**GENOTIPE SNP GEN *PLA2G10* T512C DAN T-123/IN1C PADA PENDERITA ANGINA PEKTORIS DI PUSAT JANTUNG NASIONAL HARAPAN KITA**

**JAKARTA, INDONESIA**

**T512C AND T-123/IN1C SNP *PLA2G10* GENOTYPE IN ANGINA PECTORIS PATIENTS AT NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER HARAPAN KITA JAKARTA, INDONESIA**

**Dzul Fithria Mumtazah\*1, Erlin Listiyaningsih2, Nastiti Wijayanti3**

*1Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung, Bandarlampung, Indonesia*

*2Stem Cell Facilities and Laboratory of Molecular Biology, Research and Development Division National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta, Indonesia*

*3 Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia*

*\*dzul.mumtazah@fmipa.unila.ac.id*

**ABSTRACT**

Angina Pectoris is one of the early symptoms which is a marker of severe cardiovascular problems such as coronary heart disease. The *PLA2G10* gene is believed to play a role whether in the atherosclerotic progression that causes plaque deposits which clog the coronary arteries of the heart or otherwise, antiatherogenic. *PLA2G10* polymorphism at SNP ID T512C (rs36072688) and T-123/in1C (rs4003232) play the role in altered the expression level of *PLA2G10* as sPLA2-GX coding gene which cause the rapid plaque progression in some groups of animal model and decrease it in some other.The objection of this research is to determine the genotype of *PLA2G10* gene in angina pectoris patients of National Cardiovascular Center Harapan Kita in order to define if the disease occurs because of the mutation. The research samples are 133 deposit biological materials (peripheral blood mononuclear cell) from National Cardiovascular Center Harapan Kita’s collection, from angina pectoris patients with plaque and non plaque in the coroner. The polymorphism was determined by TaqMan® SNP Genotyping Assay. The result shows that all the samples from angina pectoris patients in National Cardiovascular Harapan Kita have genotype homozigot wildtype (TT) at SNP ID T512C **(**rs36072688) and heterozygot (TC) at T-123/In1C (rs4003232) *PLA2G10* gene and there’s no polymorphism found in two groups of sample.

Key words: pla2g10, snp id, t512c, t-123/in1c, angina pectoris, polymorphism

**ABSTRAK**

Angina pektoris merupakan salah satu gejala awal yang menjadi penanda masalah kardiovaskuler berat seperti penyakit jantung koroner. Sementara gen *PLA2G10* dipercaya memiliki peran, baik dalam progresi aterosklerotik yang menyebabkan deposit plak dan penyumbatan pada arteri koroner, atau justru sebaliknya yaitu antiaterogenik. Polimorfisme *PLA2G10* pada titik SNP T512C (rs36072688) dan T-123/in1C (rs4003232) mampu mengubah level ekspresi gen *PLA2G10*  sebagai gen pengode enzim sPLA2-GX, yang memiliki peranan dalam meningkatkan progresi plak pada beberapa kelompok hewan model dan justu menurunkan proses pembentukan plak pada beberapa kelompok yang lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genotip dari *PLA2G10* pada titik SNP T512C (rs36072688) and T-123/in1C (rs4003232) para penderita angina pektoris dengan plak dan tanpa plak koroner di Pusat Jantung Nasional Harapan Kita untuk kemudian menentukan apakah terjadinya penyakit dikarenakan adanya mutasi. Sampel penelitian adalah bahan biologik tersimpan berupa *peripheral blood mononuclear cell* koleksi Divisi Litbang Rumah Sakit Jantung dan Pembuluh Darah Harapan Kita. Sampel berjumlah 113 yang berasal dari penderita *angina pectoris* dengan dan tanpa plak pada arteri koroner. Penelitian ini menunjukkan bahwa gen *PLA2G10* pada titik SNP T512C **(**rs36072688) memiliki genotip homozigot *wildtype* (TT) dan T-123/In1C (rs4003232) memiliki genotip heterozigot (TC) melalui metode TaqMan® SNP *Genotyping Assay*. Tidak ada polimorfisme yang ditemukan pada kedua grup sampel tersebut.

