

ADH-1 Suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression

Yasushi Shintani, Yuri Fukimoto, Nina Chaika, Paul M. Grandgenett, Michael J. Wheelock, and Keith R. Johnson

Abstrak

Kanker pankreatik merupakan salah satu penyakit yang memiliki agresivitas cukup tinggi untuk menginvasi jaringan lain. Peneliti telah menemukan bahwa N-cadherin menduduki peran penting dalam perkembangan tumor dan metastase dalam kanker pancreatic. Pada penelitian ini, telah dilakukan pengujian dengan menggunakan N-cadherin- blocking peptide (ADH-1) yang diduga dapat mencegah N-cadherin melakukan fungsinya dalam perkembangan kanker pankreas pada hewan tikus. Untuk melihat dampak dari ADH-1 terhadap penyebaran dan perpindahan sel yang menjadi medium N-cadherin pada kolagen telah diujikan menggunakan sel kanker pankreatik. Juga telah diuji pengaruh ADH-1 dalam proses apoptosis sel. Selanjutnya, dilakukan pengujian menggunakan perlakuan in vivo pada hewan dengan cara penyuntikkan orthotopic berisi N-cadherin pada sel BxPC-3 dengan atau tanpa pemberian ADH-1. Sel BxPC-3 dan Capan-1 memperlihatkan peningkatan ekspresi N-cadherin pada kolagen I. Peningkatan N-cadherin menyebabkan pergerakan dan perpindahan sel pada kolagen I. ADH-1 mencegah hal ini supaya tidak terjadi, tanpa menghambat penambahan N-cadherin. TUNEL assays dan immunoblots untuk caspase-3 menunjukkan bahwa ADH-1 menyebabkan terjadinya apoptosis dalam konsentrasi tertentu dan jumlah N-cadherin tertentu dalam sel kanker pancreatic. ADH-1 telah terbukti dapat mereduksi secara signifikan pertumbuhan tumor dan metastasi pada paru-paru tikus yang juga menjadi model kanker pankreatik. Sebagai anti N-cadherin, ADH-1 memiliki aktivitas yang cukup signifikan dalam menekan ekspresi N-cadherin dalam sel secara in vitro dan dalam model orthotopic tikus untuk model sel kanker pankreatik, meningkatkan kemungkinan penggunaannya sebagai anti N-cadherin pada terapi pengobatan kanker pankreatik pada manusia.

Key word : N-cadherin; ADH-1; lawan N-cadherin; kanker pankreatik; invasi tumor

Pendahuluan

Kanker pancreas merupakan pembunuh nomor 4 pada pria dan wanita di Amerika Serikat. Hampir semua penderita kanker pankreatik mengalami metastasi dan meninggal dunia. Sekitar 15-20% mengalami resectable disease, tetapi hanya 20% dari mereka yang bertahan hidup selama 5 tahun. Kemoterapi dan terapi radiasi tidak terlalu banyak membantu kemampuan bertahan hidup pasien. Jadi diperlukan strategi lain untuk melakukan terapi guna mengatasi hal ini.

Suatu hal mendasar yang harus diperhatikan dalam pengobatan kanker adalah metastasi kanker dimanapun dia berada, termasuk pada kanker pankreatik. Invasi dan metastasi merupakan rangkaian proses yang rumit, dan beberapa fase diantaranya masih belum diketahui mekanismenya. Satu fokus dari lab dimana peneliti bekerja adalah memahami peranan N-cadherin dalam perkembangan kanker pankreatik. Cadherin merupakan glikoprotein transmembran yang berperan sebagai perantara calcium-dependent cell-cell adhesion. Cadherin merupakan senyawa yang mempunyai fungsi cukup penting dalam perkembangan sel yang normal, juga dapat digunakan untuk mempengaruhi

