

**Asosiasi Homocystein dengan Aktivasi NF-kappaB
menginduksi Kerusakan sel Neuro 2a**

Arief Budi Yulianti

D86.0.046/0409076001



Bagian Biologi Medik dan Histologi,
Fakultas Kedokteran, Unisba

2018

1. Latar Belakang.

Homocystein (Hcy) adalah asam amino mengandung sulfur dan tidak ada dalam protein atau pun DNA, tetapi merupakan metabolit perantara dari methionine. Hiperhomocysteinemia ditentukan oleh faktor genetik, seperti aktifitas enzim yang melibatkan Hcy melalui pathway remetilisasi dan transulfurisasi atau kekurangan vitamin B6 dan asam folat. Peningkatan kadar homocysteine pada plasma akan meningkatkan risiko terjadinya serangan jantung (Prieto, R.G, dkk, 2009) , atherosclerosis, stroke, gagal ginjal dan neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer (Seshadri, S, dkk, 2002), dan Parkinson tetapi bagaimana mekanismenya belum banyak diketahui (Kruman, I, dkk, 2001).

Hiperhomocysteinemia pada perinatal akan mengganggu neurogenesis dan pertumbuhan, begitu juga pada anak-anak, secara heriditer hiperhomocysteinemia akan mengalami kerusakan sel-sel syaraf.. Homocystein bersifat toksik terhadap perkembangan sistem syaraf, tetapi informasi mekanismen terjadinya masih sangat sedikit. (Ferlazzo.dkk, 2008)

Hcy menginduksi neurotoxicity pada manusia dan sel neuron murine melalui beberapa mekanisme, yaitu menstimulasi reseptor N-methyl D-Aspartat Acid (NMDA), stress oksidatif, kerusakan DNA. Hcy berperan dalam excitotoxic sebagai glutamat , sehingga meningkatkan excitotoxic glutamat. Sejauh ini dalam keadaan normal aktivasi reseptor NMDA menyebabkan excitation dan inhibition. Hcy hanya menyebabkan excitation pada sel syaraf (ferlazzo, dkk, 2008).

Mekanisme Hcy dalam neurotoxicity sudah banyak diketahui, sedangkan keterliatan Hcy dalam inhibition oksidasi sitokrom melalui aktifitas copper binding dengan Hcy belum banyak dibicarakan. Dari studi sebelumnya konsentrasi Hcy yang tinggi menyebabkan ketidak seimbangan sistem redoks homeostatis, melalui reactive oxygen species (ROS) yang bersifat toksik. Ini mengakibatkan sel terstimulasi berhenti membelah dan apoptosis, sehingga terjadi neurodegeneratif. Pada proses pertumbuhan, ROS menginduksi kerusakan sel sebagai akibat proses inflamasi dengan mengaktifasi Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) yang berperan dalam up-

regulation gen-gen inflamasi, ini menyebabkan terjadi apoptosis. Peran NFkB masih diperdebatkan, terutama perannya dalam menghambat proses neurodegeneratif sedangkan pada sel Microglia menyebabkan kematian sel.

Dalam paper ini dibahas pengaruh efek pro oxidant dari paparan Hcy pada sel neuroblastoma, Neuro2a, yang merupakan sel yang belum terdiferensiasi dan keterlibatan pathway NFkB pada Hcy yang menginduksi kerusakan sel.

2. Metodologi

2.1. Bahan.

Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), foetal bovine serum (FBS) dan antibiotics dari Invitrogen Life Technologies (Milano, Italy). The caspase-3 substrate Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Asp-Glu-Val-Asp-p nitroaniline (DEVD-pNa), D, L-Hcy, N-acetylcysteine (NAC), non-enzymatic sel larutan disosiasi dan zat kimia lain dengan grade analitik dari Sigma (Milano, Italy). Rabbit polyclonal antibody against Bax dari Chemicon (USA). Mouse monoclonal antibodies against Bcl-2 and caspase-3 dari BioVision (Mountain View, USA). Rabbit polyclonal antibody against p53, mouse monoclonal anti-bodies against β -actin as well as p50 (sc-8414X) and p65 (sc-8008X) NF- κ B subunits, and the NF- κ B inhibitor, SN50, dari Santa Cruz Biotechnology (DBA, Milano, Italy). The oligonucleotide probe containing the NF- κ B consensus sequence present in the κ -light chain promoter was synthesised by MWG Biotech (Monza, Italy). Kodak X-ray film was from Kodak (Milano, Italy). IRFI 016, a synthetic α -tocopherol analogue, was generously supplied by Biomedica Foscama Research Centre (Frosinone, Italy).