Kata kunci: pla2g10, snp id, t512c, t-123/in1c, angina pektoris, polimorfiisme

**Pendahuluan**

 Angina pektoris yang ditandai dengan rasa nyeri di bagian dada, merupakan suatu gejala yang sebagian besar dipicu oleh adanya *Coronary Heart Disease* (CHD). *Coronary heart disease* atau penyakit jantung koroner merupakan penyakit yang disebabkan karena penumpukan plak pada arteri koroner yang merupakan produk dari *coronary artery disease* (CAD) atau aterosklerosis yang terjadi di arteri koroner (“Coronary Artery Disease - Coronary Heart Disease | American Heart Association,” n.d.). Aterosklerosis sebagai salah satu penyakit inflamasi kronik merupakan penyakit yang disebabkan oleh kelainan metabolisme lipid dalam tubuh (Poupardin, Srisukontarat, Yunta, & Ranson, 2014)(Li, Shridas, Forrest, Bailey, & Webb, 2010). Aterosklerosis ditandai oleh adanya akumulasi lipid dan pembentukan *foam cell* yang disebabkan karena *uptake* *low-density lipoprotein* (LDL) termodifikasi. Modifikasi LDL berlangsung sebagai konsekuenssi dari oksidasi lipid maupun aksi katalitik dari serangkaian enzim, salah satunya adalah *secreted phospholipase A2* (sPLA2) (Riches & Porter, 2012). sPLA2 juga menjadi biomarker proses inflamatori dan memainkan peran yang penting dalam aterosklerosis (Santoso, Heriansyah, & Rohman, 2019).

 Pada 10 jenis enzim sPLA2 yang ada pada mammalia, sPLA2 Grup X (sPLA2-GX) adalah enzim fosfolipase yang memiliki kapasitas hidrolisis yang paling tinggi terhadap fosfatidilkolin (fosfolipid utama pada membran sel dan LDL) (Bezzine *et al*., 2000; Karabina *et al*., 2006) enzim ini memiliki potensi hidrolisis yang paling besar terhadap membran sel mammalia secara *in vitro* (Bezzine *et al*., 2000)*,* sehingga keberadaannya sangat aterogenik.

Pada penelitian yang lain dengan menggunakan mencit transgenik yang sudah dilakukan *knocked-down* pada gen *PLA2G10* sehingga gen ini tidak terekspresi, akumulasi kolagen pembentuk plak aterosklerotik justru meningkat dan ukuran *necrotic core* pada plak aterosklerotik naik menjadi empat kali lipat dibanding kontrol (PLA2G10+/+). Hal ini menunjukkan bahwa *PLA2G10* juga memiliki potensi sebagai antiaterogenik yang menghambat pembentukan plak sampai 50% (Ait-Oufella *et al*., 2013). Overekspresi sPLA2-GX juga justru secara signifikan menurunkan 50% akumulasi trigliserida paa sel adiposit (Li *et al*., 2010)yang merupakan faktor pemicu penting dalam obesitas yang juga pemicu progresi aterosklerosis.

 Penemuan adanya delapan titik mutasi pada gen PLA2G10 pengkode sPLA2-GX oleh Gora *et al.* (2009) menunjukkan adanya perubahan konformasi enzim yang bersangkutan, khususnya pada polimorfisme R38C secara *in vitro*. Meskipun demikian rendahnya alel minor yang ditemukan dalam populasi menunjukkan bahwa polimorfisme tersebut tidak berpengaruh signifikan secara *in vivo* (Guardiola *et al*., 2015)(Exeter, 2012)*.*

Mutasi berakibat pada kesalahan *folding* protein enzim yang menyebabkan sPLA2-GX inaktif secara katalitik dan cepat didegradasi dalam pengujian *in vitro*. Seperti yang diungkapkan Gora *et al.*(Gora *et al.*, 2009), mutasi genetik yang sifatnya fungsional dapat berakibat pada perubahan ekspresi protein dan/atau aktivitas enzimatik yang memiliki dampak besar pada peran enzim tersebut dalam patofisiologis dan respon akhir sPLA2-GX dalam progresi maupun proteksi aterosklerosis. Titik SNP T512C (rs36072688) yang terletak pada 5’ *untranslated region* PLA2G10, berlokasi pada bagian yang dipercaya sebagai promotor (*putative*) dan dikaitkan dengan penurunan resiko kardiovaskular di masa depan. Sedangkan SNP T-123/in1C yang terletak di intron nomor 1 berpotensi menggangu *alternative splicing* pada RNA yang akan ditranslasi. Hal tersebut memungkinkan mutasi berimplikasi terhadap ekspresi enzim yang sPLA2-GX (Gora *et al*., 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen *PLA2G10* pengkode sPLA2-GX pada titik T512C dan T-123/in1C khususnya pada kejadian angina pektoris.