tumorigenesis. Telah diketahui sebelumnya bahwa E-cadherin berfungsi sebagai tumor suppressor, yang telah diteliti sebelumnya baik oleh peneliti maupun kelompok peneliti lainnya cadherin yang tidak berfungsi dalam sel epitel merupakan suatu penyebab dari ketidakmampuan sel tumor melakukan pelekatan pada sel lain. Selanjutnya, ketika sel epitel berkembang melalui tahap-tahap karsinogenesis, mereka terus berada dalam tahap transisi dari fenotip epitelial menjadi fenotip mesenkimal (EMT). Tahap transisi ini seringkali berbarengan dengan kehilangan fungsi E-cadherin dan meningkatkan ekspresi dari cadherin jenis lain, seperti N-cadherin, yang diduga memainkan peranan yang penting pada tahap awal dari invasi dan metastasi kanker pankreatik. Invasi dan metastasi sangat dekat hubungannya dengan peristiwa yang tampak pada lingkungan mikro dari jaringan terkena tumor dimana sel stroma dan tumor bertukar sinyal yang bisa memodifikasi matriks ekstraseluler matriks, menstimulasi migrasi, dan mengawali proliferasi dan ketahanan hidup. Kanker pankreatik ditandai oleh respon desmoplastik, yang mengandung kolagen tipe I yang berlimpah, dan hal ini terlihat pada 90% kasus kanker pankreatik. Lebih jauh lagi, kolagen I dilaporkan sebagai yang mengawali fenotip malignan pada kanker pankreatik. Peneliti baru-baru ini juga melaporkan bahwa sel kanker pankreatik menjadi bergerak, dan N-cadherin meningkat dalam merespon kolagen tipe I, tidak pada materi lain, dan kenaikan N-cadherin diperlukan oleh kolagen I untuk menginduksi motilitas sel. Peneliti juga melihat bahwa sel kanker pankreatik dibantu pembentukannya oleh N-cadherin pada percobaan menggunakan model orthotopic tikus. Pengujian histologis menunjukkan mikrometastasi pada paru-paru tikus seiring dengan ekspresi N-cadherin yang meningkat. Hal ini sejalan dengan data yang dikemukakan oleh Bouvet et al., yang menemukan bahwa parental dari sel BxPC-3, yang memperlihatkan bahwa kadar N-cadherin yang rendah berhubungan dengan kecilnya terjadi metastasi. Data ini membimbing peneliti untuk mempertanyakan bagaimana cara melakukan blok atau pencegahan terbentuknya N-cadherin agar perilaku malignan akibat ekspresi N-cadherin.

Blaschuk *et al.*, melaporkan bahwa sintesis peptida yang mengandung sekuens, His-Ala-Val (HAV), yang ditemukan pada 1 Extracellular (EC-1) domain dari cadherin klasik, menghambat pematangan yang berbasis cadherin. Sebagai tambahan, hasil penelitian terbaru telah mengindikasikan bahwa siklus pendek dari HAV peptida bisa menghambat fungsi N-cadherin. Hipotesis dalam penelitian ini adalah bahwa peptida bisa mencegah pertumbuhan tumor dan metastasi dari tingginya ekspresi N-cadherin pada sel kanker pankreatik. Siklus peptida yang digunakan dalam penelitian ini adalah ADH-11 (N-Ac-CHGVDC-NH₂) dan ADH-1 (N-Ac-CHAVC-NH₂) yang disediakan oleh Adherex Technologies (Durham, NC). ADH-1 telah dilaporkan sebelumnya dapat menghambat N-cadherin sebagai perantara adhesi sel, sedangkan ADH-11 tidak memiliki dampak apapun terhadap N-cadherin sebagai perantara adhesi sel sehingga dapat dijadikan sebagai kontrol.

Material dan Metode Penelitian

Reagen, antibodi, dan kultur sel

Semua reagen disediakan oleh Sigma-Aldrich atau Fishers Chemical. Antibodi monoclonal dari tikus (mAb) yang akan melawan E-cadherin (HECD1) merupakan pemberian dari M.Takeichi (RIKEN Center for Development Biology Kobe, Japan). M Ab tikus melawan N-cadherin (13A9) telah didapatkan gambarannya. Anticaspase-3 dari pAb kelinci dan anti pembelahan caspase-3(asp175) pAb kelinci diberikan oleh Cell signaling Technology (Beverly, MA). Antitubulin mAb tikus diberikan oleh Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA). BxPC-3 manusia, Capan-1 dan sel-sel MiaPaCa-II diambil dari American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Piringan yang dilapisi substrat dan Type I kolagen ekor tikus berasal dari BD Bioscience Pharmigen, San Diego, CA. Serum telah direduksi menjadi 1 % untuk menguji sinyal yang pertama kali muncul dari adhesi matriks ekstraselular. Antagonis N-cadherin dilarutkan dalam PBS dan ditambahkan ke dalam media pada konsentrasi tertentu.

