

Tinjauan Pustaka**Ekspresi gen litik virus Epstein-Barr:
manfaatnya untuk penegakan diagnosis karsinoma nasofaring****Daniel Joko Wahyono***, **Bambang Hermani****, **Purnomo Soeharso******Program Doktor Ilmu Biomedik - Program Pascasarjana FKUI/
Fakultas Biologi Universitas Soedirman

**Departemen Ilmu Penyakit Telinga Hidung Tenggorok FKUI/Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo

***Departemen Biologi Kedokteran FKUI

ABSTRAK

Latar belakang: Karsinoma nasofaring (KNF) bersifat endemik secara geografis (di Asia Tenggara) dan berasosiasi dengan beragam faktor lingkungan dan genetik. KNF tidak berdiferensiasi konsisten dengan adanya infeksi virus Epstein-Barr (VEB). Prevalensi KNF pada populasi Indonesia cukup tinggi sebesar 6,2/100.000 penduduk per tahun. **Tujuan:** Menjelaskan kegunaan analisis ekspresi gen litik *immediate-early* VEB untuk menegakkan diagnosis KNF dan meningkatkan efisiensi dalam penanganan KNF. **Tinjauan Pustaka:** Replikasi VEB pada epitel nasofaring berimplikasi pada dua reaksi seluler, yaitu siklus laten dan litik VEB. Ekspresi gen litik VEB terdiri dari tiga fase, yaitu *immediate-early*, *early* dan *late*. Ekspresi gen *immediate-early* BZLF1 dan BRLF1 diperlukan untuk menginduksi gen litik fase *early* dan *late*, sehingga kedua gen tersebut dikenal sebagai gen transaktivator. Gen fase *early* litik BALF1 mengekspresikan protein replikasi pada KNF. Ekspresi gen fase *late* BCLF1 berperan penting untuk replikasi VEB pada KNF, terutama untuk membentuk struktur virion. Perubahan siklus laten menjadi siklus litik pada sel tumor dapat terjadi secara spontan, terutama melalui transduksi sinyal setelah aktivasi oleh anti-IgG, TGF- β dan CD4⁺. Pada KNF, induksi siklus litik VEB dengan cisplatin dan radiasi sinar γ menyebabkan peningkatan ekspresi gen BRLF1 dan BZLF1 yang berkorelasi dengan peningkatan progresivitas tumor. Teknik RT-PCR akan sangat berguna untuk mendeteksi ekspresi mRNA gen BRLF1 dan BZLF1 VEB pada lokasi tumor primer, sedangkan teknik *real time* RT-PCR digunakan untuk mengukur kuantitas mRNA gen tersebut. **Kesimpulan:** Ekspresi gen litik *immediate-early* VEB pada biopsi tumor KNF memberikan informasi klinis dasar yang lebih akurat untuk diagnosis dan terapi KNF.

Kata kunci: ekspresi gen litik VEB, karsinoma nasofaring, diagnosis KNF.**ABSTRACT**

Background: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is endemic in certain geographic regions, such as Southeast Asia, and is associated with several environmental and genetic factors. Undifferentiated NPC is consistent with Epstein-Barr virus (EBV) infection. NPC is the most common ENT tumor in Indonesia with high prevalence among native populations and yearly overall incidence estimated 6.2 per 100.000 population. **Purpose:** To explain the advantage of EBV immediate-early gene expression analysis in determining of NPC diagnosis and management of NPC. **Review:** Replication of EBV implies to two cellular reactions, i.e. latency and lytic cycle expression of EBV lytic genes which consists of three lytic phases, i.e. immediate-early, early and late phase. Expression of immediate-early genes BZLF1 and BRLF1 are needed to induct of early and late genes, so both genes are known as transactivator genes. BALF1, an early lytic gene, expresses some protein regulating EBV replication in NPC. Expression of

BCLF1, a late lytic gene, is essential for EBV replication, particularly in the forming of virion structure in NPC. Switching from latent to lytic cycle in tumor cells can happened spontaneously, particularly when the viral immediate early genes are induced via signal transduction after initial activation by anti-IgG, TGF- β and CD4+. In NPC, the induction of EBV lytic cycle by cisplatin and irradiation gamma leads to the increasing expression of BRLF1 and BZLF1 which have a correlation with the increasing of tumor progression. RT-PCR technique is a very useful for detecting mRNA BRLF1 and BZLF1 gene expression at the site of primary tumor, while real-time RT-PCR technique is used to measure the mRNA level of those genes. Conclusion: Expression of EBV immediate-early lytic gene in the biopsy of NPC primary tumour provides a basic clinical information for NPC diagnosis and therapy more accurately.

Key words: expression EBV lytic gene, nasopharyngeal carcinoma, NPC diagnosis.

Alamat korespondensi: Daniel Joko Wahyono, Program Biomedik FKUI. Jl. Salemba Raya 6 Jakarta. E-mail: dj_wahyono@yahoo.com

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas pada sel epitel nasofaring dan merupakan penyakit multifaktor yang bersifat endemik.¹ Daerah endemik KNF adalah daerah dengan populasi risiko tinggi KNF, terutama di wilayah Cina Selatan, Asia Tenggara, India Barat Daya, Afrika Utara, Eskimo dan Alaska. Insidens pada pria cenderung lebih tinggi dibandingkan wanita dengan rasio 2,3:1.² KNF merupakan bentuk keganasan ketiga yang dijumpai pada pria dengan insidensi di Cina Selatan berkisar 23-30/100.000 penduduk per tahun.³ Pada populasi Indonesia yang mempunyai keragaman etnik tinggi dengan populasi berkisar 225 juta jiwa, KNF adalah tumor THT yang paling tinggi prevalensinya pada populasi penduduk asli dengan angka insidensi 6,2/100.000 penduduk per tahun, sehingga populasi Indonesia termasuk dalam kelompok daerah dengan populasi risiko agak tinggi KNF. Insidensi KNF yang paling tinggi ditemukan pada populasi penduduk asli di Sulawesi. Berdasarkan atas seluruh diagnosis KNF yaitu pria 22% dan wanita 8%, maka rasio KNF antara pria dan wanita adalah 2,4:1.^{4,5}

KNF tipe karsinoma tidak berdiferensiasi (*undifferentiated carcinoma*) atau KNF WHO tipe IIB dianggap 100% berasosiasi dengan infeksi VEB.⁶ KNF WHO tipe IIB dengan insidens yang tinggi ditemukan pada populasi di sebagian besar

wilayah Asia Tenggara, sedangkan pada populasi di Afrika dan Eskimo insidensinya lebih rendah.⁵ Berdasarkan frekuensi malignansi beragam yang berkaitan dengan VEB, ada dua tipe sel target utama virus yaitu limfosit B dan sel epitel. Malignansi yang berasosiasi dengan infeksi VEB dan limfosit B sebagai sel targetnya adalah limfoma Burkitt, *post-transplant lymphoproliferative disease (PLTD)* dan *Hodgkin's disease*. Malignansi yang berasosiasi dengan VEB dan sel epitel sebagai sel targetnya adalah karsinoma nasofaring dan karsinoma gaster.⁷

Infeksi litik herpesvirus dibagi menjadi tiga fase ekspresi gen, yaitu *immediate-early*, *early* dan *late*. Pada fase *immediate-early* (IE) berlangsung transkripsi transaktivator replikasi virus yang berfungsi mengatur ekspresi baik gen virus seluler maupun lainnya. Fase *early* mengekspresikan komponen proses replikasi DNA virus. Fase *late* terekspresi ketika terbentuk sebagian besar protein struktur kapsul virus, tegumentum dan selubung virus. Pada infeksi litik VEB, induksi replikasi virus oleh gen transaktivator BZLF1 secara efisien membutuhkan gen transaktivator lain, yaitu BRLF1. Ekspresi gen litik *immediate-early* BZLF1 dan BRLF1 diperlukan untuk menginduksi seluruh rangkaian gen-gen lain pada siklus litik, seperti gen litik fase *early* dan *late*.⁷ Oleh karena itu, tinjauan pustaka ini bertujuan menjelaskan kegunaan analisis ekspresi gen

litik *immediate-early* VEB untuk menegakkan diagnosis KNF dan meningkatkan efisiensi dalam penanganan KNF.

TINJAUAN PUSTAKA

Aspek biologi VEB

Virus Epstein-Barr (VEB) adalah spesies *Human herpesvirus 4* dari genus *Lymphocryptovirus* dan termasuk dalam familia *Herpesviridae*. VEB adalah virus herpes- γ yang berasosiasi dengan jaringan limfoid dan kanker pada sel epitel.⁸ Pada keadaan normal, infeksi VEB hanya terbatas pada manusia sebagai inangnya, walaupun hasil eksperimen pada beberapa jenis kera juga dapat terinfeksi VEB. Struktur morfologi VEB terdiri dari DNA yang diselubungi protein inti berbentuk toroid, kapsul nukleus, protein tegumentum dan selubung luar. Pada selubung luar terdapat tonjolan glikoprotein, yaitu Gp 350/320.^{9,10}