**Metode**

 Sebanyak 133 sampel bahan biologik tersimpan (BBT) berupa pbmc dari pasien penderita *cardiovascular disease* (CVD) yang menjalani perawatan di Rumah Sakit Jantung dan Pembuluh Darah Harapan Kita (RSJPDHK) dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol tanpa kejadian plak (sampel dari pasien *coronary heart disease* atau CHD), dan kelompok dengan kejadian plak pada arteri koroner yang diketahui melalui CT *coroner*. Seluruh sampel berasal dari pasien ras melayu, 58 sampel berjenis kelamin perempuan dan 75 sampel berjenis kelamin laki-laki dengan rentang usia 40-80 tahun. Sampel koleksi litbang RSJPDHK yang berupa PBMC tersebut dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche®),untuk uji polimorfisme menggunakan metode SNP *Genotyping Assay* dengan reagen TaqMan® (Applied Biosystems®). Dua titik SNP yang diuji yaitu rs36072688 (T512C) dengan *forward* primer 5’ AGCCTGGCCAACATGGT 3’, dan *reverse* primer 5’ACCACGCCCGGCTAATTTT3’, sementara rs4003232 (T123/in1C) dengan *forward* primer 5’\_GGCTGTCTGGGTTTGAATCCT\_3’, dan *reverse* primer 5’\_ GGCCCAGAGAGGTTAAGAATTTGTC\_3’. Pengujian SNP dilakukan dengan menggunakan bantuan *real-time* qPCR (Applied Biosystems®).

**Hasil dan Pembahasan**

Pada kedua titik SNP yang diteliti, tidak ditemukan adanya polimorfisme dalam populasi ini. Data selengkapnya ditunjukkan oleh Tabel 1 berikut, yang menunjukkan bahwa seluruh sampel baik dengan plak dan tanpa plak pada titik SNP T512C memiliki genotip homozigot wildtype (TT), dan seluruh sampel pada T123/in1C memiliki genotip heterozigot (TC).

Pada penelitian ini ditambahkan satu titik SNP, yaitu rs76137801 (C/G) yang diidentifikasi oleh *Ensmbl Genome Browser*. Mutasi pada titik ini adalah *non sense mutation* yang mengindikasikan sekuens gen *PLA2G10* dihambat untuk ditranslasikan sepenuhnya, atau menyebabkan timbulnya stop kodon prematur. Perubahan nukleotida C menjadi G seperti yang diprediksikan oleh *software* pengidentifikasi mutasi fungsional (SIFT dan PolyPhen) menyebabkan berubahnya asam amino Arginin menjadi Glisin (R>G) dan bersifat *deleterious* serta merusak protein enzim yang seharusnya terbentuk. Namun tidak ada polimorfisme yang ditemukan pada titik SNP ini pada grup sampel.

Tabel 1. Frekuensi genotip gen *PLA2G10* pada pasien anginapektoris

|  |  |
| --- | --- |
| **Genotip** | **Jumlah Alel Terdeteksi (n=133)** |
| **T512C****rs36072688 (T/C)** | **T123/in1C****rs4003232 (T/C)** |
| **Wildtype** | TT133 (100%) | TT0 (0%) |
| **Heterozigot** | TC0 (0%) | TC133 (0%) |
| **Homozigot Mutan** | CC0 (0%) | CC0 (0%) |

Tabel 2. Frekuensi genotip gen *PLA2G10* SNP ID rs76137801 (C/G) pada pasien anginapektoris

|  |  |
| --- | --- |
| **Genotip** | **Jumlah Alel Terdeteksi (n=133)** |
| **Wildtype** | CC133(100%) |
| **Heterozigot** | CG0 (0%) |
| **Homozigot** | GG0 (0%) |

Pada populasi ini, seluruh genotip yang ditemukan pada rs76137801 adalah homozigot *wildtype* (Tabel 2), tidak ditemukan polimorfisme pada titik ini sama halnya dengan dua titik SNP lainnya. Gora *et al*. (2009) menemukan *minor allele frequency* (MAF) sebesar 0,32 (9,8% populasi mutan) untuk T512C dan 0,23 (5,7% populasi mutan) untuk T123/in1C pada populasi kaukasian di Eropa dalam penelitian sebelumnya. Perbedaan ras dapat menjadikan perbedaan hasil pada kedua penelitian ini, SNP T512C dan T123/in1C pada ras melayu dalam populasi ini tidak menunjukkan adanya polimorfisme.

(c)

(b)

(a)

Gambar 1. Kurva SNP Genotyping Assay *PLA2G10*, (a) rs4003232 sampel nomor satu (1) yang menunjukkan alel heterozigot (TC), (b) rs76137801 sampel nomor empat (4) yang menunjukkan alel homozigot wildtype (CC), dan (c) rs36072688 sampel nomor empat (4) yang menunjukkan alel homozigot wildtype (TT)

Dalam menguji polimorfisme, *single-nucleotide polymormphism* (SNP) banyak digunakan dalam menentukan titik mutasi pada gen tertentu, termasuk *PLA2G10*. SNP adalah variasi sekuens DNA yang terjadi pada satu nukleotida (A, T, C atau G) pada genom yang berbeda di antara anggota spesies biologis atau pasangan kromosom pada manusia. Variasi genetik ini mendasari perbedaan suseptibilitas seseorang terhadap suatu penyakit .(Murakami, Irie, & Shimizu, 2015). SNP merupakan variasi genetik yang paling umum terjadi pada manusia dan terjadi setiap satu kali dalam 100 sampai 300 pasangan basa (Musumeci *et al*., 2010). SNP juga merupakan marker genetik yang menentukan perubahan fenotip di antara individu (Suh & Vijg, 2005).

Tidak ditemukannya polimorfisme *PLA2G10* pada ketiga titik yang diteliti menunjukkan pasien angina pektoris pada kedua grup sampel memiliki gen *PLA2G10* yang normal, tanpa mutasi. Hal ini tidak mencegah kelompok pasien dari kejadian angina pektoris, meskipun terdapat limitasi untuk menyatakan bahwa gen ini lebih bersifat aterogenik, namun studi ini menunjukkan potensinya dalam progresi aterogenik. Hal tersebut dikarenakan, adanya mutasi pada ketiga titik SNP pada gen *PLA2G10* menurunkan resiko penyakit jantung koroner di masa depan. Namun dalam kelompok sampel kejadian ini nihil. Polimorfisme pada T-512C yang berlokasi pada ujung 5’ UTR *PLA2G10* diketahui memiliki hubungan dengan penurunan resiko kardiovaskular di masa depan selama studi kohort yang dilakukan oleh Gora *et al*. (2009). SNP yang terjadi pada promoter putatif dari *PLA2G10* ini diyakini mampu berimplikasi terhadap level ekspresi protein yang dihasilkannya. Sedangkan SNP T-123/in1C yang terletak di intron nomor 1 (Gora *et al*., 2009) berpotensi menggangu *alternative splicing* pada RNA yang akan ditranslasi.

Studi yang dilakukan oleh Gora *et al.* pada tahun 2009, menunjukkan adanya delapan titik polimorfisme *PLA2G10* (kromosom 16) pada populasi kaukasian di Eropa yang kemudian dilakukan uji genotipe lebih lanjut pada kasus-kasus khusus seperti *coronary artery disease* (CAD) dan infark miokardial (*myocardial infarction,* MI). Analisis ekspresi protein dan aktivitas enzimatik dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mengetahui sekresi aktif yang dihasilkan oleh *PLA2G10* menunjukkan bahwa mutasi secara jelas menurunkan jumlah total protein yang diproduksi oleh sel COS-7 yang dikultur, mencegah sekresi efisiennya, dan berakibat pada tidak terdeteksi dan/atau rendahnya aktivitas enzimatis sPLA2-GX.