Ekstraksi detergen, SDS-PAGE, Immunoblot dan invitro kinase assay

Monolayer dari kultur sel dicuci dengan PBS yang didinginkan sedingin es dan diekstraksi dalam es dengan RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 2 nM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2% U/ml aprotinin). Ekstrak sel dilarutkan lagi dengan SDS-PAGE dan immunoblot dilakukan.

Constructs

Myc-tagged dari N-cadherin manusia telah disubklon dalam LZRS-MS-Neo dan sel yang telah terinfeksi diseleksi dalam 1 mg/ml G418, shRNA yang dibangun untuk N-cadherin telah tampak. Ekspresi yang tinggi dari N-cadherin dalam sel atau sel N-cadherin knock-down yang baku telah terbentuk. Untuk pembentukan gambar menggunakan bioluminescen, diinfeksi dengan fire-fly luciferase dari vektor PA3-luciferase yang disubclone-kan ke dalam pLXSH, dan sel-sel yang terinfeksi akan diseleksi dalam hygromycin (200µg/ml)

Transwell motility assay

5×10^5 sel ditempelkan dibagian atas daerah yang telah dilapisi polyethylene teraphthalate membranes (BD BioCoat™ Control Culture Inserts, 6-well plates, ukuran pori 8µm; BD Biosciences, San Jose, CA). Bagian atas dan bawah dari sisipan dilapisi dengan kolagen I atau fibronectin. Media kultur berisi FBS 1% yang telah ditambahkan pada bagian atas, dan media berisi 10%FBS pada bagian bawahnya. Sel kemudian diinkubasikan di atas membran selama 4 jam dan motilitasnya telah dikuantifikasikan seperti yang tergambar. Ketika terindikasi, antagonis N-cadherin telah ditambahkan di kedua sisi dari sisipan.

Evaluasi Apoptosis

Untuk terminal deoxynucleotidyl transferase mediated *nick end labelling* (TUNEL) assay, sel ditumbuhkan di atas kaca penutup setebal 22-mm dalam 6 piringan, diberi perlakuan dengan peptide yang terindikasi selama 24 jam dan diawetkan untuk TUNEL menggunakan TACS TdT Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Contoh hewan dan penelitian tumor

Congenitally athymic female National Cancer Institute nude mice (Ncr-nu/nu) telah dipelihara dalam keadaan bebas pathogen di bawah ijin dan sesuai panduan dari Institutional Animal Care and Use Committee. Hewan dibius, dan 40 μ l dari suspensi sel tunggal berisi 50,000 sel diinjeksikan ke pankreas seperti yang telah disebut. Tikus kemudian dipilih secara acak menjadi kelompok perlakuan 10 hari setelah pembedahan. Untuk perlakuan, tikus diinjeksikan melalui intraperitoneal 1 kali sehari dengan ADH-1 pada 50 mg/kg dalam 100 μ l PBS (1xsehari, 5x perminggu selama 4 minggu). Untuk keperluan in vivo bioluminescen, D-Luciferin(Xenogen, Alameda, CA) telah dimasukkan melalui injeksi peritoneal. Data didapatkan setelah 20 menit setelah injeksi menggunakan IVIS system (Xenogen). Pertumbuhan tumor dipantau setiap 10 hari sekali dari 10 hari hingga 50 hari setelah pembedahan. Aktivitas luciferase dikuantifikasi dengan menggunakan sistem IVIS. Dua bulan setelah pembedahan, tikus dibunuh, dan pankreas, hati, paru-paru, dan nodul diseminasi diambil, difiksasi dalam buffer formalin dan ditanam dalam parafin. Dari situ dibuatlah irisan berseri setebal 5 μ m, dilekatkan di atas kaca objek, dan diwarnai dengan menggunakan prosedur standar H&E. Irisan diamati dengan menggunakan Zeiss Axioscop 40 microscope yang dilengkapi dengan AxioCam MR kamera digital berikut softwarenya.

Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan tes Mann-Whitney U, uji Kruskal Wallis, dan ulangan pengukuran ANOVA (statview version 5.0, Abacus concept, Berkeley, CA) dengan taraf signifikansi $p < 0.05$.