2.2. Perlakuan dan kultur sel

Sel neuroblastoma mencit Neuro2a (ATCC-CCL 131) ditumbuhkan pada medium MEM, supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ g/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin, at 37°C in a 5% CO₂/95% air

humidified atmosphere. Kultur sel diinkubasi selama dua minggu, dengan medium diganti setiap 2 hari. Subconfluent cells diberi perlakuan dengan Hcy (10–500 μ M) selama empat jam dengan atau tanpa antioksidan, seperti NAC (500 μ M) dan IRFI 016 (80 μ M), yang ditambahkan pada kultur 30 menit sebelumnya pada kultur yang diberi Hcy. Jumlah pengulangan 4 untuk setiap sampel. Eksperimen ini menggunakan SN50 (50 μ g/ml), peptide sintetik yang digunakan untuk menghambat translokasi nuclear dari NF- κ B, yang ditambahkan pada sel kultur 30 menit sebelumnya pada kultur yang diberi Hcy

2.3. Produksi Reactive Oxygen Species (ROS)

Untuk mengevaluasi produksi ROS kultur sel Neuro 2a yang diberi perlakuan atau tidak diberi perlakuan diletakan pada 12-well culture plates, dan dinkubasi selama 30 menit dengan dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) (5 μ M). Kemudian sel dicuci dengan phosphate-buffered saline (PBS), dipisah dengan non-enzymatic cell dissociation solution, dan resuspended in 300 μ l of PBS supplemented dengan 0.1 M KH₂P₀₄ dan 0.5% Triton X-100. Supernatants dsentrifugasi dengan kecepatan 13,000 rpm selama 10 menit, dan dianalisa dengan fluorescein optics.

2.4. Cell viability assay

Untuk menghitung efek Hcy pada viailitas sel, MTT (3-(4, 5-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) reduction assay dilakukan. Setelah diberi perlakuan Hcy, sel Neuro2a, ditumbuhaka pada 96-well culture plates, yang diinkubasi dengan fresh medium mengandung MTT (0.5 mg/ml) at 37°C selama 4 h. Kemudian , insoluble formazan crystals dilarutkan dalam 100 μ l of a 10% (w/v) SDS solution dalam HCl 0.01M. The optical density in each well was evaluated by spectrophotometrical dengan panjang gelombang 540 nm with a Sunrise microplate reader (Tecan Italia, Cologno Monzese, Italy). Penghitungan viability sel dengan menentukan rasio dari Hcy-treated vs untreated cells. Eksperimen ini dilakukan dengan pengulangan tiga kali .

2.5. Western blotting

Sesudah diberi perlakuan sel Neuro2a dihomogenkan dalam es. Proteins (30 μg) dipisahkan dengan SDS-PAGE onto 8.5% gel, dan ditransfer ke nitrocellulose membranes. Blots diblok sepanjang malam pada suhu 4°C with 5% non-fat dry milk, kemudian membranes diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, pada rotating device, dengan mouse monoclonal anti-bodies against either Bcl-2, or caspase-3 or β -actin (diluted 1:1000 in TBS-T) and rabbit polyclonal antibodies against either Bax or p53 (diluted 1:2000 and 1:200, respectively, in TBS-T), followed by incubation for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG(1:1500 for Bcl-2, and 1:2500 for caspase-3 and β -actin, in TBS-T) or anti-rabbit IgG (1:2500 for Bax, and 1:1000 for p53, in TBS-T). Blots were developed by ECL chemiluminescence detection system kit using Kodak film. Bands were scanned and quantified by densitometric analysis with an Alpha Imager 1200 System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), after normalisation against β -actin.

