gene expression and actin dynamic: CDK6-induced cytoskeletal changes associated with differentiation in mouse astrocytes. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 635-46.
9. Akslen, Molecular classification of breast cancer 5, Centre for Cancer Biomarkers Department of Clinical Medicine, Section for Pathology University of Bergen-Haukeland University Hospital; 2015; 5; 1-3.
10. Wang G, Zheng L, Yu Z, Liao G, Lu L, Xu R, *et al.* Increased cyclin-dependent kinase 6 expression in bladder cancer. *Oncol Lett.* 2012; 4: 43-6.
11. Vermeulen K, Berneman Z, Van Bockstaele D. Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif.* 2003; 36: 165-75.
12. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: Intricate network and multiple activities, *Nat Rev Cancer.* 2009; 1-14.
13. Pellikainen JM, Pekola TT, Rapponen MK, Kataja VV, Kellokoski KJ, Eskelinen JM, *et al.* P21 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *Original Article.* 2003; 214-20.
14. Gohring UJ, Bersch A, Becker M, Neuhaus W, Schondorf T. p21 correlates with prognosis in invasive breast cancer. *Clin Pathol.* 2001; 54: 866-70.

Analisis Ekspresi p21 dan CDK6 pada Karasinoma Payudara
Nasrun Bakri, Nila Kurniasari, Dyah Fauziah

15. Tadesse S, Yu M, Kumarasiri M, Le TB, Wang SA. Targeting CDK6 in cancer: state of the art and new insights. Review. 2015; 3220-30.
16. Murphy GC, Dickler NM. The role of CDK4/6 inhibition in breast cancer. Oncol. 2015; 20: 483-90.
17. Pardis S, Tadbir AA, Ashkavandi ZJ, Najvani AD, Ashraf MJ, Ranjbaran H. Expression of CDK6 in salivary gland tumors. J Med Sci. 2012; 12: 193-7.
18. Soliman AA, Anis ES. Immunohistochemical expression of p21 in ductal carcinoma of the breast and its correlation with HER2/neu expression and hormonal status. Academic J Cancer Res. 2014; 7: 98-108.