Hasil

ADH-1 mencegah pergerakan dan perpindahan sel yang terinduksi kolagen-1

Ketika sel epitel BxPc-3 telah dikultur di atas piring yang tidak dilapisi, mereka menunjukkan suatu karakteristik pola pertumbuhan koloni yang kompak (gb.1 a.a). Sebaliknya ketika dikultur di atas piring yang dilapisi kolagen-1 mereka menjadi menyebar dan membesar (gb.1 a.b), hal ini sesuai dengan pernyataan penelitian sebelumnya. Inkubasi dengan ADH-1 pada konsentrasi 2mg/ml mencegah pembesaran sel yang terinduksi kolagen-1 (gb.1 a dibandingkan dengann panel f ke panel b). Peneliti juga melaporkan sebelumnya bahwa N-cadherin akan meningkat ketika sel BxPC-3 disimpan di atas plat yang dilapisi kolagen-1, dan kemampuan mereka untuk membesar sebagai respon pada kolagen-1 bergantung dari ekspresi atau keberadaan N-cadherin. Jadi yang dipertanyakan adalah

apakah ADH-1 mencegah peningkatan regulasi N-cadherin dalam sel BxPC-3 sebagai respon terhadap kolagen I. Gb.1b memperlihatkan bahwa sel yang diberi perlakuan ADH-11 atau ADH-1 pada konsentrasi 0.2 mg/ml meningkatkan regulasi N-cadherin untuk mencapai perkiraan level ekuivalen sebagai respon pada plat yang dilapisi kolagen-1, menyarankan bahwa campuran ini tidak mencegah pembesaran sel sebagai respon pada kolagen dengan cara mencegah peningkatan regulasi N-cadherin, tetapi seringkali mereka mencegah pembesaran sel dengan cara menghambat fungsi N-cadherin. Hal itu bisa menjadi catatan bahwa dosis tinggi dari ADH-1 bisa mereduksi ekspresi N-cadherin dalam eksperimen yang ditunjukkan oleh Aherex Technologies (personal communication Dr. Mukur Gupta, Adherex).

Sejak tujuan peneliti adalah menguji keyakinan dari pencegahan N-cadherin sebagai media pertumbuhan tumor oleh ADH-1 (dengan tujuan utama penerapannya pada manusia) dan peneliti tidak dapat memprediksikan level dari ekspresi N-cadherin dalam tumor, pertanyaannya apakah ADH-1 dapat mencegah pembesaran sel yang terinduksi kolagen-1 dalam sel dengan ekspresi N-cadherin yang tinggi. Peneliti sebelumnya telah melaporkan bahwa sel BxPC-3 dengan N-cadherin yang ekspresi yang tinggi juga sangat motil secara in vitro dan juga sangat invasif pada in vivo. Seperti yang diharapkan, sel yang mengekspresikan N-cadherin juga membesar di atas kolagen I. Hal yang penting, perbesaran ini dicegah oleh ADH-1 (gb.1a, bandingkan antara panel h sampai panel d). Seperti telah dilaporkan sebelumnya, sel N-cadherin knock-down tidak membesar di atas kolagen-I (gb 1a, panel c) dan ADH-1 tidak mempunyai dampak signifikan pada morfologinya.

Selain sebagai tambahan pada pembesaran sel, kolagen-I menginduksi suatu peningkatan motilitas sel pada sel kanker pankreatik pada manusia yang bergantung pada N-cadherin. Jadi peneliti menguji kemungkinan ADH-1 untuk mencegah induksi N-cadherin yang menyebabkan motilitas sebagai respon terhadap kolagen-I menggunakan transwell assay. Sel BxPC yang diinkubasi dengan ADH-1 menurunkan motilitas sel sebagai respon pada kolagen-1 (Gb.1c, bandingkan bar 2 dan 1). Hal yang penting, level dimana ADH-1 melakukan pencegahan motilitas bergantung pada level dari ekspresi N-cadherin. ADH-1 secara signifikan mereduksi migrasi sel di atas kolagen-1 dalam ekspresi N-cadherin sel yang tinggi, dengan nilai $p < 0.05$ (gb.1c, bandingkan bar 5 dan 6).

Sebaliknya sel N-Cadherin knock down memperlihatkan motilitas yang rendah, dan ADH-1 tidak mempengaruhi mereka untuk berpindah (1c, bandingkan bar3 dan 4). Bukti ini menunjukkan bahwa ADH-1 mempunyai efektivitas yang tinggi dalam mencegah motilitas sel yang diinduksi oleh N-cadherin.