2.6. Caspase-3 activity assay

Setelah sel lisis dalam insoluble proteins dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan $1,000 \times g$ selama 3 menit pada suhu 4°C . A 50 μl aliquot of $2\times$ reaction buffer/DTT mix, dan 5 μl of 1 mM caspase-3 substrate DEVD-pNa (final concentration 50 μM) ditambahkan ke supernatant. Samples diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, kemudian DEVD-pNa cleavage dievaluasi dengan menghitung absorbance pada panjang gelombang 405 nm, menggunakan DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Pengukuran dikalibrasi dengan regresi linear standar kurva p-Na. aktivitas caspase ditentukan sebagai nmol pNA yang dilepas per jam per mg protein (nmol/h/mg protein).

2.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Adanya NF- κ B DNA binding activity in cell nuclear extracts dievaluasi dengan EMSA and supershift assay, seperti yang dijelaskan oleh Caccamo et al.

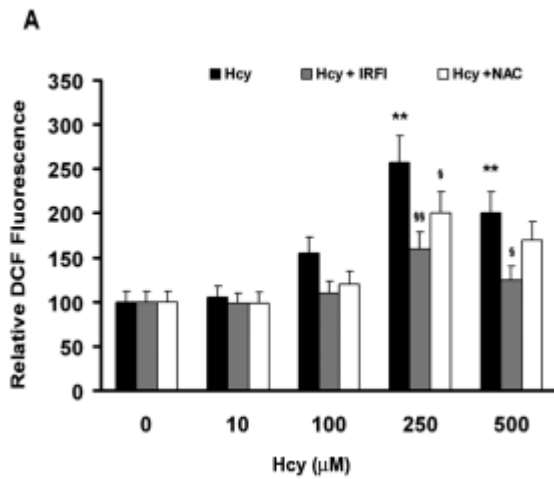
2.8. Statistical analysis

Semua hasil perhitungan dinyatakan dalam means \pm SEM. Analisa statistik dengan menghitung one-way ANOVA, diikuti dengan Newman-Keuls post-hoc test.

3. Hasil dan Pembahasan.

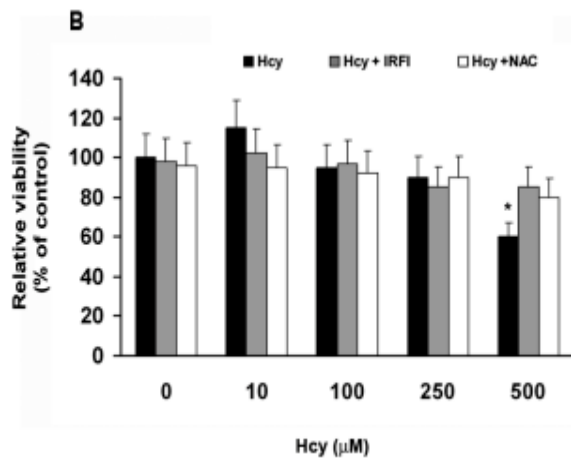
Pada kultur Neuro 2a, homocystein dengan konsentrasi tinggi, 250 – 500 μ M, mempengaruhi kenaikan ROS dengan kenaikannya 2- 3 kali lipat dibandingkan dengan kultur tanpa perlakuan. Penambahan antioksidan NAC atau IRFI 016 pada kultur memberikan efek perlindungan pada sel Neuro 2a, dengan menurunnya level ROS 35 % untuk kultur yang diberi tambahan IRFI 016 dan 20 % untuk NAC, dapat dilihat pada gambar 1.

Pencegahan toksisitas Hcy dengan katalase, sehingga tidak terbentuk hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan sel injury, kemudian terjadi apoptosis. Pemberian suplemen asam folat mencegah terjadinya stress oksidatif dengan mengurangi intraselular superoksida.



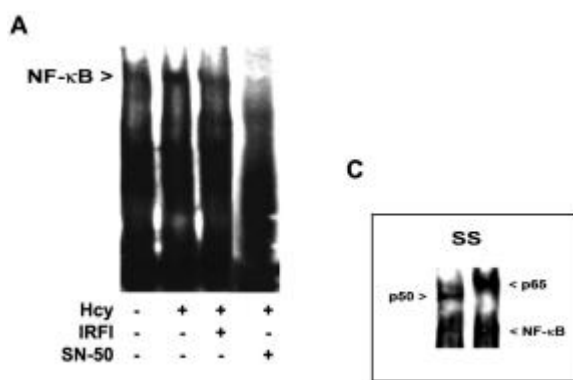
Gambar 1 : Pengaruh Hcy pada produksi ROS.

Pada konsentrasi Hcy 10 – 250 μMol tidak memberikan hasil yang signifikan pada viabilitas sel, kecuali pada konsentral Hcy 500 μMol , viabilitas sel menurun 40 %. Dan pemberian antioksidan NAC dan IRFI 06 meningkatkan viabilitas (Gambar2)



Gambar2. Viabilitas sel kultur.

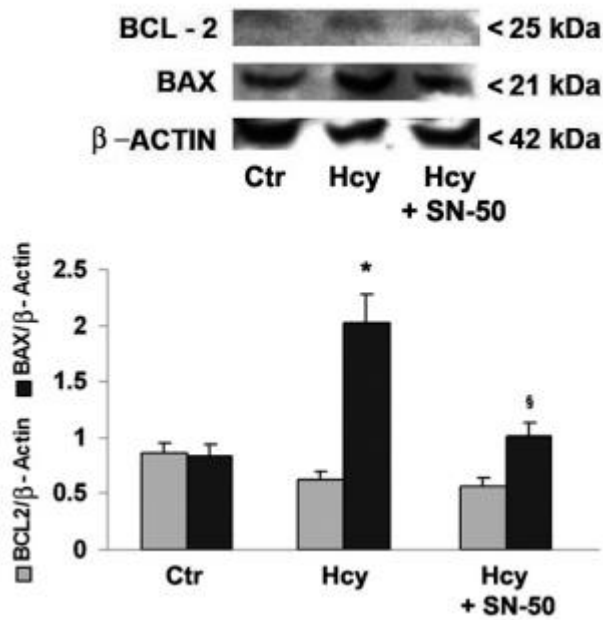
Kultur Neuro 2a diinkubasi dengan Hcy 250 μ M memperlihatkan ada peningkatan DNA binding activity, NF κ B dan berbeda nyata antara yang diberi perlakuan dengan yang tanpa perlakuan. Penambahan inhibitor SN50 secara signifikan menghambat NF κ B dan pemberian IRFI 016 pun memperlihatkan penurunan aktifitas NF κ B. Ada hubungan antara Hcy dengan stress oksidatif dan NF κ B aktifitas, dapat dilihat pada gambar 3.



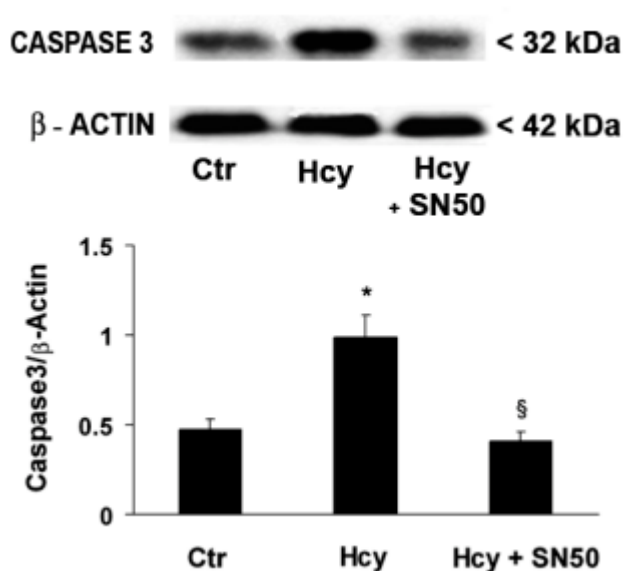
Gambar 3 : Pemberian Hcy pada kultur Neuro 2a meningkatkan NF κ B.

NF κ B adalah redoks sensitif- faktor transkripsi yang berperan penting dalam mengontrol ROS agar tidak terjadi apoptosis. Penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa aktivasi NF κ B merupakan bagian dari proses penyembuhan stress oksidatif akut yang disebabkan beberapa stimulus. Aktivasi NF κ B memberikan efek yang berlawanan pada kelangsungan hidup sel saraf. Bukti menyatakan bahwa aktivasi NF κ B menghambat hilangnya neuroprotektif, dengan mengaktivasi gen anti apoptosis, seperti Bcl2. Peran NF κ B yang berlawanan adalah meningkatkan level mRNA dari gen pro- apoptotic, Bax, yang berperan dalam kondisi stress, termasuk amyloid beta yang menyebabkan stress oksidatif pada microglia.

Gen-gen kB merupakan gen yang responsif terhadap kematian sel syaraf. Beberapa gen pro apoptotic diaktivasi oleh stress oksidatif, dan mungkin menfinduksi NFkB/Rel menyebabkan kematian sel. Homocystein mengaktifkan NFkB, yang menginduksi meningkatkan protein marker awal apoptosis, seperti Bax, caspase 3 dan p53. (Gambar 4 – 5).



Gambar 4. Efek pemberian Hcy pada eksprsi gen Bax dan Bcl pada kultru Neuro2a



Gambar 5. Analisa Western Blot pada ekspresi gen caspase 3 pada kultur Neuro 2a yang diberi perlakuan dengan Hcy dan control.

Efek pemberian Hcy pada kerusakan sel Neuro 2a, diamati dengan melihat protein marker awal terjadi apoptosis. Kultur sel dengan perlakuan Hcy (250 μ M) dan dikubasi selama 4 jam, secara signifikan meningkatkan protein Bax dibandingkan dengan kontrol., sedangkan ekspresi Bcl tidak terjadi. Kultur sel Neuro 2a yang diberi SN50, menginduksi ekspresi gen Bax dan tidak mengekspresi gen Bcl2 (Gambar 4). Hcy juga menyebabkan caspase 3 diekspresikan,(Gambar 5). Tetapi kultur yang ditambahkan SN50 meninduksi Nfkb spesifik yang menghambat protein caspase 3, begitu juga dengan penambahan IRFI 016 dan NAC mengurangi aktivitas caspase 3.

Cysteine proteases, caspase family dianggap berperan dalam proses apoptosis, dan mentriger apoptotic cascade dari pemecahan secara proteolitik, bahkan pada sel mamalia. Salah satu anggota caspase family, caspase 3 merupakan salah satu caspase yang menjalankan sebagian atau keseluruhan pemecahan secara proteolitik banyak protein.

Sebagai tambahan, protein p53 berperan dalam stres genotoksik, berhentinya perumbuhan dan kematian sel. Translokasi NFκB memberi pengaruh pada fosforilasi p53. Penurunannya aktifitas NFκB menyebabkan menurunnya aktivitas p53, yang menyebabkan sel syaraf mengalami kematian sel.

Aktivasi NFκB terlihat menjadi bukti kritikal awal, pengaruh Hcy dalam meninduksi apoptosis pada sel Neuro 2a, dengan penurunan yang signifikan dari ekspresi marker apoptotic pada penambahan SN50. Antioksidan IRFI 016 dan NAC mengurangi aktivitas caspase 3, yang berperan dalam stres oksidasi dari pengaruh toksisitas Hcy, akan tetapi meningkatnya NFκB, DNA binding activity dalam apoptosis sel tidak berhubungan dengan dua peran dari NFκB dalam kelangsungan hidup sel. Perlu diteliti lebih lanjut peran Hcy dalam menyebabkan kematian sel.

4. Daftar Pustaka.

1. Ferlazzo, N; Condello, S; Currò, M; Parisi, G; Ientile* R and Caccamo, D, 2008, NF-kappaB activation is associated with homocysteine-induced injury in Neuro2a cells, BMC Neuroscience 9:62
2. Kruman, I; Culmsee, C; Chan, S.L.; Kruman, Y; Guo, Z; Penix, L; Mattson, M.P. 2000. *Homocysteine Elicits a DNA Damage Response in Neurons That Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity*, The Journal of Neuroscience, 20(18):6920- 6926.
3. Prieto, R.G; Hernandez, V; Cano, B; Oya, M; Gil, A. 2009, *Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study*. Nutrition & Metabolism 6:39
4. Seshadri, S; Beiser, A; Selhub, J., Jacques, P.F; Rosenberg, I.R.; D'Agostino, R.B; Wilson, P.W.F. and Philip A. Wolf, P.A., 2002., *Plasma Homocysteine as a*

Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease, The New England Journal of
Medicine, Volume 346:476-483