DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK IDENTIFIKASI EKSON 5 GEN PENANDA KANKER PAYUDARA (*PALB2*)

Wulan Pertiwi, M.Si.
Program Studi Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Bandung,
Jl. Palasari 9A Bandung 40263, West Java, Indonesia

Email:wulanpertiwi@umbandung.ac.id

Abstract

Primers are significant oligonucleotides in the DNA replication process. In-vitro replication using PCR requires primers that can produce specific amplification of the intended target. The process of designing target-specific primers involves many factors such as specificity between primers and target, optimal G-C content in primers, primers lenght, and orientation of primers.The PALB2 gene which is consists of thirteen exons is a tumor suppressor gene in human genom. Mutations in the PALB2 gene will increase the risk of breast cancer. The aim of this study is to obtain a specific primer in amplifying exon 5 in PALB2 genes in human genom, using Primer-BLAST and Oligo Analyzer 1.0.2. The target sequence refers to GenBank (NCBI) NG_007406.1. The amplicon will be produced around 751 bp.

Keywords: *primers, PALB2, Primer-BLAST, breast cancer.*

1. PENDAHULUAN

Perancangan dan pemilihan primer yang tepat adalah faktor yang sangat esensial dalam proses amplifikasi suatu gen menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Rodriguez A. *et. al*., 2015). Primer yang spesifik tidak memiliki kecocokan dengan sekuen selain sekuen target (*off-target*). Proses perancangan primer spesifik melibatkan dua hal. Pertama, primer dirancang agar mengapit daerah yang menjadi target amplifikasi. Perancangan primer dapat dilakukan secara manual atau menggunakan perangkat lunak; Kemudian primer yang terpilih diuji spesifitasnya terhadap sekuen target dengan menggunakan perangkat lunak seperti BLAST (Ye, J. *at al*., 2012).

Kanker payudara adalah penyebab kanker yang paling dominan pada wanita. Lebih dari 1,5 juta wanita setiap tahun mengidap kanker payudara yang menyebabkan jumlah terbesar kematian perempuan terkait kanker. Pada tahun 2015, sebanyak 571 ribu wanita meninggal karena kanker payudara, atau sekitar 15% dari semua kematian akibat kanker pada Perempuan (www.searo.who.int).

Faktor genetik terlibat dalam meningkatnya risiko sejumlah kanker, termasuk kanker payudara. Sekitar 5-10% kanker payudara disebabkan oleh faktor genetik. (www.paho.org). Mutasi dari gen *BRCA1* dan *BRCA2* dikenal sebagai faktor penyebab kanker payudara (Narod dan Salmena, 2011; Lakhani *et al*., 2005; Eisen *et al*., 2005). Penelitian terus mengeksplorasi gen yang berpotensi meningkatkan risiko kanker payudara.

Beberapa gen telah diidentifikasi memberikan risiko kanker payudara pada pria dan wanita (Giordano S.H., 2018). Gen *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2),* yang mengkode protein yang berinteraksi dengan *BRCA2 (BRCA2-interacting protein*), merupakan gen supresor tumor (Xia *et. al*.,

2006; Park, J.Y. *et. al*., 2014) telah terbukti memberikan kerentanan terhadap kanker payudara pada wanita (Rahman *et al*.,2007; Jordan *et. al*., 2017). Gen ini memiliki 13 ekson (http://atlasgeneticsoncology.org). Menurut Helmut H., dan Paul R.A (2018), *PALB2* diperlukan dalam proses perbaikan DNA melalui rekombinasi homolog, dengan menjadi mediator perekrutan *BRCA2* dan rekombinase *RAD51* ke titik-titik kerusakan DNA. Mutasi pada *PALB2* juga telah dilaporkan pada pria dengan kanker payudara dan pada keluarga dengan kasus kanker payudara pada pria, tetapi prevalensi mutasi *PALB2* pada pria dengan kanker payudara dilaporkan hanya 1- 2% (Ding YC *et. al*., 2011; Erkko H., *et. al*., 2007; Casadei S. *et. al*., 2011; Adank MA *et. al.,* 2011; Blanco A. *et. al*., 2012). Hasil penelitian Fergus J. Couch dan tim (2018) menunjukkan bahwa mutasi pada *PALB2, BRCA1, BRCA2, BARD1,* dan *RAD51D*, diidentifikasi dapat meningkatkan faktor risiko TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*). Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer spesifik untuk mengamplifikasi ekson 5 gen *PALB2* pada kromosom 16 genom manusia.

2. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Satu unit komputer dengan *tools online* untuk desain primer yaitu Primer-BLAST (Ye, J. *at al*., 2012) dan *software* Oligo analyzer 1.0.2 (Kuulasma, T., 2002; molbiol-tools.ca).

Desain Primer

Desain primer dilakukan dengan mengacu pada sekuen *Homo sapiens partner and localizer of BRCA2* (*PALB2*), RefSeqGene (LRG_308) on chromosome 16, NCBI Reference Sequence: NG_007406.1. Desain dilakukan dengan menggunakan *tools online* yaitu Primer-BLAST dari NCBI dan *software* Oligo analyzer 1.0.2.

Desain primer dimulai dari pencarian sekuen *PALB2* pada sistem *'nucleotide'* NCBI, kemudian tautan *'Genomic'* pada kotak sensor gen diikuti untuk mendapatkan *genomic reference sequences* gen *PALB2* yaitu NG_007406.1. Kemudian tautan *'Highlight Sequence Features'* diklik sampai muncul tampilan *coding sequence* (CDS) yang disorot dari gen *PALB2*. Daftar *'Feature',* diubah dari CDS ke EXON untuk melihat ekson-ekson yang terdapat pada gen *PALB2* (ada 13 ekson), kemudian diarahkan ke ekson 5. Sekuen ekson 5 dalam format FASTA ditampilkan terpisah. Kemudian tautan *'Pick Primers'* dipilih. Rentang primer dalam Primer-BLAST diedit dan disesuaikan dengan daerah yang akan diamplifikasi. *Data base* diatur untuk menunjukkan pengecekan spesifisitas terhadap *'Genome (reference assembly from selected organisms)'* dan di daftar organisme, dipilih *'human'*. Pencarian dijalankan dengan pengaturan ini dengan mengklik tombol '*Get Primers*'. Tampilan *intermediate* akan muncul untuk mengonfirmasi. Kemudian tombol 'Submit' diklik. Dihasilkan empat pasangan kandidat primer. Pasangan primer dipilih berdasarkan kriteria primer yang handal.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain primer menggunakan *tools online* Primer-BLAST menghasilkan empat kandidat pasang primer (*forward* dan *reverse*). Area amplifikasi dari keempat kandidat pasangan primer ditunjukkan pada **Gambar 1**, sedangkan sekuen, panjang primer, Tm, persentase G-C, dan potensi struktur komplementer, ditunjukkan pada **Tabel 1**.

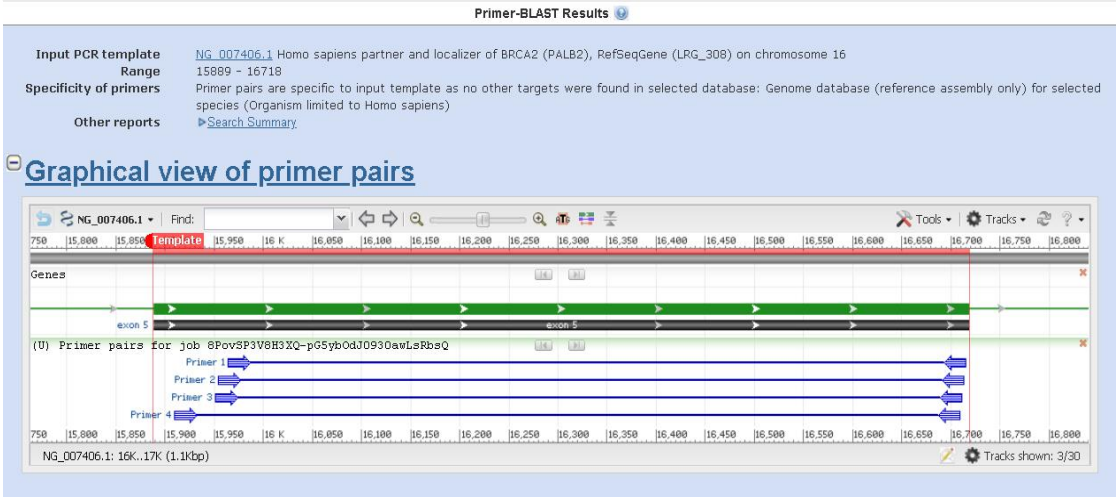
Karakteristik primer yang harus dipertimbangkan ketika merancang primer yaitu: (1) panjang primer 15-30 basa, (2) konten G-C yang optimal harus berkisar antara 40-60%, (3) ujung 3' primer harus mengandung G atau C untuk menjepit primer secara kuat dan meningkatkan *priming* efisiensi, (4) ujung 3' primer *forward* dan *reverse* tidak bersifat komplementer untuk mencegah ikatan antar primer (*primer dimer*), (5) ujung 3' pada satu primer yang sama tidak komplemen dengan urutan basa lainnya, untuk mencegah terbentuknya struktur jepit rambut (*hairpin loop*), (6) *melting temperature* (Tm) primer 45-65°C. Perbedaan antar Tm tidak lebih dari 5°C (suhu *annealing*