Untuk meyakinkan, peneliti tidak hanya mempelajari fenomena yang muncul pada satu tipe sel yang spesifik, peneliti juga menguji sel line (Capan-1) dari sel kanker pankreatik dalam hal responnya terhadap kolagen-1 dan kemungkinan ADH-1 menghambat respon ini. Sel-sel Capan-1 juga menyebar ketika ditempatkan diatas kolagen-I (gb.2a) dan meningkatkan regulasi N-cadherin sebagai respon pada kolagen-I (gb.2b). ADH-1 mencegah kolagen-1 menginduksi penyebaran dari sel-sel Capan-1 (gb.2a, panel d), tetapi tidak

mencegah kolagen-I menginduksi peningkatan N-cadherin (Gb. 2b). Lebih jauh, kolagen-I menginduksi motilitas pada sel Capan-1 telah dihambat oleh ADH-1 (Gb.2c).

ADH-1 menginduksi apoptosis sel kanker pankreatik

Erez *et al.*, melaporkan bahwa ADH-1 menginduksi apoptosis pada sel endotelial jika hal itu dilakukan pada konsentrasi lebih besar dari 0.25 mg/ml. Data ini membawa peneliti untuk menguji dosis dari ADH-1 sampai menimbulkan dampak pada penyebaran sel dan apoptosis dalam sel BxPC-3, dan juga mempertanyakan dampaknya terhadap N-cadherin. Peneliti memberi sel knock down N-cadherin dan sel yang menunjukkan ekspresi berlebih dari N-cadherin dengan meningkatkan dosis ADH-1 (gb.3a). Paling tidak sekitar 0.2 mg/ml ADH-1 diperlukan untuk mencegah penyebaran dari sel ekspresi N-cadherin (bandingkan panel h sampai f), dimana sel N-cadherin knock down tumbuh seperti koloni walaupun tidak ada ADH-1 (gb.3a panel a). Jadi sebenarnya, sel ekspresi N-cadherin menjadi tidak sehat pada konsentrasi lebih dari 0.5 mg/ml ADH-1 (panel i dan j), sedangkan N-cadherin knock down sel terlihat sehat walaupun pada konsentrasi 1.0 mg/ml ADH-1.

Untuk memastikan bahwa ADH-1 telah menginduksi apoptosis dalam sel ekspresi N-cadherin, peneliti mengekstraksi sel yang telah diberi perlakuan dengan berbagai variasi konsentrasi ADH-1 dan di imunoblotkan pada caspase-3 dan caspase-3 yang terbelah (gb. 3b). Caspase-3 terbelah ketika sel ekspresi N-cadherin diberi perlakuan 0.5 mg/ml ADH-1, yang mana hal itu tidak terjadi pada sel N-cadherin knock down. Sebagai tambahan, TUNEL dan pewarnaan DAPI memperlihatkan bahwa apoptosis telah diinduksi pada sel ekspresi N-cadherin pada konsentrasi 1.0 mg/ml ADH-1 (gb.3c). Untuk menjelaskan hubungan antara induksi apoptosis dan ekspresi N-cadherin, peneliti menggunakan mock-infected sel BxPC-3, sel N-cadherin knock-down dan sel ekspresi N-cadherin (gb.3d). Kuantifikasi dari sel apoptosis menunjukkan bahwa ADH-1 induksi apoptosis tampak dipengaruhi oleh ketergantungannya pada ekspresi N-cadherin (bandingkan bar 6 dengan bar 4 dan 5) sebaik seperti ketergantungannya pada konsentrasi peptida (lihat bar 6 dengan bar 3). Sebagai tambahan, sel MiaPaCa-II dimana adherinnya nol tidak mengalami apoptosis ketika diberi perlakuan ADH-1 dengan dosis tinggi (Gb.3e).