**Simpulan dan Saran**

Seluruh sampel pada titik SNP T512C adalah homozigot *wildtype* (TT) dan pada titik SNP T123/in1C adalah heterozigot (TC). Tidak ada polimorfisme yang ditemukan pada kedua titik tersebut, semua sampel dalam dua grup yaitu plak dan non plak memiliki genotipe normal. Penelitian selanjutnya dapat mempelajari letak SNP yang berbeda pada gen *PLA2G10* dan juga memperbesar jumlah sampel.

**Ucapan Terima Kasih**

Terima kasih kepada dr. Renan Sukmawan, S.T., Sp.JP (K), Ph.D., MARS., dan Dr. dr. Anwar Santoso, SpJP (K), FIHA yang telah memfasilitasi penelitian tesis ini; juga kepada staf di Divisi Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Jantung dan Pembuluh Darah Harapan Kita Jakarta yang telah memberikan izin penulis menjadi bagian dalam penelitian dan memfasilitasi penelitian ini di Laboratorium Biologi Molekular Divisi Litbang Harapan Kita.

**Daftar Pustaka**

Ait-Oufella, H., Herbin, O., Lahoute, C., Coatrieux, C., Loyer, X., Joffre, J., … Mallat, Z. (2013). Group X secreted phospholipase A2 limits the development of atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(3), 466–473. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300309

Bezzine, S., Koduri, R. S., Valentin, E., Murakami, M., Kudo, I., Ghomashchi, F., … Gelb, M. H. (2000). Exogenously added human group X secreted phospholipase A2 but not the group UB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3179–3191. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3179

Coronary Artery Disease - Coronary Heart Disease | American Heart Association. (n.d.). Retrieved April 20, 2020, from https://www.heart.org/en/health-topics/consumer-healthcare/what-is-cardiovascular-disease/coronary-artery-disease

Exeter, H. J. (2012). *The genetic architecture of secretory PLA2 (sPLA2) genes and their impact on sPLA2 activity/mass and association with CHD risk.* University College London.

Gora, S., Perret, C., Jemel, I., Nicaud, V., Lambeau, G., Cambien, F., … Karabina, S. A. (2009). Molecular and functional characterization of polymorphisms in the secreted phospholipase A2 group X gene: Relevance to coronary artery disease. *Journal of Molecular Medicine*, *87*(7), 723–733. https://doi.org/10.1007/s00109-009-0483-y

Guardiola, M., Exeter, H. J., Perret, C., Folkersen, L., Van’T Hooft, F., Eriksson, P., … Talmud, P. J. (2015). PLA2G10 Gene Variants, sPLA2 Activity, and Coronary Heart Disease Risk. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *8*(2), 356–362. https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000633

Karabina, S. A., Brochériou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., … Ninio, E. (2006). Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB Journal*, *20*(14). https://doi.org/10.1096/fj.06-6018fje

Li, X., Shridas, P., Forrest, K., Bailey, W., & Webb, N. R. (2010). Group X secretory phospholipase a2 negatively regulates adipogenesis in murine models. *FASEB Journal*, *24*(11), 4313–4324. https://doi.org/10.1096/fj.10-154716

Murakami, K., Irie, K., & Shimizu, T. (2015). Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline: Potential Role of Vitamin C in the Prevention of Alzheimer’s Disease. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407824-6.00061-6

Musumeci, L., Arthur, J. W., Cheung, F. S. G., Hoque, A., Lippman, S., & Reichardt, J. K. V. (2010). Single Nucleotide Differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Human Mutation*, *31*(1), 67–73. https://doi.org/10.1002/humu.21137

Poupardin, R., Srisukontarat, W., Yunta, C., & Ranson, H. (2014). Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector Aedes aegypti. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(3), e2743. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002743

Riches, K., & Porter, K. E. (2012). Lipoprotein(a): Cellular effects and molecular mechanisms. *Cholesterol*, Vol. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/923289

Santoso, A., Heriansyah, T., & Rohman, M. S. (2019). Phospholipase A2 is an Inflammatory Predictor in Cardiovascular Diseases: Is there any Spacious Room to Prove the Causation? *Current Cardiology Reviews*, *16*(1), 3–10. https://doi.org/10.2174/1573403x15666190531111932

Suh, Y., & Vijg, J. (2005, June 3). SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 573, pp. 41–53. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.005