



Protein kelompok BCL-2 sebagai target senyawa antikanker

BCL-2- family proteins as target of anticancer drug

Rumiyati

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy Gadjah Mada University, Yogyakarta

KEYWORDS tumor suppressor genes; apoptosis; target; anticancer-drug

ABSTRACT Recently, the mortality rate due to cancer has been increasing. This fact and the problem of cancer treatment in particular encourages the exploration of new alternative anticancer drugs from natural resources. The discovery of the new drugs requires explanation on their targets and mechanism of action. So far, in addition to alteration in the expression of proteins regulating apoptosis, some cancers demonstrate the presence of mutations in the tumor suppressor genes such as p53. These abnormalities would result in the destruction of apoptosis. Among targets of anticancer drugs through the modulation of apoptosis are BCL-2 family proteins which are able to release cytochrome c necessary for caspase activation. Anticancer drugs can stimulate the modulation of apoptosis on BCL-2 family targets by the modulation of oncogenes that can enhance the expression of tumor suppressor genes which in turn influence the expression of pro-apoptosis or anti-apoptosis proteins.

Pencarian obat antikanker dari alam semakin meningkat, hal ini disebabkan semakin banyaknya kasus kanker dan adanya beberapa kelemahan obat antikanker yang sudah ada (Gibbs, 2000). Langkah-langkah diperlukan untuk pencarian obat tersebut, diantaranya adalah isolasi dan identifikasi senyawa aktif antikanker dan penelusuran mekanisme aksinya (Hartati, 2003).

Mekanisme aksi suatu obat sangat penting untuk menjelaskan bagaimana suatu obat bekerja. Mekanisme aksi beberapa obat antikanker telah diketahui diantaranya sebagai senyawa pengalkil yang mempunyai target molekul berupa DNA atau sebagai senyawa antimetabolit yang dapat menghambat jalannya metabolisme yang penting seperti sintesis asam folat. Selain itu ada mekanisme lain yang diketahui dapat menghambat proses proliferasi sel yang dikelompokkan ke dalam *cell cycle-specific* (CCS) seperti vinkristin dan vinblastin. Obat-obat ini dapat bekerja sebagai antiproliferatif (Mulyadi, 1998).

Penelusuran mekanisme yang lain yang diharapkan dapat memperbaiki sistem sel kanker yang secara fisiologis mengalami penghambatan apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2000) yakni dengan pemacuan apoptosis. Pemacuan apoptosis merupakan salah satu mekanisme yang mungkin diperoleh dari senyawa bahan alam. Senyawa antikanker dari bahan alam diharapkan mampu mempengaruhi ekspresi protein kelompok BCL-2 yang merupakan protein penting dalam pengaturan apoptosis.

MEKANISME APOPTOSIS

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram. Apoptosis mempunyai peran penting dalam menjaga homeostatis perkembangan sel pada organisme multiseluler. Secara garis besar ada dua jalur proses terjadinya apoptosis sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 1 (Schmitz, *et al.*, 2000 cit Antonsson, 2001):

1. lewat jalur *death receptors* pada permukaan sel (jalur ekstrinsik), dan
2. lewat jalur mitokondria (jalur intrinsik).

Pada jalur ekstrinsik, proses apoptosis diinisiasi oleh anggota *death receptor* seperti anggota *tumour-necrosis factor* (TNF), Fas dan TRAIL-R1. Jalur yang kedua yang akan dibahas secara detail, yakni kematian sel yang diinisiasi lewat jalur mitokondria. Kematian ini diregulasi oleh anggota kelompok BCL-2. Anggota kelompok BCL-2 dapat dipisahkan menjadi 2 yakni yang bersifat anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, MCL1, NR-13) dan pro-apoptosis (BAX, BAK, HRK, DP5, BID, BAD, Noxa, PUMA). Kemoterapi, radiasi dan stimulus yang lain dapat menginisiasi apoptosis lewat jalur ini, dimana sebagai mediator signal adalah protein pro-apoptosis seperti Bax, Bid, Bad atau Bim. Aktivasi lewat jalur mitokondria ini

Correspondence:

Rumiyati, MSi, Ap, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy Gadjah Mada University, Yogyakarta, Bulaksumur, Yogyakarta, HP: 0816689011.

akan menyebabkan pengeluaran *cytochrome c* (*Cyt c*) ke sitosol dan selanjutnya akan berikatan dengan *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (APAF1) untuk membentuk apoptosome. Apoptosome ini akan mengaktifkan *pro-caspase-9* menjadi *caspase-9*. *Caspase-9* selanjutnya akan mengaktifkan *executioner caspase* yang akan memotong "death substrates" seperti lamin. Kematian lewat jalur ini dapat dihambat oleh protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-X_L. (Hengartner, 2000; Burlacu, 2003; Antonsson, 2001).

PERAN PROTEIN KELOMPOK BCL-2 DALAM PROSES APOPTOSIS

Seperti dijelaskan di atas bahwa yang menjadi kunci utama di dalam proses apoptosis melalui jalur mitokondria adalah terjadinya aktivasi *caspase* (*caspase cascade*). Aktivasi ini diregulasi oleh protein kelompok BCL-2 yang berperan di dalam mempengaruhi permeabilitas mitokondria untuk pelepasan *cytochrome c*.

Protein pro-apoptosis dikelompokkan menjadi dua kelompok yakni protein multidomain yang mempunyai domain BH1-3 seperti Bax, Bak, Bok dan protein *BH3 domain only* yang mengandung domain BH3 saja seperti Bid, Bim, Bik, Bad, Bik, Hrk, Nix, Noxa dan PUMA (Antonsson, 2001; Burlacu, 2003).

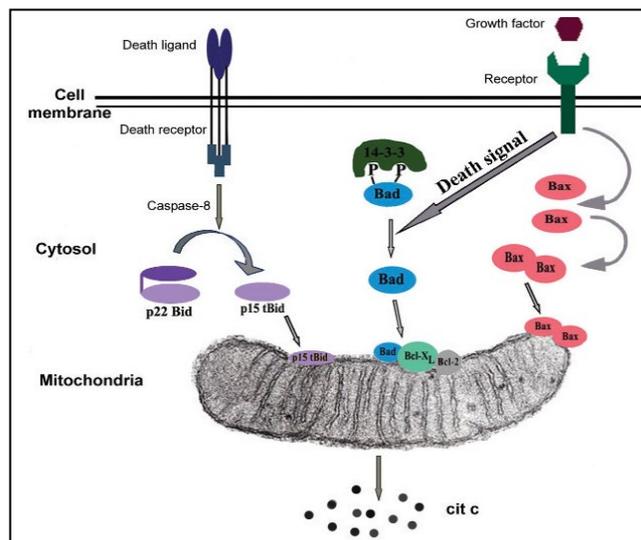
Aktivasi protein pro-apoptosis

Khemoterapi dapat menstimulasi sel untuk terjadinya apoptosis. Pada jalur mitokondria, protein

pro-apoptosis diaktivasi sehingga memudahkan pelepasan *cytochrome c*. Zat ini penting di dalam aktivasi *caspase* seperti dijelaskan di atas.

Aktivasi protein pro-apoptosis dapat terjadi dengan jalan membentuk homodimer diantara protein pro-apoptosis itu sendiri. Homodimerisasi antara protein Bax akan dapat membentuk *channel* yang akan dapat dilalui oleh *cyt.c*, sedangkan heterodimerisasi antara protein anti-apoptosis seperti BCL-2 dan pro-apoptosis seperti Bax justru akan dapat menghilangkan fungsi pro-apoptosis dari protein Bax (Sato *et al.*, cit Antonsson, 2001).

Dalam pembentukan heterodimer dengan anggota protein kelompok BCL-2 lainnya, domain heliks BH3 pada ujung C (hidrofobik) protein memegang peran yang penting. Domain BH3 suatu protein dapat berikatan dengan *pocket hydrophobic* yang dibentuk oleh domain BH1, BH2 atau BH3 protein lainnya (Hengartner, 2000). Sebagai contoh di sini di dalam pembentukan kompleks Bcl-X_L- Bak, heliks BH3 protein Bak berfungsi sebagai donor dan Bcl-X_L berfungsi sebagai aseptor. Untuk terjadinya interaksi ini protein Bak harus berubah konformasinya terlebih dahulu, dan perubahan tersebut distimuli oleh adanya signal kematian. Pembentukan heterodimer ini akan berakibat hilangnya fungsi anti-apoptosis dari protein anggota kelompok BCL-2 (Burlacu, 2003).



Gambar 1. Model signaling apoptosis yang melibatkan anggota kelompok BCL-2 (Burlacu, 2003).

Protein Bid dapat diaktifkan oleh adanya sinyal kematian Fas. Sinyal kematian Fas ini akan mengaktifkan *caspase 8*, dan *caspase* ini akan memo-

tiong secara enzimatik protein Bid untuk menghasilkan protein dengan ujung C (tBid) yang dapat bertranslokasi ke mitokondria (Gross, *et al.*, 2000).

Domain BH3 protein tBid di dalam mitokondria akan berinteraksi dengan protein Bax yang sudah diaktifkan di dalam mitokondria (Burlacu, 2003). Hal ini akan menyebabkan protein Bax dapat membentuk oligomer. Oligomer Bax inilah yang diketahui bertanggungjawab terhadap pembentukan lorong yang akan dapat dilalui oleh *cytochrome c* (Roucou *et al.*, 2002^a).

Dengan cara yang sama protein tBid juga dapat menginduksi oligomerisasi protein pro-apoptosis lainnya yakni Bak yang secara normal telah berada di mitokondria. Pada penelitian terakhir dapat ditunjukkan bahwa antar tBid sendiri juga dapat membentuk oligomer di dalam mitokondria dan oligomer ini ternyata juga dapat dilalui oleh *cytochrome c* (Roucou *et al.*, 2002^b). Oligomerisasi antar protein ini diketahui dihambat oleh protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-x_L.

Mekanisme lain didalam pengaktifan protein pro-apoptosis adalah dengan cara fosforilasi protein. Sebagai contoh di sini adalah protein Bad, anggota kelompok protein "BH3 domain only" dapat difosforilasi pada residu serin, ser-112 dan ser-136. Dalam kondisi adanya signal survival, Bad difosforilasi di sitosol pada residu serin tersebut. Hal ini akan menyebabkan protein Bad berasosiasi dengan protein 14-3-3 yang akan menyebabkan fungsi pro-apoptosis protein Bad hilang. Sebaliknya dalam kondisi adanya sinyal kematian, protein Bad akan didefosforilasi. Protein non fosforilasi dapat bertranslokasi ke membran mitokondria dan akan berasosiasi dengan heterodimer BCL-x_L dan BCL-2, sehingga protein Bad yang nonfosforilasi ini dapat menetralkan aktivitas antiapoptosis BCL2-BCL-x_L (Antonsson, 2001; Burlacu, 2003). Domain BH3 protein Bad nonfosforilasi penting untuk terjadinya interaksi dengan heterodimer BCL-x_L dan BCL-2. Dengan demikian defosforilasi Bad akan menyebabkan protein Bad aktif sebagai pro-apoptosis dan sebaliknya fosforilasi Bad akan menyebabkan protein Bad inaktif (Gambar 1) (Burlacu, 2003).

Protein anggota "BH3 domain only" yang lain seperti Bik juga dapat difosforilasi. Fosforilasi ini akan dapat mengurangi aktivitas pro-apoptosisnya seperti halnya protein Bad (Verma *et al.*, 2000 cit Antonsson, 2001).

Scorrano dan Korsmeyer (2003), melaporkan bahwa protein multidomain seperti Bax dan Bak yang berinteraksi dengan protein VDAC atau ANT (Adenine Nucleotide Exchanger) akan dapat mempengaruhi transisi permeabilitas mitokondria yang erat kaitannya dengan pembukaan *channel* yang dapat dilalui *cytochrome c*.

Noxa, suatu protein pro-apoptosis, dapat ditranslokasikan ke mitokondria, dan disini protein tersebut akan dapat mengikat suatu anti-apoptosis, protein Bcl-2.