ADH-1 mencegah pertumbuhan tumor dan metastasi pada hewan percobaan

Peneliti selanjutnya mempertanyakan apakah ADH-1 sebagai antagonis dari N-cadherin bisa mencegah pertumbuhan tumor dan metastasi secara *in vivo*. Untuk menjawab pertanyaan ini, peneliti menggunakan ekspresi N-cadherin pada sel BxPC-3 dengan luciferase untuk memfasilitasi penghitungan foton pada bioluminescen. Peneliti menginjeksikan sel ke dalam pankreas dari tikus athymic nude (control, n=8; ADH-1, n=11 ekor), dan diinjeksi dengan campuran pada 50 mg/kg (x 1 sehari; x5 seminggu selama 4 minggu) dimulai 10 hari setelah penanaman sel tumor melalui pembedahan. Kelompok kontrol menerima hanya PBS. Peneliti menemukan munculnya bioluminescen dengan photon counting pada tikus dari hari ke-10 hingga 50 setelah penanaman sel tumor (gb. 4a), dan

dikuantifikasi luciferasenyanya dengan menggunakan sistem IVIS. ADH-1 secara signifikan mencegah pertumbuhan tumor secara *in vivo* (gb.4b). Dua bulan setelah penanaman sel tumor, tikus dibunuh kemudian ukuran tumor pada pankreas diamati secara makroskopik. Sejalan dengan data IVIS, ternyata tikus kontrol yang tidak diberi ADH-1 memperlihatkan ukuran tumor yang lebih besar daripada tikus yang diberi ADH-1 (gb. 4c).

Tikus kontrol memperlihatkan invasi tumor hingga ke ruang peritoneal, sedangkan tikus yang diberi perlakuan ADH-1 ukuran tumornya kecil dan hanya berada dalam pankreas saja. Gambar 5a memperlihatkan pewarnaan H&E dari perut dan penanaman nodul tumor dari tikus kontrol (gb. 5a panel a). Tumor tampak melebar memenuhi ruang di bawah villi dari lambung, mengindikasikan bahwa sel BxPC-3 yang ditambah N-cadherin bersifat invasiv. Gambar 5a panel c memperlihatkan tumor yang terlokalisasi di pankreas dari tikus yang telah diberi ADH-1. Selanjutnya, pewarnaan H&E memperlihatkan bahwa mikro-metastasi juga tampak pada 4 dari 8 paru-paru tikus kontrol (gb. 5a, panel b), yang mana tidak tampak pada tikus yang diberi ADH-1. Data-data ini menunjukkan bahwa ADH-1 mencegah invasi sel tumor dan metastasi pada model orthotopic untuk kanker pankreatik menggunakan sel-sel BxPC-3 yang dibubuhi N-cadherin.

Sejak ADH-1 mencegah motilitas sel tumor pada konsentrasi rendah dan menginduksi terjadinya apoptosis pada konsentrasi tinggi, efek campuran di dalam *in vivo* bisa menjadi multi faset. Untuk menentukan apakah jika tumor berukuran kecil yang telah diberi ADH-1 bisa juga digunakan untuk meningkatkan apoptosis, peneliti membedah tumor yang mengalami apoptosis. Ketika peneliti mencabut tumor 2 minggu setelah akhir masa perlakuan dan mewarnainya (untuk apoptosis sel : dengan TUNEL assay) ternyata terlihat banyak terjadi apoptosis dibandingkan dengan tumor yang diambil dari tikus kontrol.

Diskusi

ADH-1 yang merupakan siklus kecil dari peptida, telah dikembangkan oleh Adherex Technologies sebagai pelawan N—cadherin. Sklus peptida yang aktif akan menghambat N-cadherin dalam memicu perkembangan yang di luar normal dan menunjukkan perannya sebagai perlengkapan untuk antiangiogenesis dalam kultur sel. Peneliti dapat melihat bahwa meningkatkan kadar N-cadherin memainkan peran penting dalam perkembangan dan metastasi kanker pankreatik. Semenjak hampir seluruh kanker dideteksi pada stadium lanjut, ketika pembedahan tidak lagi mungkin dilakukan, identifikasi perlakuan baru yang bisa memberhentikan perkembangan sel tumor merupakan sesuatu yang kritis.

