



Genotype *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP) Gen *PLA2G10* T512C dan T-123/IN1C pada Penderita Angina Pektoris di Pusat Jantung Nasional Harapan Kita Jakarta, Indonesia

SNP Genotype of *PLA2G10* Gene at T512C and T-123/IN1C in Angina Pectoris Patients at National Cardiovascular Center Harapan Kita Jakarta, Indonesia

Dzul Fithria Mumtazah^{1*}, Erlin Listiyaningsih², Nastiti Wijayanti³

¹*Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung, Bandar Lampung*

Jl. Prof. Sumantri Brodjonegoro No. 1 Gedung Meneng Rajabasa, Bandar Lampung, Indonesia

²*Stem Cell Facilities and Laboratory of Molecular Biology, R&D NCC Harapan Kita*

Jl. Letjen S. Parman No. Kav. 87, Kec. Palmerah, Kota Jakarta Barat, DKI Jakarta 11420, Indonesia

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

Jl. Teknika Sel., Sinduadi, Kec. Mlati, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

Email: dzul.mumtazah@fmipa.unila.ac.id

*Penulis Korespondensi

Abstract

Angina pectoris is one of the early symptoms that can be a marker of severe cardiovascular problems such as coronary heart disease. While the *PLA2G10* gene is believed to have a role, either in an atherosclerotic progression that causes plaque deposits and blockage in coronary arteries or on the contrary, which is antiatherogenic. *PLA2G10* polymorphisms at SNP points T512C (rs36072688) and T-123/in1C (rs4003232) were able to change the expression level of the *PLA2G10* gene as the gene encoding the sPLA₂-GX enzyme. This study aims to determine the genotype of *PLA2G10* at SNP points T512C (rs36072688) and T-123/in1C (rs4003232) in angina pectoris patients and study the disease is caused by mutations or not. The research sample was stored biological material in the form of peripheral blood mononuclear cell collection of the Research and Development Division of Harapan Kita Cardiovascular Hospital. A total of 113 samples came from patients with angina pectoris with and without plaque in the coronary arteries. The results of this study indicate that the *PLA2G10* gene at the SNP point T512C (rs36072688) has a wild-type homozygous genotype (TT) and T-123/In1C (rs4003232) has a heterozygous genotype (TC) through the TaqMan® SNP Genotyping Assay method, and no polymorphisms were found in the two sample groups.

Keywords: *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. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genotip dari *PLA2G10* pada titik SNP T512C (rs36072688) and T-123/in1C (rs4003232) para penderita angina pektoris dan mengkaji apakah penyakit disebabkan karena mutasi. Sampel penelitian berupa *peripheral blood mononuclear cell* koleksi Divisi Litbang Rumah Sakit Jantung dan Pembuluh Darah Harapan Kita. Sampel berjumlah 113, berasal dari penderita angina pektoris dengan dan tanpa plak pada arteri koroner. Hasil penelitian 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, dan tidak ada polimorfisme yang ditemukan pada kedua grup sampel tersebut.

Kata kunci: *PLA2G10*, SNP ID, T512C, T-123/IN1C, angina pektoris, polimorfisme

Diterima: 16 Juni 2020, disetujui: 20 September 2020

Pendahuluan

Angina pectoris 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 (American Heart Association, 2016). Aterosklerosis sebagai salah satu penyakit inflamasi kronik merupakan penyakit yang disebabkan oleh kelainan metabolisme lipid dalam tubuh (Poupart *et al.*, 2014) (Li *et al.* 2010). Aterosklerosis ditandai dengan adanya akumulasi lipid dan pembentukan *foam cell* yang disebabkan karena *uptake low-density lipoprotein* (LDL) termodifikasi. Modifikasi LDL berlangsung sebagai konsekuensi 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 *et al.*, 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 atherogenik.

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 secara signifikan menurunkan 50% akumulasi trigliserida pada 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.*, (2009), mutasi genetik yang sifatnya fungsional dapat berakibat pada perubahan ekspresi protein dan/atau aktivitas enzimatis 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 mengganggu *alternative splicing* pada RNA yang akan ditranslasi. Hal tersebut memungkinkan mutasi berimplikasi terhadap ekspresi enzim 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 pectoris.

Metode Penelitian

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 diekstraksi DNA-nya dengan menggunakan kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche®), untuk uji polimorfisme dengan metode SNP *Genotyping Assay* reagen TaqMan® (Applied Biosystems®). Dua titik SNP yang diuji yaitu rs36072688 (T512C) dan rs4003232 (T123/in1C). Uji SNP di titik rs36072688 (T512C) menggunakan primer *forward* 5' AGCCTGGCCAACATGGT 3', dan primer *reverse* 5' ACCACGCCCGGCTAATTTT3', sedangkan uji SNP di titik rs4003232 (T123/in1C) menggunakan primer *forward* 5' GGCTGTCTGGGTTTGAATCCT 3', dan primer *reverse* 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. 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). Data selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 1.

Pada penelitian ini ditambahkan satu titik SNP, yaitu rs76137801 (C/G) yang diidentifikasi oleh *Ensembl 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.

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.

Tabel 1. Frekuensi genotip gen *PLA2G10* pada pasien angina pektoris

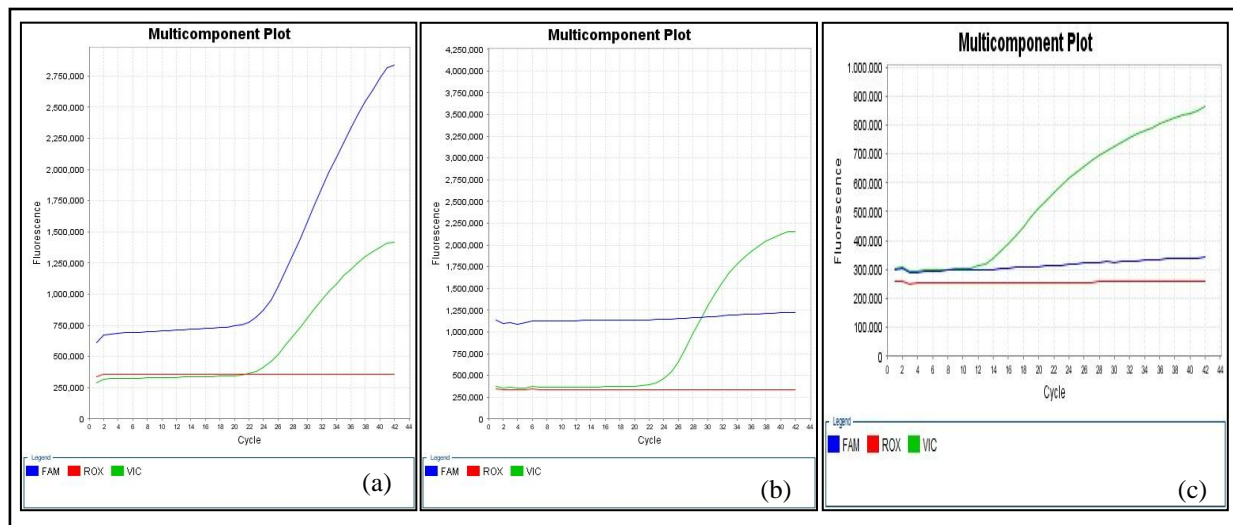
Genotip	Jumlah Alel Terdeteksi	
	T512C rs36072688 (T/C)	T123/in1C rs4003232 (T/C)
Wildtype (TT)	133	0
Heterozigot (TC)	0	133
Homozigot Mutan (CC)	0	0

Keterangan: n (jumlah total sampel) = 133

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

Genotip	Jumlah Alel Terdeteksi (n=133)
Wildtype (CC)	133
Heterozigot (CG)	0
Homozigot (GG)	0

Keterangan: n (jumlah total sampel) = 133



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); (c) rs36072688 sampel nomor empat (4) yang menunjukkan alel homozigot wildtype (TT)

Analisis polimorfisme, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) banyak digunakan untuk menentukan titik mutasi pada gen tertentu, termasuk *PLA2G10*. SNP merupakan variasi sekuens DNA yang terjadi pada satu nukleotida (A, T, C atau G) pada gen yang dimiliki suatu 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 pectoris pada kedua grup sampel memiliki gen *PLA2G10* yang normal, tanpa mutasi. Hal ini tidak mencegah kelompok pasien dari kejadian angina pectoris, 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 mengganggu *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 lanjutan kasus-kasus khusus seperti *coronary artery disease* (CAD) dan infark miokardial (*myocardial infarction*, MI). Analisis ekspresi protein dan aktivitas enzimatis 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

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 ini dan 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>
- American Heart Association. 2016. *Coronary Heart Disease*. <https://www.heart.org/en/health-topics/consumer-healthcare/what-is-cardiovascular-disease/coronary-artery-disease>. Diakses tanggal 20 April 2020
- 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). 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>