Anggota "BH3 domain only" lainnya seperti PUMA juga diatur oleh gen p53 (Nakano and Vousden 2001). Ekspresi PUMA juga dapat mempromosikan Bax untuk translokasi ke mitokondria dan membentuk oligomer (Haupt *et al.*, 2003). PUMA dapat berikatan dengan Bcl-2 dan Bcl-X_L melalui domain BH3 dan memediasi pelepasan *cytochrome c* (Chang, 2002).

Inaktivasi protein pro-apoptosis oleh protein anti-apoptosis

Berdasarkan penelitian Yi *et al.* (2003), apoptosis yang diinduksi oleh protein Bid dapat dihambat oleh protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-x_L. Penghambatan Bcl-2 pada apoptosis yang diinduksi oleh protein Bid tersebut diketahui tanpa melalui penghambatan pemecahan protein Bid oleh *caspase 8* yang menghasilkan tBid.

Protein Bcl-2, suatu antiapoptosis, menghambat apoptosis pada jalur mitokondria yakni dengan cara menekan penyisipan /translokasi protein tBid ke dalam mitokondria; Bcl-2 juga dapat menghambat translokasi Bax dari *cytosol* ke mitokondria; Bcl-2 dapat mengurangi oligomerisasi protein Bax/Bak yang diinduksi oleh Bid.

Protein p53 dan apoptosis

p53 merupakan gen represor tumor yang penting dalam pengaturan apoptosis. Protein p53 berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang meregulasi ekspresi beberapa protein pro-apoptosis (Bax, Noxa, PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bid maupun anti-apoptosis. Aktivasi ini dapat terjadi setelah adanya stimulasi kemoterapi, radiasi atau stress. Ketergantungan aktivasi Bax oleh p53 ini sangat tergantung oleh jenis sel (Chong *et al.*, 2000 cit Haupt *et al.*, 2003). Diketahui di dalam sel tumor yang kehilangan fungsi gen p53, ditemukan adanya ekspresi Bax yang rendah. Akan tetapi ada beberapa sel yang dapat mengalami kenaikan ekspresi protein Bax tanpa adanya pengaruh p53 (*p53-independent*) (Basu and Haldar, 1998).

Di sisi lain, transkripsi gen Bid juga diatur oleh gen p53 sebagai respon adanya radiasi sinar γ dan dilaporkan bahwa peningkatan mRNA Bid berkorelasi dengan peningkatan protein Bid (Haupt *et al.*, 2003). Protein p53 diketahui juga dapat menekan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 (Perego *et al.*, 1996 cit Hong *et al.*, 2000). Hal ini ditun-

jukkan pada sel yang kekurangan Bcl-2, ternyata terjadi overekspresi protein p53 (Poliseno *et al.*, 2002).

Beberapa senyawa antikanker dari alam dengan target protein kelompok BCL-2.

Diketahui pada beberapa kasus kanker, telah terjadi mutasi gen represor tumor, overekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan atau penurunan protein pro-apoptosis seperti Bax.

Berdasarkan uraian di atas dapat dijelaskan bahwa suatu senyawa dapat berfungsi sebagai anti-kanker dengan target protein kelompok BCL-2 apabila senyawa tersebut dapat mempengaruhi ekspresi protein baik pro-apoptosis maupun anti-apoptosis. Pengaruh senyawa terhadap ekspresi protein pro-apoptosis (Bax, Noxa, PUMA) dapat tergantung pada protein p53 atau tidak tergantung p53.

Berikut adalah beberapa contoh senyawa alam yang sudah diteliti mempunyai aktivitas sebagai pemacu apoptosis. Kurkumin salah satu senyawa dari bahan alam yang diketahui dapat memacu apoptosis dengan beberapa cara, antara lain dengan menekan ekspresi protein Bcl-2, meningkatkan ekspresi protein p53 dan meningkatkan ekspresi protein Bax (Chen dan Huang, 1998).

Allylsulfur yang diekstraksi dari bawang putih diketahui juga dapat meningkatkan tingkat ekspresi protein p53, protein proapoptosis seperti Bax dan menurunkan tingkat ekspresi protein antiapoptosis seperti Bcl-2 pada *non small cell lung cancer cell lines* (NSCLC) (Hong *et al.*, 2000).

Genistein, suatu isoflavon yang diperoleh dari biji kedelai, dapat menginduksi apoptosis pada kultur sel kanker payudara yakni dengan cara meningkatkan ekspresi protein Bax. Diketahui bahwa induksi ini tak tergantung pada protein p53 (p53-independent) (Surh, 2003; Santell *et al.*, 2000).

Camelliin B, suatu makrosiklik ellagitanin, yang diekstraksi dari *Gordonia axillaris* dapat memacu apoptosis pada kultur sel Hela (Wang *et al.*, 2001). Senyawa aktif dari sumber alam lainnya kemungkinannya masih sangat banyak.

PENUTUP

Penemuan obat kemoterapi dengan target protein kelompok BCL-2 dapat didasarkan pada kemampuan senyawa dalam menaikkan ekspresi protein *tumor suppressor*, menaikkan ekspresi protein pro-apoptosis, menurunkan protein anti-apoptosis atau berpengaruh dalam aktivasi beberapa protein pro-apoptosis.

KEPUSTAKAAN

- Antonsson B 2001. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondria, *Cell Tissue Res*, 306:347-361
- Basu A and Haldar S 1998. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death, *Molecular Human Reproduction*, Vol. 4. No. 12 pp.1099-1109.
- Burlacu A 2003. Regulation of Apoptosis by Bcl-2 family proteins (Review), *J.Cell.Mol.Med.*, Vol. 7, No.3, p 249-257
- Chen HW and Hann SR 1998. Effect of Curcumin on Cell Cycle Progression and Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells, *Br. J. Pharmacol*, Jul ; 24 (6): 1029 - 1040
- Chang NS 2001. A Potential Role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (Review), *International Journal of Molecular Medicine*, 9:19-24
- Gross A 2000. The Role of Bcl-2 family members in apoptosis, ata.gross@weizmann.ac.il
- Gibbs JB 2000. Anticancer drug targets: growth factors and growth factors signaling, *J. Clin. Invest*, 105, 9 - 13
- HongYS, Ham YA, Choi J and Kim J 2000. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines, *Experimental and Molecular Medicine*, Vol.32, No. 3, 127-134
- Hengartner MO 2000. Insight review articles: The Biochemistry of Apoptosis, *Nature*, Vol 407, 770-776
- Hanahan D and Weinberg RA 2000. The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100: 57-70
- Haupt S, Berqer M, Goldbere Z, Haupt Y 2003. Apoptosis-the p53 network, *Journal of Cell Science*, 116, 4077-4085
- Mulyadi 1998. Karsinogen, Karsinogenesis dan Antikanker, Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Madya pada Fakultas Farmasi universitas Gadjah Mada
- Poliseno L, Mariani L, Collecchi P, Piras A, Zaccaro L and Rainaldi G 2002. Bcl-2-negative MCF7 cells overexpress p53: implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs, *Cancer Chemother Pharmacol*, 50:127-130
- Roucou X, Rostovtseva T, Montessuit S, Martinou JC, Antonsson B 2002a. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposome, *Biochem J.*, 363, 547-552
- Roucou X, Montessuit S, Martinou JC, Antonsson B 2002b. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein, *Biochem J.*, 368, 915-921
- Scorrano L and Korsmeyer SJ 2003. Mechanism of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family member, *Biochemical and Biophysical research Communication*, 304, 437-444
- Santell RC, Kieu N, Helferich WG 2002. Genistein Inhibits Growth of Estrogen-Independent Human Breast Cancer Cells in Culture but not in athymic Mice, *Bochemical and Molcular Action of Nutrients*, p 1665-1669.

Surh YJ 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals, *Nature Reviews*, Vol. 3 no. 10.

Wang CC, Chen L, Yang L 2001. Camelliin B induced apoptosis in HeLa cell line, 2001, Vol. 168, p. 231 - 240

Wahyuningsih MSH, Mubarika S, Ganjar IG, Wahyuono 2003. Pencarian Senyawa Antikanker dari Bahan

Alam, *Majalah Obat Tradisional*, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Yi X, Yin XM, Dong Z 2003. Inhibition of Bid-induced Apoptosis by Bcl-2, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.278, No.19, 16992-16999.