Peneliti menganggap bahwa dengan cara mengetahui aktivitas ADH-1 terhadap kehadiran N-cadherin pada sel kanker pankreatik dalam kultur sel, akan dapat teramati mekanismenya ketika sedang beraksi. Peneliti menunjukkan bahwa memberikan ADH-1 pada sel kanker pankreatik dapat menghambat penyebaran sebagai respon pada kolagen-I yang melapisi *transwells*. Bukti ini tidak membuktikan bahwa ADH-1 menghambat ekspresi dari N-cadherin seperti juga peptida tidak mencegah peningkatan ekspresi N-cadherin sebagai respon terhadap kolagen-I. Yang penting, ADH-1 bekerja lebih efektif dalam mencegah

migrasi sel pada sel yang digunakan untuk memunculkan sel N-cadherin *knock down*. Peneliti sebelumnya telah memperlihatkan bahwa proses bongkar pasang ekspresi N-cadherin dengan menggunakan shRNA juga mencegah penyebaran dan pergerakan sel sebagai respon dari kolagen-I. Data yang ditunjukkan pada artikel ini mendukung bahwa ADH-1 hampir selalu efektif dalam mencegah baik pergerakan sel yang mengandung N-cadherin maupun dalam proses bongkar pasang ekspresi N-cadherin. Ketika peneliti menginkubasi sel BxPC-3 dengan ADH-1 dalam konsentrasi yang bervariasi sel berada dalam keadaan menuju apoptosis, dan dampaknya semakin besar pada sel N-cadherin overekspresi dibandingkan sel yang N-cadherinnya bongkar pasang (*knock down*). Sejumlah penelitian telah mengarahkan bahwa N-cadherin yang berbasis sel menyediakan sinyal bagi sel untuk bertahan hidup. Walaupun sinyal ini tidak sepenuhnya diketahui bagaimana tepatnya, sejumlah rangkaian proses telah dilaporkan dipicu oleh cadherin sebagai media kontak antar sel, termasuk pemberian sinyal Wnt dan reseptor sinyal tirosin kinase. Erez *et al.* melaporkan bahwa ADH-1 menginduksi apoptosis dalam sel endotelial dengan cara mencegah aktivasi cadherin dalam penyampaian sinyal FGFR. Kelompok ini memperlihatkan bahwa menyediakan FGF dalam kultur sel berarti menyediakan keperluan sinyal survival dan mencegah ADH-1 yang menginduksi apoptosis. Hal ini tidak seperti percobaan yang dilakukan peneliti dimana sel mengalami suatu penurunan yang cukup signifikan dalam kemampuan sel dalam melakukan kontak antar sel ketika diberi perlakuan dengan ADH-1 karena mereka mengekspresikan kadar yang tinggi dari E-cadherin, dan E-cadherin bukan merupakan target dari ADH-1. Jadi hal ini justru menunjukkan bahwa ADH-1 secara langsung menginisiasi sinyal apoptosis bagi sel bukannya menghambat sinyal untuk bertahan hidup.

Di luar laboratorium tampak bahwa sel BxPC-3 yang melakukan bongkar pasang N-cadherin (menggunakan shRNA) memproduksi tumor yang lebih kecil secara signifikan daripada yang dilakukan sel BxPC-3 yang telah mengandung N-cadherin yang sudah jadi. Kenyataan bahwa ADH-1 tidak hanya menghambat perpindahan dan invasi sel tumor pankreatik tetapi juga menginduksi apoptosis dalam sel yang sudah berisi N-cadherin sehingga ,mengindikasikan bahwa peptida ini memiliki efek antitumor ganda secara *in vivo*. Selama perlakuan dengan ADH-1, peneliti mencabut tumor, mewarnainya dengan TUNEL, dan melihat bahwa ada daerah apoptosis muncul di bagian tumor primer, yang mana menjelaskan mengapa tumor primer menjadi kecil ukurannya pada tikus yang diberi ADH-1 daripada tikus kontrol. Sebaliknya, peneliti tidak melihat peningkatan apoptosis pada tumor yang dibentuk oleh sel yang N-cadherinnya bongkar pasang (data tidak ditunjukkan), jadi mekanisme supresi tumornya berbeda ketika fungsi N-cadherin dihambat oleh ADH-1 daripada ketika ekspresinya dihambat oleh shRNA.

ADH-1 telah dilaporkan menunjukkan kelengkapan antiangiogenesis dalam sel-sel endotelial dan dalam berbagai sistem model, seperti pada assay membran chorioallantoic ayam. Ketika dimasukkan ke dalam tubuh tikus yang menderita tumor, ADH-1 menyebabkan keluarnya darah dari pembuluhnya tanpa melukai struktur pembuluh yang normal. Dengan demikian, mungkin saja bahwa perlengkapan antiangiogenesis ADH-1 menginduksi apoptosis

yang masif seperti yang terlihat pada tumor dalam penelitian ini. Walaupun demikian peneliti mengusulkan bahwa ADH-1 juga mempunyai efek secara langsung pada pertumbuhan tumor yang berisi ekspresi N-cadherin karena peneliti mulai menginjeksikan peptida 10 hari setelah pembedahan. Dan penghitungan foton bioluminescen menunjukkan perbedaan segera setelah dilakukan injeksi peptida, sehingga mendukung pernyataan bahwa ADH-1 bekerja pada kanker pada fase awal dari pertumbuhan tumor, sebelum mereka membentuk pembuluh darah baru untuk menyuplai makanan bagi tumor.