idealnya 5ºC di bawah Tm atau 52-58ºC), dan (7) pengulangan nukleotida (misal: GCGCGCGCGC atau ATATATATA) atau basa tunggal (misal: AAAAA atau CCCCC) harus dihindari (Lorenz, T.C., 2012).

Keempat pasangan primer memiliki panjang yang ideal untuk primer yaitu sekitar 22-23 bp, memiliki spesifitas yang baik terhadap target, ditunjukkan oleh hasil BLAST: *Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Genome database (reference assembly only) for selected species (Organism limited to Homo sapiens),* dan memiliki perbedaan Tm yang ideal antar primer yaitu di bawah 5°C, memiliki konten G-C yang baik yaitu 40-50%. Primer 4 *Reverse* memiliki persentase G-C yang paling rendah yaitu 43,48%.

Pasangan primer 2, 3, dan 4 memiliki potensi pembentukan struktur komplementer (dimer) yang tinggi yaitu empat hingga tujuh, sedangkan pasangan primer 1 memiliki potensi yang sangat rendah dalam pembentukan dimer. Tingginya potensi pembentukan dimer dapat mengarah pada kegagalan amplifikasi karena primer saling terikat satu sama lain, sehingga peluang primer untuk terikat pada target semakin rendah.

Potensi terbentuknya *hairpin loop* diidentifikasi dengan menggunakan *software* Oligo analyzer 1.0.2.



Gambar 1. Grafik Kandidat Pasangan Primer untuk Amplifikasi *PALB2* (NG_007406.1 *Homo sapiens partner and localizer of BRCA2 (PALB2), RefSeqGene (LRG_308) on chromosome 16)*

Tabel 1. Sekuen dan Parameter Kandidat Pasangan Primer untuk Amplifikasi *PALB2*

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTCACGGCTCCATTTCATAGG	Plus	22	15965	15986	58.72	45.45	2.00	2.00
Reverse primer	TTCGACGGAATGTTTATGCAGC	Minus	22	16715	16694	59.90	45.45	4.00	3.00
Product length	751								

Products on intended target

>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGATGATGCTTTCACGGCTCC	Plus	22	15955	15976	61.33	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	CGACGGAATGTTTATGCAGCTC	Minus	22	16713	16692	60.29	50.00	4.00	2.00
Product length	759								

Products on intended target

>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

Primer pair 3

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGATGATGATGCTTTCACGGC	Plus	22	15952	15973	61.58	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	ACGGAATGTTTATGCAGCTCCT	Minus	22	16711	16690	60.36	45.45	4.00	2.00
Product length	760								

Products on intended target

>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

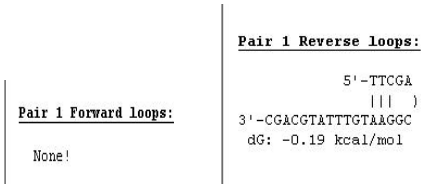
Primer pair 4

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGAGGATTCCCTTTCTTGGAGT	Plus	23	15910	15932	59.08	43.48	7.00	1.00
Reverse primer	GGAATGTTTATGCAGCTCCTGG	Minus	22	16709	16688	59.64	50.00	4.00	3.00
Product length	800								

Products on intended target

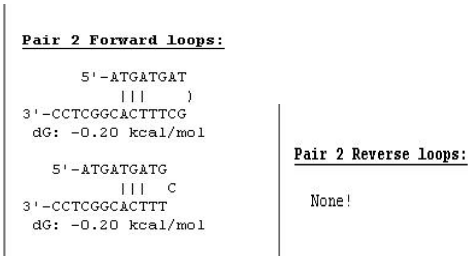
>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

Pada primer 1 *forward*, tidak teridentifikasi adanya struktur *hairpin loop,* sedangkan pada primer 1 *reverse*, teridentifikasi adanya satu struktur *hairpin loop*.



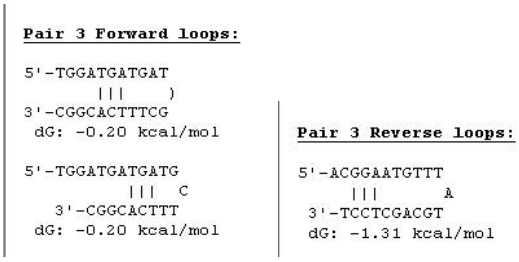
Gambar 2. Potensi struktur *hairpin loop* pada pasangan primer 1.

Pada primer 2 *forward*, teridentifikasi dua struktur *hairpin loop,* sedangkan pada primer 2 *reverse* tidak teridentifikasi adanya struktur *hairpin loop*.



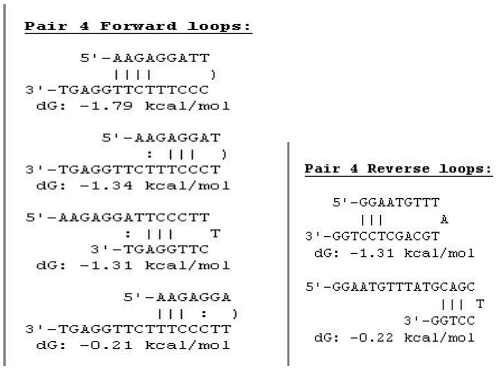
Gambar 3. Potensi struktur *hairpin loop* pada pasangan primer 2.

Pada primer 3 *forward*, teridentifikasi dua struktur *hairpin loop,* sedangkan pada primer 3 *reverse* teridentifikasi adanya satu struktur *hairpin loop*.



Gambar 4. Potensi struktur *hairpin loop* pada pasangan primer 3.

Pada primer 4 *forward*, teridentifikasi empat struktur *hairpin loop,* sedangkan pada primer 3 *reverse* teridentifikasi ada dua struktur *hairpin loop*.



Gambar 5. Potensi struktur *hairpin loop* pada pasangan primer 4.

Dari analisis hasil desain primer pada keempat pasang primer, pasangan primer 1 memenuhi semua parameter primer yang ideal untuk mengamplifikasi ekson 5 gen *PALB2*. Namun demikian, dalam proses amplifikasi gen target, optimalisasi proses PCR tetap diperlukan. Optimalisasi dilakukan dengan membuat variasi: konsentrasi Mg^{2+}, enzim polimerase, pH bufer, konsentrasi primer, konsentrasi DNA templat, jumlah siklus PCR, dan *annealing temperature* (Ta). Metode PCR *hot-start* dan PCR *touch-down* juga sangat dianjurkan untuk mendapatkan amplikon yang diinginkan (Kenneth, 2009).

IV. KESIMPULAN

1. Pasangan primer 1 (primer *forward*: 5'-TTTCACGGCTCCATTTCATAGG-3' dan primer *reverse*: 5'-TTCGA CGGAATGTTTATGCAGC-3' terpilih untuk digunakan sebagai primer dalam mengamplifikasi ekson 5 gen *PALB2* dalam genom manusia yang akan menghasilkan amplikon berukuran sekitar 751 bp.
2. Penggunaan *tools online* Primer-BLAST dan *software* Oligo Analyzer 1.0.2 dapat membantu mendesain primer yang spesifik.

REFEENSI

Adank MA, van Mil SE, Gille JJ, Waisfisz Q, Meijers-Heijboer H. 2011. PALB2 analysis in BRCA2-like families. Breast Cancer Res Treat ;127:357-362.

Blanco A, de la Hoya M, Balmaña J, 2012. Detection of a large rearrangement in PALB2 in Spanish breast cancer families with male breast cancer. Breast Cancer Res Treat ;132:307-315.

Casadei S, Norquist BM, Walsh T, et al. 2011. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. Cancer Res ;71:2222-2229.

Ding YC, Steele L, Kuan CJ, Greilac S, Neuhausen SL. 2011. Mutations in BRCA2 and PALB2 in male breast cancer cases from the United States. Breast Cancer Res Treat ;126:771-778.

Eisen A, Lubinski J, Klijn J, Miller P, Lunch HT, Offit K, Weber B, Rebbeck T, Neuhausen SL, Ghadirian P, Foulkes WD, Gershoni-Baruch R, Friedman E, Rennert G, Wagner T, Isaacs C, Kim-Sing C, Aisworth P, Sun P, Narod SA. 2005. Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol* 23(30):7491-7496.

Erkko H, Xia B, Nikkilä J, et al. 2007. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. Nature ;446:316-319.

Giordano, S.H.. 2018. Breast Cancer in Men. N Engl J Med;378:2311-2320. DOI: 10.1056/NEJMra1707939.

Helmut H., dan Paul R.A. 2018. PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2). Departement of Pediatric III, University Children's Hospital Essen, University Duisburg-Essen, Essen Germany. Division of Experimental Hematolog & Cancer Biology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, USA.

Hermela Shimelis*, Holly LaDuca*, Chunling Hu, Steven N. Hart, Jie Na, Abigail Thomas, Margaret Akinhanmi,

Raymond M. Moore, Hiltrud Brauch, Angela Cox, Diana M. Eccles, Amanda Ewart-Toland, Peter A. Fasching, Florentia Fostira, Judy Garber, Andrew K. Godwin, Irene Konstantopoulou, Heli Nevanlinna, Priyanka Sharma, Drakoulis Yannoukakos, Song Yao, Bing-Jian Feng, Brigette Tippin Davis, Jenna Lilyquist, Tina Pesaran, David E. Goldgar, Eric C. Polley, Jill S. Dolinsky, Fergus J. 2018. Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. Couch. JNCI J Natl Cancer Inst. 110(8): djy106. Doi: 10.1093/jnci/djy106.

Jordan L. E., Talia D., Humayun A., Sophia G., Gilian W., Sheray C., Dwight L., Robert R., Shiyu Z., Steven N., Judith H. Mohammad R. A. 2017. A High Frequency of PALB2 Mutations in Jamaican Patients with breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. Vol 162 issue 3, pp 591-596.

Kenneth H. Roux. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. Adapted from PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harb Protoc. Doi: 10.1101/pdb.ip66.

Kuulasma, T. 2002. Oligo Explorer. University of Kuopio, Kuopio, Finland.

Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Florca F, van der Vijver M, Parry S, Bishop T, Benitez J, Rivas C, Bignon YJ, Chang-Claude J, Hamann U, Cornelisse CJ, Devilee P, Beckmann MW, Nestle-Kramling C, Daly PA, Haites N, Varley J, Lalloo F. 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 11(14):5175-5180.

Lorenz, T.C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998.

Narod, S.A. dan Salmena L. 2011. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. Discoov Med. Nov;12(66):445-53.

Park JYI, Zhang F1, Andreassen PR2. 2014. PALB2: The Hub of a Network of Tumor Suppressors Involved in DNA Damage Responses. Biochim Biophys Acta: 1846(1):263-75. Doi:10.1016/j.bbcan.214-06-0003.

Rahman N, Seal S, Thompson D,. 2007. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. Nat Genet.39:165-167.

Rodriguez A., Rodriguez M., Cordoba J.J., Andrade M.J. 2015. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods Mol Biol*. 1275:31-56. Doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3.

Xia B1, Sheng Q., Nahanishi K., Ohashi A., Wu J., Christ N., Liu X., Jasin M., Couch FJ., Livingston DM 2006. Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2.*Mol Cell*. Jun 23;22(6):719-29.

Ye, J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I,.Rozen S., Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13:134.

http://atlasgeneticsoncology.org yang diakses tanggal 19 Maret 2019.

http://www.searo.who.int/entity/noncommunicable_diseases/documents/3-8-breast-cancer-phc.pdf yang diakses tanggal 16 Maret 2019.

https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/KNOWLEDGE-SUMMARY---PREVENTION.pdf yang diakses pada tanggal 16 Maret 2019.

https://www.molbiol-tools.ca yang diakses tanggal 16 Maret 2019.