VEB digolongkan menjadi dua sub tipe, yaitu VEB sub tipe 1 atau A (VEB-1) dan VEB sub tipe 2 atau B (VEB-2). Kedua sub tipe ini mempunyai homologi sekuens genom VEB sekitar 85%. Kedua sub tipe VEB tersebut mempunyai perbedaan sekuens polimorfik yang signifikan pada gen EBNA2 (BYRF1) dan EBNA3A-C (BERF1-3), sedangkan variasi genetik relatif kecil terdapat pada gen-gen EBNA1 (BKRF1), LMP1 (BNLF1), Zebra (BZLF1) dan berbagai gen lainnya.^{9,10} Pada saat ini, sekuens genom VEB-2 strain AG876 telah berhasil dipetakan secara lengkap.¹¹ Sekuens genom VEB-1 dan VEB-2 mempunyai homologi yang tinggi menunjukkan bahwa kedua sub tipe VEB ini merupakan satu spesies, walaupun lokasi gen EBNA1 berbeda pada kedua sub tipe VEB tersebut. Identifikasi sub tipe VEB dari sampel klinis dapat dilakukan dengan teknik PCR.⁹

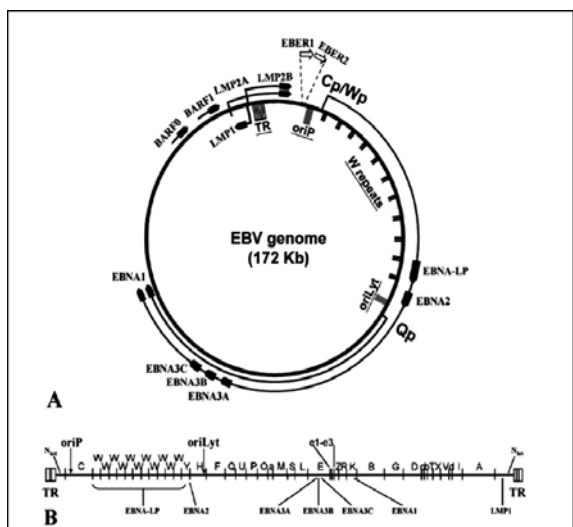
Prevalensi VEB-1 lebih tinggi daripada VEB-2, meskipun VEB-2 lebih banyak ditemukan di Afrika terutama di daerah endemik malaria dan limfoma Burkitt. Prevalensi VEB-2 ini diduga berkaitan dengan kegagalan fungsi sel T dan stimulasi sel B poliklonal yang intensif pada sistem imun inangnya.¹⁰ VEB-1 ternyata lebih berkaitan dengan penyakit yang berasosiasi

dengan VEB dan kemampuan mentransformasi sel B yang lebih efisien daripada VEB-2 secara *in vitro*.⁹ Pada penderita usia muda menunjukkan bahwa 77% penderita membawa VEB-1, 17% VEB-2 dan 5% membawa keduanya.¹² VEB-1 dapat menginfeksi sel epitel orofaring dan limfosit darah tepi, sedangkan VEB-2 hanya menginfeksi orofaring saja.¹⁰

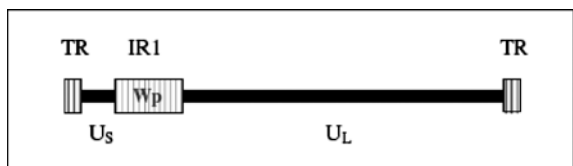
VEB dari strain B95-8 adalah virus herpes yang pertama kali diketahui seluruh sekuens fragmen restriksi BamHI secara lengkap. Tata nama gen-gen VEB dirumuskan berdasarkan atas orientasi transkripsi setelah titik awal transkripsi pada fragmen restriksi BamHI, yaitu pada sisi kanan atau kiri titik awal transkripsi. Daerah BamHI-A merupakan fragmen yang terpanjang, selanjutnya disusul oleh fragmen BamHI-B. Gen BALF-2 adalah gen yang terletak pada sisi kiri kerangka baca kedua fragmen BamHI-A. Transkrip EBNA-LP berasal dari promoter Cp atau Wp pada daerah pengulangan ekson pada daerah BamHI-W (*W repeats*) yang ditranskripsikan pada periode Laten III. Transkrip EBNA1 yang berasal dari promotor Qp yang berlokasi pada daerah BamHI-Q yang ditranskripsikan pada periode Laten I dan II (Gambar 1.A). Protein LMP2 ditranslasi dari mRNA yang memotong daerah *terminal repeat* TR genom VEB sirkular yang dikenal sebagai *heterogenic region* (Nhet) (Gambar 1.B) untuk menghasilkan genom virus bentuk episomal (sirkular).¹³

Genom VEB bentuk linier yang berupa DNA untai ganda berukuran panjang sekitar 172 kpb dan mengandung 84 *open reading frame* (ORFs). Bentuk linear VEB terbentuk dari pemotongan segmen TR bentuk sirkular VEB. Sekuens DNA berulang terdiri dari TR dan *internal repeat* (IR). TR terdapat pada masing-masing ujungnya berukuran 0,5 kpb, sedangkan *internal repeat* (IR) berukuran 3 kpb. IR1 memisahkan genom menjadi sekuens unik panjang (*unique long* atau UL) dan sekuens unik pendek (*unique short* atau US) (Gambar 2). Selama siklus litik, genom VEB dilipat-gandakan sampai lebih dari 100 kali dan DNA VEB berbentuk intermedier berupa molekul

concatameric, selanjutnya terpotong-potong menjadi unit genom linier dan dikemas dalam nukleus virion.¹⁴



Gambar 1. Genom DNA VEB merupakan DNA untai ganda berbentuk episomal (A) atau berbentuk linier (B), dengan segmen oriP (*origin of plasmid replication*) dan oriLyt (*lytic replication*).¹³



Gambar 2. Skema diagram genom VEB linear. TR: *terminal repeat*; UL: *unique long*; US: *unique short*; IR1: *internal repeat 1*.¹⁰

Eksresi gen litik VEB

Pada fase *immediate-early* (IE) berlangsung transkripsi gen transaktivator replikasi virus yang berfungsi mengatur ekspresi baik gen virus. BZLF1 diketahui menjadi faktor transkripsi pertama yang akan berikatan dan mengaktifasi promotor gen BRLF1 yang termetilasi. Metilasi ekstensif pada gen transaktivator BRLF1 menyebabkan tidak terekspresinya gen BRLF1 pada infeksi laten.⁷ Rta (*BRLF1 transcriptional activator*) dan Zta (*BZLF1 transcriptional activator*) merupakan protein gen litik fase *immediate-early* dan aktivator transkripsi yang utama dalam siklus litik VEB. Pada permulaan replikasi VEB, Zta dan Rta melakukan autostimulasi terhadap ekspresinya, selanjutnya kedua protein tersebut saling mengaktifasi satu dengan lainnya dan

bekerja sama dalam menginduksi gen-gen litik fase *late*.¹⁵ Rta dapat bereaksi sendiri atau sinergis dengan Zta untuk menginduksi secara maksimal aktivasi beberapa promotor gen VEB yang sangat penting untuk replikasi VEB, yaitu gen BMLF1, BMRF1, BHRF1 dan DNA polimerase VEB. Rta diketahui pula berkontribusi terhadap onkogenesis KNF, terutama berkaitan dengan regulasi siklus sel. Rta diduga memfasilitasi pertumbuhan tumor, sehingga gen BRLF1 berkontribusi terhadap perkembangan KNF.¹⁶

Fase *early* mengekspresikan komponen replikasi DNA virus.⁷ Ekspresi gen litik *early* VEB jarang terjadi pada keganasan yang berasosiasi dengan VEB dan tidak berkontribusi terhadap proses onkogenesis, kecuali ekspresi gen BHRF1. Ekspresi gen litik *early* dapat diinduksi oleh perlakuan kimiawi, iradiasi dan aktivasi reseptor membran sel yang terinfeksi VEB pada siklus laten yang diperantarai oleh ekspresi protein transaktivator Zta. Gen BHRF1 diekspresikan dengan melimpah oleh promotornya sendiri pada daerah BamHI-H (Hp) selama fase *early* litik virus, tetapi tidak terdeteksi pada siklus laten virus. Transkrip BHRF1 predominan ditemukan pada sel B yang berasosiasi dengan VEB pada limfoma. Ekspresi BHRF1 kadang-kadang terdeteksi dalam kadar rendah pada KNF, penyakit Hodgkin dan sel T limfoma non-Hodgkin. Struktur dan fungsi protein BHRF1 homolog dengan protein anti-apoptosis bcl-2, sehingga mampu mencegah efek sitotoksik sel terinfeksi VEB oleh sel T sitotoksik. BHRF1 juga menyebabkan penghambatan diferensiasi sel dan menginduksi proliferasi sel epitel. Enzim yang terkait dengan gen litik *early* VEB dapat dijadikan target potensial obat antivirus, sehingga dapat diaplikasikan sebagai terapi tumor di masa depan.⁹ Gen-gen yang berperan penting dalam replikasi DNA VEB pada siklus litik dan replikasi DNA spesifik *oriLyt* adalah BZLF1, BALF5, BMRF1, BALF2, BBLF4, BSLF1 dan BBLF2/3. Semua protein gen litik *early* VEB bekerja sinergi pada garpu replikasi untuk mensintesis untai *leading* dan *lagging* genom VEB. Replikasi DNA VEB

tergantung pada ekspresi protein gen BZLF1, BRLF1 dan BSMLF1. Pada fase litik *late* VEB, genom VEB akan berlipat ganda dari 100 kali menjadi 1000 kali.¹⁷

Gen litik *late* VEB tereksresi ketika terbentuk sebagian besar protein struktur kapsul virus, tegumentum dan selubung virus.⁷ Pada fase *late* litik gen lestari (*conserved*) Herpesvirus mengekspresikan 5 protein kapsul, 5 protein selubung virus dan 10 protein tegumen. Gen litik *late* VEB adalah BCLF1, BDLF1, BFRF3, BORF1 dan BBRF1. Gen-gen ini mengekspresikan protein kapsul virus (MCP, mCP dan sCP), protein yang berikatan dengan mCP (mCPBP) dan protein portal. Protein tegumentum VEB diekspresikan antara lain oleh gen BPLF1, BOLF1, BVRF1, BGLF1, BGLF4, BGLF2, BBRF2, BSRF1, BGLF3 dan BBLF1.¹⁷ Antibodi yang bereaksi dengan kompleks antigen kapsul virus (*viral capsid antigen* atau VCA) merupakan marka diagnosis serologi terhadap infeksi VEB yang penting. Semua individu karier VEB mengembangkan antibodi terhadap protein *late* litik, seperti VCA-p18 (BFRF3) merupakan protein kapsul berukuran kecil, VCA-p40 (BdRF1) merupakan protein *scaffold* dan Gp125 (BALF4) merupakan protein membran inti. Gen-gen yang berfungsi membentuk glikoprotein VEB adalah BLLF1 (gp350/220) BALF4 (gB atau gp110), BXLF2 (gH atau gp85), BKRF2, BZLF2 (gp42), BILF2 (gp55/80 atau gp78), BDLF3 (gp150), BLRF1 (gp15), BBRF3 (gp84/113) dan BILF1 (gp64). Gen BLLF1 mengekspresikan glikoprotein selubung virion yang utama, yaitu Gp350/220 yang berlokasi pada Badan Golgi dan plasma membran. Peran Gp350/220 adalah memperantarai virion berikatan dengan CD21 pada sel B inang dan menjadi target utama dalam menetralkan respons antibodi.⁹ Oleh karena respons imun sel T dapat bereaksi dengan gp350/220 secara langsung, maka gp 350/220 merupakan komponen utama dalam vaksin VEB.¹⁷ Ekspresi gen BCRF1 mempunyai homologi tinggi dalam struktur dan fungsi IL-10 pada manusia (human IL-10 atau hIL-10). BCRF1 mampu menghambat respons

imun lokal terutama fungsi makrofag, sel NK dan produksi IFN- γ . Ekspresi IL-10 meningkat pada sebagian besar penyakit yang berasosiasi dengan VEB dan dapat dideteksi pada baik jaringan yang telah terinfeksi VEB maupun serum darah. Oleh karena itu, terdeteksinya ekspresi BCRF1 berkorelasi dengan prognosis penderita yang buruk dan ekspresi BCRF1 juga berkorelasi dengan ekspresi LMP1.⁹

Mekanisme induksi dan inhibisi siklus litik VEB

Induksi spontan replikasi virus lebih ditentukan oleh lingkungan intrasel plasma daripada faktor yang menyebabkan diferensiasi sel plasma dan XBP1 merupakan faktor diferensiasi transkripsi yang secara langsung menginduksi gen BZLF1. XBP1 dan PKD (protein kinase D) secara sinergi melakukan aktivasi transkripsi gen BZLF1 dan BRLF1.⁷ Replikasi litik dari galur sel yang terinfeksi secara laten dapat dilakukan dengan induksi antara lain menggunakan *anti-immunoglobulin antibody* (anti-IgG), aktivasi *transforming growth factor β* (TGF β) dan aktivasi sel T CD4⁺. Rangkaian aktivasi gen litik virus diawali oleh gen *immediate early*, kemudian diikuti oleh gen *early* dan gen *late*. Gen *immediate early* diinduksi melalui transduksi sinyal setelah aktivasi permulaan anti-IgG, TGF β , CD4⁺. Transkrip BZLF1 dan BRLF1 diekspresikan 30 menit setelah aktivasi dan selanjutnya berfungsi sebagai faktor transkripsi. BZLF1 mempunyai situs pengikatan pada beberapa promoter gen, yaitu *the lytic origin of replication* (oriLyt), promoter BZLF1 sendiri (Zp) dan juga mengaktivasi gen BRLF1. Baik BZLF1 dan BRLF1 diperlukan untuk aktivasi gen *early*.¹⁰ Transisi dari siklus laten menuju siklus litik VEB dapat diinduksi oleh bahan perusak DNA, seperti kemoterapi (cisplatin), radiasi sinar- γ , phorbol ester, sodium butirat dan bortezomid. Pada induksi dengan cisplatin dan irradiasi sinar γ , BRLF1 merupakan mediator yang lebih dominan daripada BZLF1 dalam transisi dari siklus laten menjadi litik pada KNF. BRLF1 sendiri juga

mampu menggagalkan kondisi laten VEB dan menginduksi ekspresi gen *late* litik BMRF1 pada infeksi dengan adenovirus pada galur sel KNF. Baik BRLF1 dan BZLF1 berperan sama penting pada induksi dengan phorbol ester dan sodium butirat. Bortezomid dapat mengaktivasi ekspresi gen litik virus, sehingga akan tampak gambaran keganasan positif VEB secara *in vivo*.¹⁸ Setelah BZLF1 dan BRLF1 teraktivasi, maka berlangsung serangkaian ekspresi gen litik fase *early* yang berperan dalam replikasi virus dan gen litik fase *late* yang berperan dalam sintesis DNA maupun komponen virion.⁷

Nuclear factor-Y (NF-Y) adalah faktor transkripsi yang mempunyai peranan sebagai mediator yang penting dalam regulasi ekspresi gen BRLF1 dan BZLF1 yang diinduksi radiasi dan cisplatin dimanifestasikan dengan peningkatan ekspresi gen BRLF1 dan BZLF1. NF-Y diperkirakan terdapat pada 30 persen promoter genom manusia.¹⁸ Protein LF2 merupakan faktor transkripsi yang dibentuk oleh gen LF2 yang dapat berikatan dengan Rta dan berfungsi menghambat Rta. Penghambatan Rta oleh LF2 dapat terjadi baik pada sel B maupun sel epitel dan menyebabkan penurunan 60-90% fungsi promoter BALF2, BMLF1 dan BMRF1. Penurunan aktivitas Rta melalui dua mekanisme yaitu pertama, pengikatan faktor-faktor transkripsi dengan DNA berkurang dan gangguan aktivasi transkripsi dengan aktivasi keasaman daerah Rta; kedua, koekspresi LF2 menginduksi modifikasi Rta oleh *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) 2 dan 3. Ekspresi LF2 yang tinggi akan menghentikan aktivitas litik virus pada sel terinfeksi VEB yang diinduksi dengan Rta atau Zta. Oleh karena itu, LF2 berpotensi sebagai inhibitor replikasi VEB.¹⁹

Metode diagnosis ekspresi transkrip gen VEB

Uji mRNA *in situ hybridization* (RISH) merupakan teknik sensitif mendeteksi mRNA EBER 1/2 pada semua sel tumor yang mengandung VEB. Teknik RISH digunakan terutama untuk menganalisis ekspresi mRNA pada sel tunggal.

Pada saat ini, teknik EBER RISH ini merupakan teknik yang paling baik untuk deteksi morfologi VEB pada sampel klinis.⁹ Deteksi ekspresi transkrip (mRNA) gen VEB yang dulu lazim digunakan adalah teknik *Northern Blotting* (NB). Sekarang deteksi mRNA gen VEB dengan teknik *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR), karena teknik ini lebih sensitif untuk mendeteksi mRNA yang mengalami proses pembuangan intron (*spliced* mRNA) dalam jumlah kecil dan memerlukan lebih sedikit jumlah sampel klinis. Teknik *multiprime* RT-PCR adalah penggunaan secara simultan primer transkrip gen target dikombinasikan dengan primer transkrip gen *house-keeping* sebagai kontrol internal pada RT-PCR. Teknik ini lebih efisien digunakan untuk biopsi jaringan limfoma dengan jumlah sedikit dan menghasilkan kualitas kontrol yang lebih baik. Pada sampel klinis, kuantitas RNA perlu diukur terlebih dahulu sebelum dianalisis RT-PCR dengan teknik gel elektroforesis RNA untuk mendeteksi 18S/28S RNA.⁹ Teknik *multiprime* RT-PCR digunakan untuk mendeteksi secara simultan ekspresi mRNA VEB, yaitu EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2A, LMP2B, BZLF1, BARTs dan U1A snRNP (*housekeeping gene*).²⁰ Teknik *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) juga digunakan untuk mengukur peningkatan atau penurunan ekspresi mRNA gen litik VEB dan gen GAPDH (*housekeeping gene*) digunakan sebagai kontrol internal proses PCR, seperti pengukuran ekspresi mRNA pada gen BRLF1 dan BZLF1.¹⁹ *Nucleic acid sequence based amplification* (NASBA) saat ini terutama digunakan untuk mendeteksi amplifikasi mRNA VEB yang tidak mengalami proses pembuangan intron (*non-spliced* mRNA), seperti BCRF1 (vIL-10) dan BARF1.⁹

DISKUSI

Infeksi virus Epstein-Barr (VEB) merupakan faktor etiologi KNF yang terpenting. Infeksi VEB telah terbukti sebagai penyebab utama timbulnya KNF, terutama KNF WHO-IIB (*undifferentiated carcinoma*) yang sangat konsisten terhadap infeksi VEB.⁵ Pada KNF WHO-IIB, ekspresi

mRNA BRLF1 hanya terdeteksi spesifik pada spesimen biopsi KNF yaitu 4 dari 7 spesimen biopsi KNF, sedangkan ekspresi mRNA gen litik lain (BZLF1, BALF2 dan BCLF1) dapat pula terdeteksi pada limfosit darah tepi dan spesimen biopsi KNF baik pada penderita KNF maupun individu normal.¹⁶ Oleh karena, mRNA BRLF1 spesifik terdeteksi pada spesimen biopsi tumor penderita KNF, maka mRNA BRLF1 berpotensi digunakan untuk menegakkan diagnosis KNF.

Aktivasi VEB berupa transisi dari galur sel yang terinfeksi secara laten menjadi litik dapat menggunakan *anti-immunoglobulin antibody* (anti-IgG), aktivasi *transforming growth factor β* (TGF β) dan aktivasi sel T CD4⁺.¹⁰ Di samping itu, aktivasi VEB dapat pula disebabkan oleh bahan perusak DNA seperti kemoterapi (cisplatin), radiasi sinar- γ , phorbol ester, sodium butirat dan bortezomid.¹⁸ Transisi siklus laten menjadi siklus litik ditandai dengan aktivasi gen litik *immediate early* yang mengawali serangkaian aktivasi gen litik VEB berupa ekspresi transkrip gen BZLF1 dan BRLF1 aktivasi VEB dan selanjutnya berfungsi sebagai faktor transkripsi.¹⁰ Oleh karena itu, BRLF1 dan BZLF1 berperan penting sebagai mediator transisi siklus laten menuju siklus litik.

Nuclear factor-Y (NF-Y) adalah faktor transkripsi yang mempunyai peranan sebagai mediator yang penting dalam regulasi ekspresi gen BRLF1 dan BZLF1 yang diinduksi radiasi dan cisplatin dimanifestasikan dengan peningkatan ekspresi gen BRLF1 dan BZLF1. Pengukuran peningkatan ekspresi mRNA gen BRLF1 dan BZLF1 dilakukan dengan teknik *real-time RT-PCR* atau kuantitatif RTpPCR (qRT-PCR). Pada pemberian cisplatin dan radiasi (15 Gy) setelah 72 jam menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA BRLF1 dari 4,3 kali rerata menjadi 7,9 kali rerata dan peningkatan ekspresi mRNA BZLF1 dari 4,0 kali rerata menjadi 7,5 kali rerata. BRLF1 berperan lebih dominan daripada BZLF1 pada induksi dengan cisplatin dan radiasi sinar γ .¹⁸ Dengan demikian, aktivasi VEB berupa transisi siklus laten menjadi siklus litik VEB dapat

diinduksi dengan kemoterapi dan radioterapi yang ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan ekspresi kedua gen litik *immediate-early* VEB.

Aktivasi VEB setelah radiasi (15 Gy) dan pemberian cisplatin berperan pula pada peningkatan kadar konsentrasi DNA VEB bebas dalam plasma/serum. Di samping itu, aktivasi VEB juga terjadi setelah induksi dengan phorbol ester dan sodium butirat. Radioterapi dan kemoterapi dapat pula menginduksi ekspresi gen litik *late* VEB BXL1, yaitu suatu analog timidin kinase virus Herpes simplex. Gen BXL1 berperan dalam fosforilasi obat antivirus ganciclovir (GCV), sehingga menghasilkan analog nukleosida yang bersifat toksik pada VEB. Aplikasi klinis terapi kombinasi GCV dengan radioterapi dan kemoterapi telah terbukti mengakibatkan peningkatan sitotoksitas dan penurunan progresivitas tumor dibandingkan dengan radioterapi dan/atau kemoterapi saja.¹⁸ Oleh karena itu, metode terapi berbasis siklus litik virus berpotensi menjadi metode baru yang prospektif dalam aplikasi klinis untuk mengatasi kemungkinan terjadi rekurensi tumor pada penderita KNF.

Sebagai ringkasan, dapat dikemukakan bahwa KNF tidak berdiferensiasi (WHO KNF tipe IIB-2005) sangat konsisten terhadap infeksi virus Epstein-Barr (VEB). Replikasi VEB pada epitel nasofaring berimplikasi pada dua reaksi seluler, yaitu siklus litik dan laten VEB. Gen BZLF1, BRLF1, BALF1 dan BCLF1 adalah gen litik VEB yang penting pada perkembangan KNF. Siklus litik VEB terbagi menjadi tiga fase ekspresi gen yaitu *immediate-early*, *early* dan *late*. Pada fase *immediate-early* ekspresi gen BZLF1 dan BRLF1 diperlukan untuk menginduksi seluruh rangkaian gen-gen lain pada periode litik, yaitu gen litik *early* dan *late*. Transisi sel tumor dari siklus laten menjadi siklus litik VEB dapat terjadi baik secara spontan maupun induksi. Pada siklus litik VEB aktivasi gen *immediate early* dari siklus laten menjadi siklus litik juga dapat diinduksi oleh bahan perusak DNA, antara lain bahan kemoterapi (cisplatin), radiasi sinar γ , phorbol ester, sodium butirate dan bortezomid. Induksi siklus litik VEB

pada KNF dengan cisplatin dan radiasi sinar- γ dimanifestasikan dengan peningkatan mRNA BRLF1 dan BZLF1 yang menunjukkan terjadi reaktivasi VEB. Reaktivasi VEB secara *in vivo* berkorelasi dengan peningkatan progresivitas tumor dan mempercepat tercapainya stadium lanjut tumor. Metode yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA gen *immediate-early* VEB BRLF1 dan BZLF1 adalah teknik RT-PCR yang spesifik untuk mendeteksi transkrip mRNA yang mengalami proses pembuangan intron (*spliced* mRNA) dan teknik *real time* RT-PCR untuk mengukur kuantitas mRNA kedua gen tersebut.

Pendekatan terapi KNF berbasis siklus litik VEB dengan radioterapi dan kemoterapi yang dikombinasikan dengan pemberian gancilovir (GCV) terbukti telah menyebabkan peningkatan sitotoksitas dan penurunan progresivitas tumor. Terapi berbasis litik virus ini terutama bermanfaat untuk mengatasi kemungkinan terjadi rekurensi tumor pada penderita KNF. Dengan demikian ekspresi gen litik *immediate-early* VEB pada biopsi tumor KNF memberikan informasi klinis dasar yang lebih akurat untuk diagnosis dan terapi KNF.

DAFTAR PUSTAKA

- Mutirangura A. Molecular mechanism of nasopharyngeal carcinoma development. *Res Advance Res Updated Med* 2000; 1:18-27.
- Roezin A, Adham M. Karsinoma nasofaring. Dalam: Soepardi EA, Iskandar N, Bashiruddin J, Restuti RD, eds. Buku ajar ilmu kesehatan: telinga hidung tenggorok kepala dan leher. Edisi keenam. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2007.
- Chan ATC, Teo PML, Johnson PJ. Nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1007-15.
- Soeripto. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Berita Kedokteran Masyarakat* 1998; XIII:207-11.
- Steven SJC, Verkuijlen SAWM, Hariwiyanto B, Harijadi, Paramita DK, Fachiroh J, et al. Noninvasive diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: nasopharyngeal brushing reveal high Epstein-Barr virus (VEB) DNA load and carcinoma-specific viral BRLF1 mRNA. *Int J Cancer* 2006; 119:608-14.
- Thompson LDR. Update on nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol* 2007; 1:81-6.
- Cacais AOG. Immunological consequences of Epstein-Barr virus replication. Dissertation. Sweden: Department of Microbiology Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm; 2008. p. 4.
- Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(10):757-68.
- Middeldorp JM, Brink AATP, van den Brule AJC, Meijer CJLM. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (VEB) gene products in VEB-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45:1-36.
- McAulay KA. Studies on immune regulation of Epstein-Barr virus. PhD Thesis School of Biomedical Science. University of Edinburg 2008.
- Dolan A, Addison C, Gatherer D, Davison AJ, McGeoch DJ. The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. *Virology* 2006; 350:164-70.
- Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 195:474-82.
- Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3:1-20.
- Kudoh A, Fujita M, Zhang L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, et al. Epstein-Barr virus lytic replication elicit ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* 2005; 280(9):8153-6.
- Chang Y, Chang SS, Lee HH, Doong SL, Takada K, Tsai CH. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gene Virol* 2004; 85:1371-9.
- Feng F, Ren EC, Liu D, Chan SH, Hu H. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potensial use in diagnosis. *J Gen Virol* 2000; 81:2417-23.
- Alto SM. Modern diagnosis of Epstein-Barr virus infections and post-transplant lymphoproliferative disease. PhD Thesis. Finland: University of Helsinki; 2007. ISBN 978-952-10-3823-5. p. 19-20.
- Chia MC, Leung A, Krushel T, Alajez NM, Lo KW, Busson P, et al. Nuclear factor-Y and Epstein Barr virus in nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:984-94.
- Calderwood MA, Holthaus AM, Johannsen E. The Epstein-Barr virus LF2 protein inhibits viral replication. *J Virol* 2008; 82(17):8509-19.
- Steven SJC, Verkuijlen SAWM, Middeldorp JM. Quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in clinical specimens by rapid real-time PCR targeting a highly conserved region of EBNA-1. *Methods Mol Biol* 2005; 292:15-26.