Hal yang sangat menggembirakan adalah bahwa perlakuan menggunakan ADH-1 juga mencegah metastasi pada model orthotopic dari kanker pankreatik. Hal ini mungkin saja terjadi karena terhambatnya pertumbuhan tumor primer tentu akan menghambat pula proses metastasi. Dengan kata lain, tumor tidak mempunyai kekuatan untuk metastasi karena pertumbuhannya tidak memenuhi syarat untuk terjadi metastasi. Ide ini sejalan dengan studi sebelumnya yang memperlihatkan bahwa pembentukan tumor pada sel BxPC-3 yang berisi cadherin bongkar pasang tidak hanya memperlihatkan ukuran tumor yang lebih kecil dari pada sel parentalnya tetapi juga memperlihatkan adanya penurunan metastasi. Akhirnya, kalau ADH-1 mencegah vaskularisasi pada tumor, hal ini bisa menolong mencegah terjadinya metastasi. Penelitian lebih jauh diperlukan untuk menentukan apakah ADH-1 bisa mencegah secara langsung metastasi dari sel tumor yang sudah diisi N-cadherin yang sudah jadi. Pada manusia, kanker pankreatik bermetastasi ke hati, paru-paru dan jaringan lainnya, jadi peneliti ingin menguji sejumlah jaringan untuk melakukan metastasi pada hewan percobaan yang mereka miliki, dan ternyata ditemukan bahwa paru-paru, bukan hati yang terkena metastasi. Bouvet et al. melaporkan bahwa tumor pada sel parental BxPC-3 berkembang sangat cepat tetapi tidak menunjukkan metastasi pada tipe sel yang spesifik layaknya interaksi antara "benih dan tanah" yang setiap tahapnya bisa dilihat urutannya. Sejak metastasi hati menjadi penting dalam perkembangan kanker pankreatik, penelitian selanjutnya akan berpusat pada implantasi orthotopic dari model fragmen tumor, yang bisa menyebabkan metastasi pada hati, dan akan melibatkan sel Capan-1, yang lebih menyerupai proses metastasi pada hati. Teknik penghitungan foton memungkinkan suatu cara penghitungan yang objektif dan menunggingkannya evaluasi kuantitatif dari perkembangan tumor dan penanaman peritoneal dalam waktu tertentu membuat analisis *in vivo* berguna untuk memantau respon dari tumor terhadap agen antikanker.

Sebagai kesimpulan, peneliti telah memperlihatkan bahwa ADH-1 sebagai pelawan N-cadherin mempunyai aktivitas antitumor melawan N-cadherin yang ada dalam sel kanker pankreatik, baik secara *in vitro* maupun dalam kanker pankreatik dalam model orthotopic tikus. Penelitian ini secara jelas menunjukkan bahwa N-cadherin yang ada dalam sel kanker pankreatik manusia sebagai target untuk diberi perlakuan, dan mengusulkan ADH-1 sebagai pelawan aktivitas N-cadherin yang berperan dalam perkembangan sel kanker pankreatik pada manusia.

Makalah berisi adaptasi dari

**ADH-1 Suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer
progression**

*Yasushi Shintani, Yuri Fukimoto, Nina Chaika, Paul M. Grandgenett, Michael J.
Wheelock, and Keith R. Johnson*

International Journal of Cancer 122, 71-77(2008)

Published online 23 August 2007 in Wiley InterScience(www.interscience.wiley.com)

Disusun untuk memenuhi salah satu tugas mata kuliah Biologi Kanker
yang dibina oleh
Dr. Marselina Irasonia Tan (Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi
Bandung)

Disusun oleh :
Mimin Nurjhani K
0706715
Program Studi Pendidikan IPA

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN IPA
SEKOLAH PASCA SARJANA
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA