

POLIMORFISME ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR-2 PADA POPULASI INDIVIDU NORMAL DAN LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY

POLYMORPHIC VARIANTS OF ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR-2 IN INDIVIDUALS OF NORMAL POPULATION AND LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY

Diana Lyrawati*, Krisna Bayu Tambunan**, Herlina Y Handoko***, Herawati Sudoyo****, and Sangkot Marzuki*****

* Lab. Farmasi Fakultas Kedokteran Unibraw / RSU dr. Saiful Anwar Malang

** Institut Pertanian Bogor

*** Queensland Institute of Medical Research, University of Queensland, Brisbane, Australia

**** Eijkman Institute for Molecular Biology Jakarta

ABSTRACT

In this study we investigated the polymorphism of ANT2, an integral protein of mitochondrial inner-membrane, in individuals of normal population and patients of a mitochondrial respiratory chain disease Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON). DNA sequencing analysis demonstrated that there were sequence variation in ANT2 namely base substitutions G332T, C699T, C1021T, insertion of C and T and deletion of A, C, and C at nucleotide 20, 1127, 1022, 1075 and 1123, respectively (numbering based on mRNA sequence). The G332T resulted in amino acid change (R111L) and was predicted to alter the hidrophobicity pattern of Ant2 protein. PCR-RFLP analysis with HhaI restriction enzyme showed that both 111R and 111L variants were found in normal population of Caucasian, Chinese, Indonesian-Javanese, Mandar, Batak Toba and Papuan at different ratio (59%:41%, 61%:39%, 78%:22%, 64%:36%, 77%:23%, and 80%:20% respectively). Similar PCR-RFLP analysis was performed on samples of individuals carrying mtDNA mutation G11778A with and without characteristic manifestation of LHON to determine whether the ANT2 polymorphism was associated with clinical manifestation of mtDNA mutation. The data showed that the distribution of 111R and 111L between the two groups was different (Fischer Exact: $\alpha=0,05$; $P=0,0262$). The ratio was 79,07%:20,93% in the group with typical manifestation of LHON and 56.52%:43.48% in the group without LHON manifestation. Inferred from the data, 111L may have protective effect against the manifestation of LHON, whereas 111R may induce the manifestation of LHON. Further studies are warranted to clarify the potential role of the polymorphism of R111L (G332T) of ANT2 as a nuclear modifier of the LHON G11778A mutations.

Key words: Adenine nucleotide translocator; ANT2; polymorphism, Leber's Hereditary Optic Neuropathy.

PENDAHULUAN

Adenine nucleotide translocator (ANT) atau yang dikenal juga sebagai translokator ADP/ATP adalah protein integral membran-dalam mitokondria yang berperan dalam pertukaran ATP dan ADP antara kawasan ekstra dan intramitokondria, menghubungkan proses produksi dan penggunaan ATP serta mengatur kecepatan oksidasi fosforilasi dan proses penggunaan energi. Pada penelitian ini dilakukan studi terhadap ANT2, salah satu dari 3 isoform ANT yang penting dalam metabolisme mitokondria. ANT2 berperan pada kesetimbangan ATP-ADP antara mitokondria dan sitosol pada sel anaerob (1). Pada beberapa keadaan seperti pada sel yang tidak mengandung DNA mitokondria, sel neoplastik dan sel fibroblas yang distimulasi untuk mem-

belah dengan cepat ekspresi ANT2 akan meningkat (2-4).

Dari pola ekspresi gen ANT2 nampaknya protein ini berperan pada penyediaan ATP glikolisis untuk jalur metabolisme mitokondria dan replikasi DNA mitokondria (5). Dengan titik tolak pemikiran bahwa perbedaan sekuens dapat mempengaruhi ekspresi dan fungsi protein Ant2 dalam metabolisme energi mitokondria, dan oleh karena itu mungkin berasosiasi dengan keadaan patologis tertentu, maka dalam penelitian ini dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui distribusi polimorfisme varian polimorfik R111L ANT2, baik pada populasi normal maupun pada individu penderita penyakit rantai respirasi mitokondria. Penelitian ini bertujuan untuk menjawab beberapa pertanyaan, yaitu (1) apakah terdapat variasi pada sekuens gen ANT2 manusia (2) kalau terdapat variasi, apakah variasi sekuens tersebut cukup bermakna untuk mempengaruhi/mengubah konformasi protein Ant (3) apakah variasi sekuens yang ditemukan pada gen

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXII, No.1, April 2006
Korespondensi: Diana Lyrawati; Lab. Farmasi Fakultas
Kedokteran Unibraw; Jl. Veteran Malang 65145; Telp. (0341)
569117, 323676; e-mail eldi_7_98@yahoo.com

ANT2 merupakan polimorfisme yang umum ditemukan pada populasi individu normal (4) apakah ada perbedaan distribusi dari berbagai varian ANT2 pada bermacam populasi dunia (5) apakah variasi sekuens ANT2 mempengaruhi manifestasi mutasi patologis pada DNA mitokondria (mtDNA).

Untuk dapat menjawab pertanyaan di atas sekuens DNA gen ANT2 dari beberapa individu ditentukan dengan cara sekuensing daerah penyandi asam amino (ekson 1, 2, 3 dan 4). Dalam penelitian ini ditemukan adanya beberapa variasi sekuens ANT2. Salah satu dari variasi tersebut mungkin penting karena mengakibatkan perbedaan asam amino (R111L) yang mengubah pola hidrofobisitas protein Ant2. Analisis lebih lanjut dilakukan untuk mengetahui distribusi polimorfisme varian polimorfik R111L ANT2 pada populasi normal maupun pada individu penderita penyakit rantai respirasi mitokondria.

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), salah satu penyakit rantai respirasi mitokondria, dipilih sebagai kasus yang mungkin berkaitan dengan adanya polimorfisme pada ANT2. Mutasi patologis LHON terletak pada mtDNA (11778G>A; R340H pada subunit ND4 kompleks I rantai respirasi). Telah diketahui bahwa pada individu/anggota keluarga yang membawa mutasi mtDNA 11778G>A yang sama menunjukkan manifestasi klinik yang berbeda (6). Perbedaan ini diusulkan karena adanya faktor pengubah ekspresi di DNA inti (*nuclear modifier*). Berdasarkan karakteristik yang dijumpai pada kelainan LHON yaitu usia awitan (*onset*) yang lebih muda pada laki-laki serta penderita LHON laki-laki lebih banyak daripada wanita, mungkin faktor *nuclear modifier* tersebut terletak pada kromosom X. Sebagai salah satu gen yang terletak pada kromosom X dan yang juga berperan pada metabolisme mitokondria, maka ANT2 merupakan salah satu kandidat *nuclear modifier*. Pada penelitian ini dipelajari apakah polimorfisme yang ditemukan pada sekuens DNA ANT2 berasosiasi dengan ekspresi/manifestasi klinik mutasi mtDNA 11778G>A dalam bentuk neuropati optik.

METODE

Sampel yang digunakan

Sampel yang digunakan berasal dari populasi normal dan penderita LHON.

Untuk analisis sekuensing, penelitian dilakukan menggunakan sampel dari keluarga pasien LHON Jambi untuk mewakili 3 kelompok, yaitu:

1. Individu dengan mutasi homoplasmis mtDNA G11778A yang menunjukkan manifestasi klinik, diwakili oleh EIJBIII-4-194.
2. Individu dengan mutasi homoplasmis mtDNA G11778A tanpa manifestasi klinik, diwakili oleh EIJBIII-23-194.
3. Individu tanpa mutasi mtDNA yang berasosiasi dengan LHON dari populasi normal sebagai pembanding,

diwakili oleh EIJBIII-23-194 dari keluarga LHON Jambi dan EIJ205-196 yang bukan dari keluarga LHON.

Untuk analisis situs restriksi varian sekuens ANT2 (G332T) digunakan sampel dari populasi Cina (58 orang), Kaukasia (56 orang), serta Indonesia Jawa (62 orang), sedangkan untuk pasien LHON diambil sebagian dari keluarga pasien LHON dari etnik Jawa (Cirebon dan Purwodadi), Sunda (Karawang), Cina (Jambi), Betawi, dan Kaukasia (Australia Barat).

Pengambilan sampel dilakukan setelah *informed consent* diperoleh dari setiap individu untuk kelompok populasi normal dan dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah disetujui oleh Komisi Etik Lembaga Eijkman. Sampel darah dan rambut pasien dikumpulkan sebagai bagian dari prosedur diagnostik, dan analisis genetika molekuler lebih lanjut dilakukan berdasarkan *informed consent*. Semua sampel dari populasi normal dan sampel pasien dari Indonesia diambil di praktek dokter pribadi di Subang dan Cirebon (Jawa Barat), di Rumah Sakit Karyadi di Semarang (Jawa Tengah), di Rumah Sakit Jambi di Sumatera, dan di Lembaga Eijkman di Jakarta. Sampel pasien dari Australia diambil di Rumah Sakit di Australia Barat. Sampel DNA diekstraksi dari darah atau rambut berdasarkan prosedur standar (7).

Deteksi variasi sekuens DNA

Analisis variasi sekuens ANT2 dilakukan dengan cara sekuensing DNA. Fragmen DNA diperbanyak dengan metode PCR pada Perkin Elmer 9700 Gene Amp System (kondisi dan primer PCR tercantum pada Tabel 1). Produk PCR kemudian langsung dipurifikasi (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega) atau diekstraksi dari gel agarose setelah elektroforesis (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen) sesuai dengan prosedur kit. DNA hasil purifikasi digunakan untuk kloning-sekuensing (manual/radioaktif) atau langsung untuk sekuensing otomatis. Kloning menggunakan pGem-T vector (Promega), transformasi ke dalam *E. coli* JM101 dan seleksi transforman menggunakan ampisilin dilakukan berdasarkan prosedur standar (8).

Purifikasi DNA plasmid transforman (yang mengandung DNA sisipan yang dikehendaki) dilakukan sesuai petunjuk kit (Minipreps Wizard Purification, Promega). DNA plasmid transforman atau DNA hasil PCR yang keduanya telah dipurifikasi digunakan untuk reaksi sekuensing menggunakan semua primer *forward* dan *reverse* seperti yang digunakan pada PCR. Sekuensing manual dilakukan menggunakan T7 Sequencing Reaction Kit (Promega) pada Sequi-Gen Nucleic Acid System (BioRad), sedangkan sekuensing secara otomatis dengan Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystem) pada mesin Automatic 377 DNA Sequencer (ABI-Perkin Elmer).

Tabel 1 Kondisi PCR untuk ANT2

Daerah (panjang fragmen, pb)	Primer		Kondisi siklus PCR	Produk PCR (pb)
	Forward	Reverse		
Ekson 1 (179)	F1871 (nt1871-1890)	R2199 (nt2199-2169)	95°C, 5 min; 95°C, 1 min-63°C, 1 min-72°C, 2 min (29X); 72°C, 2 min	328
Ekson 2 (487)	F3071 (nt3071-3090)	R3679 (nt3679-3659)	95°C, 5 min; 95°C, 1 min-54°C, 1 min-72°C, 2 min (29X); 72°C, 2 min	608
Ekson 3 (141)	F3771 (nt3771-3790)	R4029 (nt4029-4010)	95°C, 5 min; 95°C, 1 min-50°C, 1 min-72°C, 2 min (29X); 72°C, 2 min	258
Ekson 4 (419)	F4291 (nt4291-4311)	R4831 (nt4831-4812)	95°C, 5 min; 95°C, 1 min-45°C, 1 min-72°C, 2 min (29X); 72°C, 2 min	540

Sequence alignment

Alignment dan analisis sekuens dilakukan menggunakan program DNASTar. Sebagai referensi digunakan sekuens DNA dan protein ANT2 dari database NCBI. Untuk DNA total ANT2 digunakan referensi NCBI *accession number* M57424 atau J05624 (9) dan L78810 (10); sebagai referensi urutan basa pada ekson dan CDS digunakan juga J03591 (11) dan J02683 (4); sedangkan untuk sekuens asam amino dan protein digunakan *Swissprot* P05141 dan NCBI ID 1381112.

Prediksi struktur sekunder protein Ant2

Analisis prediksi struktur sekunder protein Ant2 dilakukan dengan program DNASTar dan program *PredictProtein* Heidelberg (EMBL).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Analisis PCR-RFLP dilakukan untuk mendeteksi adanya polimorfisme DNA pada CDS G332T pada ekson 2 (pada studi ini disebut juga sebagai variasi asam amino R111L). Fragmen DNA ANT2 ekson 2 hasil perbanyakan PCR (lihat prosedur PCR di atas) didigesti menggunakan enzim *HhaI* (NEB) kemudian hasil digesti dipisahkan pada gel agarosa 1%.

HASIL PENELITIAN

Variasi Polimorfik Ditemukan pada Sekuens ANT2

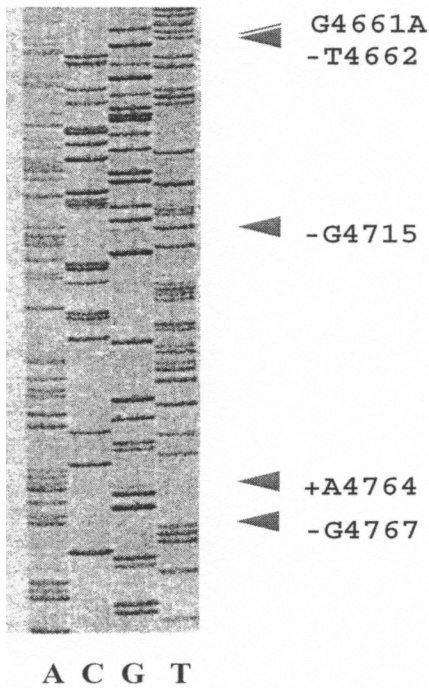
Analisis sekuens DNA untuk mendeteksi adanya varian dilakukan terhadap sekuens DNA ANT2 keempat individu Indonesia yang diperiksa pada studi ini dan 4 laporan sekuens ANT2 yang telah dipublikasi (lihat Metode). Hasil *alignment* sekuens DNA menunjukkan adanya beberapa perbedaan pada sekuens DNA ANT2.

a. Varian Nukleotida ANT2 pada daerah yang tidak menyandi

Analisis perbandingan sekuens dari keempat individu Indonesia dan sekuens ANT2 dari beberapa peneliti lain yang telah dipublikasi menunjukkan adanya perbedaan pada daerah yang tidak ditranslasi (*untranslated region, UTR*) ekson 1 dan ekson 4. Pada nukleotida ke 20 sekuens ekson 1 (atau posisi 1992 gen ANT2), yang diperoleh dari sekuensing otomatis, dijumpai adanya insersi GC pada semua individu yang diperiksa (EI205-196, EIJBIII-23-194, EIJBIV-58-194 dan EIJBIII-4-194) bersesuaian dengan sekuens yWXD703 dari individu lain yang tidak diketahui etniknya (10).

Sedangkan sekuens ANT2 dari individu lain yang juga tidak diketahui etniknya, ANT2Clone1 (9), pada posisi yang sama tidak menunjukkan adanya GC (data tidak diperlihatkan). Hasil sekuensing manual ANT2 ekson 4 dari empat individu yang diteliti, sekuens pHAT3 (11) dan yWXD703 menunjukkan perbedaan dengan sekuens ANT2Clone 1. Perbedaan sekuens gen ANT2 ini terletak pada nukleotida posisi 4661 (C>T); pada 4662, 4715, 4767 terjadi delesi A, C, C dan pada 4764 terjadi insersi T (Gambar 1). Posisi nukleotida tersebut bersesuaian dengan posisi nukleotida 1022, 1023, 1075, 1126, dan 1123 mRNA di daerah UTR ekson 4. Perbedaan nukleotida di atas mungkin tidak terlalu berpengaruh karena daerah tersebut tidak menjadi *mature* protein.

EIJbIV-58-194



Gambar 1. Autoradiogram fragmen ANT2 ekson 4. Autoradiogram diperoleh menggunakan R4831 sebagai primer sekuensing. Tanda panah menunjukkan posisi dan nukleotida yang berbeda dengan sekuens ANT2Clone1

b. Perbedaan Nukleotida pada Daerah yang menyandi Asam Amino

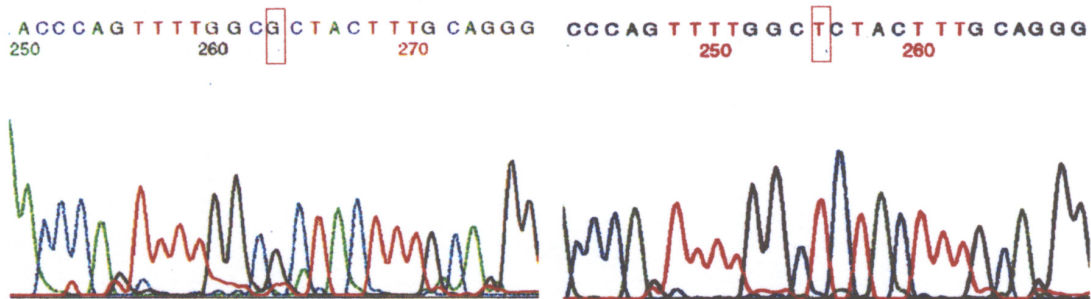
Analisis *alignment* sekuens pada darah yang menyandi asam amino menunjukkan dua perbedaan nukleotida pada ekson 2 dan 3. Pada ekson 2 ditemukan varian G332T (penomoran berdasarkan urutan nukleotida penyandi asam amino/coding sequence, CDS), sedangkan pada ekson 3 ditemukan varian C699T.

Pada ekson 2, sekuens EI205-196, EIJBIII23-194, hp2F1 (4) dan Ant2Clone1 menunjukkan nukleotida G pada posisi 332. Sedangkan sampel EIJBIV-58-194, EIJBIII-4-194 dan sekuens pHAT3 menunjukkan nukleotida T (data tidak diperlihatkan). Dari analisis *alignment* sekuens diketahui bahwa perbedaan nukleotida 332G>T ini menimbulkan perubahan asam amino dari arginin (R) menjadi leusin (L) pada sekuens asam amino ke 111.

Sedangkan pada ekson 3, analisis keempat sekuens individu yang diperiksa dan pHAT3 menunjukkan perbedaan dengan sekuens hp2F1 maupun Ant2Clone1 yaitu 699C>T (data tidak diperlihatkan). Namun perbedaan ini tidak mengakibatkan perubahan asam amino.

EIJbIII-23-194 (F3071)

EIJbIV-58-196 (F3071)



Gambar 2. Elektroferogram ANT2 fragmen ekson 2. Elektroferogram di atas diperoleh menggunakan F3071 sebagai primer sekuensing. Kotak merah memperlihatkan nukleotida 332G>T (CDS).

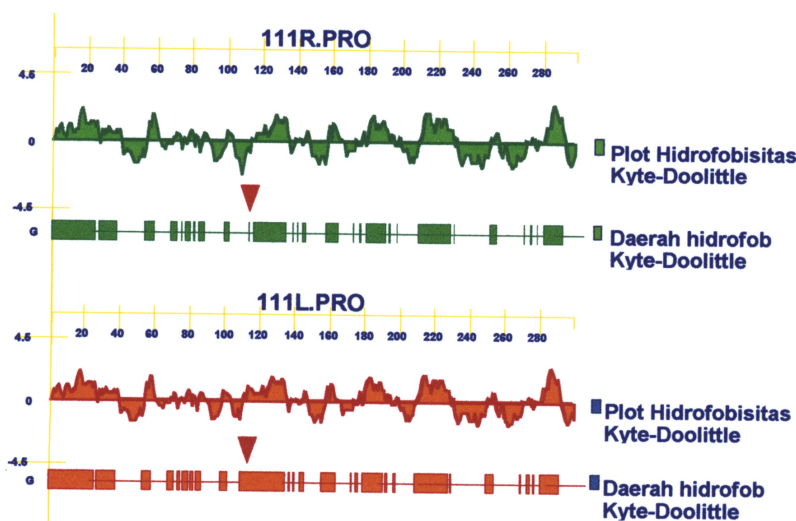
Sifat Asam Amino Arginin Berbeda Bermakna dengan Leusin

Varian G332T yang mengubah asam amino yang disandi menjadi R111L mungkin berarti penting untuk fungsi Ant. Asam amino arginin bersifat hidrofil dan polar, sangat berbeda dibandingkan dengan leusin. Asam amino polar kebanyakan berada di permukaan protein, sedangkan asam amino hidrofob hampir selalu berada di bagian dalam protein. Pada struktur terlipat, asam amino seperti leusin, fenilalanin, isoleusin dan metionin cenderung berada di bagian dalam (*fully buried*), sedangkan golongan asam amino yang bermuatan seperti arginin, lisin, histidin glutamin dan asam aspartat cenderung terpajan pada permukaan (12).

Oleh karena itu perbedaan asam amino R111L nampaknya akan mengubah konformasi protein Ant2. Namun untuk mengetahui perubahan struktur protein yang terjadi yang diakibatkan oleh polimorfisme tersebut tidak mudah karena tergantung pada lokasi asam amino (lingkungan asam amino di sekitar arginin/leusin 111 pada struktur *folded*) dan lingkungan tempat protein berada.

Sampai studi ini selesai dilakukan belum ada publikasi struktur tiga dimensi dari protein Ant2, baik secara kristalografi X-ray maupun *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), oleh karena itu sebagai awal untuk mengetahui hubungan antara struktur dan fungsi Ant2 dilakukan studi prediksi struktur sekunder. Perbandingan sekuens telah umum dilakukan untuk menguji homologi dan mengetahui motif serta tempat/pola fungsional protein. Prediksi ini dilakukan dengan bantuan komputer baik melalui analisis profil hidrofobitas, fleksibilitas, peta distribusi muatan maupun motif protein.

Dari studi ini dapat dibuat perkiraan bagian dari protein yang membentuk *domain* tertentu dan yang terletak pada transmembran. Hasil analisis prediksi struktur sekunder terhadap sekuens hasil sekuensing menunjukkan bahwa polimorfisme R111L mempengaruhi struktur sekunder protein Ant2. Pola hidrofobitas pada varian yang mengandung arginin pada posisi 111 berbeda dengan varian yang mengandung leusin (Gambar 3).



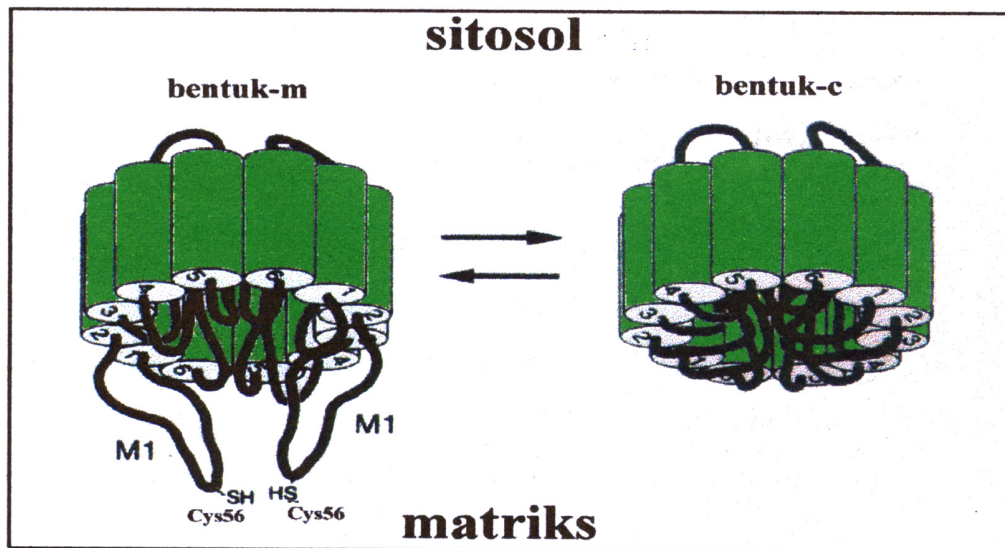
Gambar 3. Pola hidrofobitas Ant2. Perbedaan pola hidrofobitas Ant2 yang mengandung arginin atau leusin pada posisi 111 ditunjukkan dengan tanda panah.

Dari *database* dan analisis prediksi struktur sekunder diketahui bahwa Ant memiliki pola spesifik 3 ulangan sekuens seperti yang umum ditemukan pada golongan protein pembawa pada mitokondria (*mitochondrial carrier protein/MCP*), 3 domain transmembran (asam amino 12-29, 73-91, 117-134, 176-195, 214-231, dan 273-291) dan 2 *loop* hidrofilik. Analisis sekuens ANT2 menggunakan program Predictprotein (Heidelberg, EMBL) memberikan gambaran bahwa asam amino 111 baik arginin maupun

leusin akan membentuk struktur *loop* M2 (antara segmen transmembran 2 dan 3) pada bagian luar membran (data tidak diperlihatkan). Dari studi *cross-linking* (13) diketahui bahwa perubahan konfigurasi *loop* berhubungan dengan fungsi pertukaran ADP/ATP (lihat Gambar. 4). Perbedaan asam amino pada *loop* M2 mungkin tidak terlalu berpengaruh pada translokasi ADP/ATP dibanding jika terletak pada *loop* M1 yang menentukan membukanya 'gerbang' saluran. Namun perubahan R111L

mungkin mengubah konformasi *loop* M2 sedemikian rupa sehingga mempengaruhi pembentukan saluran pada dimer Ant2 tempat terjadinya translokasi nukleotida. Pada penelitian yang menggunakan teknik mutagenesis pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* (disebut sebagai ADP/ATP Carrier/AAC2) penggantian arginin yang terletak pada transmembran menjadi asam amino yang bersifat netral ternyata mengubah aktivitas AAC2 (14). Arginin AAC2 khamir yang diubah adalah arginin yang dipertahankan pada semua sekuens ANT, yaitu R96A, R204L dan R294A pada heliks transmembran kedua dan triplet R251I, R253I, dan R254I yang terletak pada domain terakhir (15). Perubahan di atas, kecuali R294, mengubah pola dan kecepatan tranpor AAC2 khamir. Dari studi tersebut terlihat bahwa modifikasi asam amino arginin pada posisi tertentu mempengaruhi ekspresi dan aktivitas AAC2.

Arginin khamir yang diubah di atas disesuaikan dengan arginin Ant2 manusia pada posisi: 80, 188, 280 dan triplet 235, 236, dan 237. Studi *cross-linking* juga menunjukkan asam amino tertentu yang terlibat pada pengikatan nukleotida yang akan ditranslokasikan, namun apakah R111L ikut berperan pada proses pengikatan, baik langsung maupun tidak langsung, belum diketahui. Prediksi struktur sekunder protein umumnya memang hanya memberikan gambaran struktur dengan nilai akurasi antara 55-65% dibanding struktur protein yang sesungguhnya. Oleh karena itu untuk mengetahui sejauh mana dan seberapa penting perubahan struktur yang berasosiasi dengan variasi asam amino R111L pada Ant2 berpengaruh pada konformasi dan fungsi protein sebagai translokator ADP/ATP masih diperlukan studi lebih lanjut.



Gambar 4. Model perubahan konformasi loop dimer Ant pada translokasi ADP/ATP. Model di atas menggambarkan dimer Ant yang terbentuk dari 2 polipeptida. Monomer Ant membentuk 6 segmen transmembran dan *loop* hidrofilik. Pada bentuk-m, sepasang *loop* M1 (antara transmembran 1 dan 2) muncul keluar ke arah matriks, sedangkan *loop* M2 (antara segmen transmembran 3 dan 4) dan *loop* M3 (antara segmen transmembran 5 dan 6) masuk ke dalam ruang yang akan melewati nukleotida adenin. Pada bentuk-c, *loop* M1 akan masuk ke bagian lintasan, sedangkan *loop* M2 dan M3 tetap berada dalam membran. Gerbang untuk translokasi yang terbentuk dari *loop* M1 akan membuka pada bentuk-m, sedangkan pada bentuk-c akan tertutup (13).

Varian 111R dan 111L ditemukan pada Populasi Normal

Seperti telah dikemukakan di atas polimorfisme R111L ini dapat mengubah konformasi protein yang mungkin mempengaruhi fungsi protein pada rantai respirasi mitokondria. Perubahan ini dapat menjadi faktor kerentanan, pada individu normal tidak memberikan dampak tetapi mungkin akan memberikan kontribusi pada timbulnya manifestasi LHON, salah satu penyakit respirasi mitokondria, jika terdapat bersama-sama dengan mutasi DNA mitokondria LHON. Untuk mengetahui hal itu, maka

selanjutnya dilakukan analisis RFLP distribusi polimorfisme tersebut pada beberapa individu dari populasi normal dan pada individu dengan mutasi mitokondria baik yang menunjukkan manifestasi LHON maupun tidak menunjukkan manifestasi.

Untuk mengetahui keberadaan dan distribusi varian ANT2 R111L yang terletak pada ekson 2 dikembangkan metode PCR-RFLP. Metode ini dapat mendeteksi dengan cepat varian 111R dan 111L. Digesti fragmen ekson 2 menggunakan enzim *HhaI* yang akan memotong pada situs

spesifik (GC↓GG) dapat membedakan varian R111L. Fragmen ekson 2 varian 111R akan terpotong pada dua perubahan asam amino R111L akan menghilangkan satu situs restriksi *HhaI* pada ekson 2. Elektroforesis hasil digesti tersebut menunjukkan pola pita yang berbeda yaitu pada bentuk 111R akan memberikan hasil 3 pita dengan panjang basa 117 pb, 161 pb dan 334 pb, sedangkan bentuk 111L hanya akan memberikan 2 pita yaitu 161 pb dan 451 pb.

Dengan menggunakan metode PCR-RFLP di atas, diketahui bahwa bentuk 111R dan 111L ditemukan pada beberapa populasi normal yang diteliti. Distribusi bentuk 111R dan 111L pada etnik Cina, Mandar, Batak Toba, Jawa dan Kaukasia masing-masing adalah 61%:39%, 64%:36%, 77%:23%, 78%:22% dan 59%:41%. (Tabel 2). Distribusi varian R111L dalam satu populasi tertentu (*within population*) berbeda bermakna, sebaliknya perbandingan

tempat, sedangkan varian 111L hanya akan terpotong pada satu tempat karena mutasi 332G>T yang mengakibatkan distribusi antar populasi (*between population*) secara statistik tidak berbeda bermakna ($\alpha: 0,05$, $\beta=0,7146$, $\chi^2=7,930$, $df:2$, $P=0,0190$). Karena varian R111L terdapat pada semua populasi yang diuji, nampaknya mutasi yang menimbulkan polimorfisme ini terjadi sebelum migrasi populasi ke berbagai belahan dunia, sedangkan perbedaan distribusi yang nyata pada ras/etnik tertentu mungkin disebabkan oleh adanya *genetic drift*. Jika dilihat dari angka distribusi pada populasi di atas, walaupun ada kecenderungan bahwa distribusi 111L lebih kecil daripada 111R, nampaknya mutasi yang menyebabkan perubahan asam amino R111L masih dipertahankan. Mungkin hal ini terjadi karena mutasi tersebut tidak menyebabkan perubahan fungsi Ant2 yang berarti, atau perubahan di atas masih dapat ditoleransi oleh sistem tubuh manusia.

Tabel 2. Distribusi Polimorfisme 111R dan 111L pada Populasi Normal Etnik Kaukasia, Cina, Mandar, Batak Toba, Jawa dan Papua

	N (alel)	111R % (n)	111L % (n)
Kaukasia	82	59 (50)	41 (32)
Cina	86	61 (51)	39 (35)
Mandar	83	64 (53)	36 (30)
Batak Toba	77	77 (59)	23 (18)
Jawa	89	78 (69)	22 (20)
Papua		80	20

$\alpha=0,05$, $\beta=0,7146$, $\chi^2=7,930$, $df:2$, $P=0,0190$

Varian 111R dan 111L pada penderita LHON

Untuk mengetahui apakah varian ANT2, dalam hal ini varian R111L, berhubungan dengan manifestasi klinik mutasi mtDNA G11778A, maka dilakukan analisis polimorfisme G332T secara PCR-RFLP menggunakan sampel DNA keluarga LHON dari etnik yang beragam.

Sampel DNA yang digunakan berasal dari keluarga pasien LHON dari etnik Jawa (Cirebon dan Purwodadi), Kaukasia (Australia Barat), Cina (Jambi), Sunda (Karawang) dan Betawi. Keluarga LHON tersebut merupakan keluarga besar yang terdiri dari beberapa

generasi (sampai dengan lima generasi). Pada penelitian ini sampel yang dipergunakan berasal dari individu laki-laki dan perempuan yang memiliki mutasi mitokondria G11778A homoplasmi dan heteroplasmi dengan manifestasi klinik khas LHON maupun yang tidak memiliki manifestasi klinik.

Manifestasi klinik yang dapat dijumpai pada sampel penderita LHON antara lain kelainan pada penglihatan seperti atropi pupil sempurna atau sebagian, skotoma, hipertropi ventrikular kiri iskhemi anteroseptal (*Anteroseptal Ischemic Left Ventricular Hypertrophy*), dan *Right Bundle Branch Block* (Tabel 3).

Tabel 3. Data Sampel Pasien LHON Satu Ranting Silsilah Keluarga Etnik Cina Jambi

Pasien	Usia (Th)	Acuity (kiri, kanan)		Skotoma	Funduskopi	Diagnostik lain	Tingkat Homoplasm	Manifestasi LHON
III-1	46	TD		-	TD	-	100%	-
III-3	34	1/60	1/60	-	PA	ECG:N usia awitan:28	100%	+
III-4	33	1/300	1/60	-	PA	ECG:RBBB usia awitan:16	100%	+
III-8	34	1/300	1/60	+	PA	ECG:RBBB ^{inc} usia awitan:17	100%	+
III-11	26	20/200	20/200	-	PA ^P	-	96%	-
III-20	38	1/60	6/60	-	PA	ECG:N usia awitan:18	100%	+
III-23	31	20/200	20/30	-	N	-	100%	-
III-24	30	20/30	20/20	-	N	Titik hitam (mata kiri)	96%	-
III-27	26	1/60	1/300	-	PA	ECG:N usia awitan:23	100%	+
III-29	22	20/20	20/20	-	N	-	100%	-
III-31	24	20/20	20/20	-	N	-	100%	-
III-32	23	5/60	5/60	-	PA	ECG:RBBB ^{inc} usia awitan:20	100%	+
III-34	18	1/60	1/300	+	PA	ECG:ASL ^{L-VH} usia awitan:17	100%	+

Keterangan:

RBBB^{inc} : Right Bundle Branch Block incomplete

RBBB : Right Bundle Branch Block

ASL^{L-VH} : Anteroseptal Ischemic Left Ventricular Hypertrophy

PA^P : Pupil Atrophy Parsial

PA : Pupil Atrophy

N : Normal

- : Tidak ada

+ : Ada

TD : Tidak dideteksi

Dari hasil PCR-RFLP terlihat adanya perbedaan yang bermakna pada distribusi polimorfisme 111R dan 111L antara kelompok individu dengan mutasi mitokondria 11778 yang menunjukkan manifestasi LHON dengan yang tidak (Tabel 4). Pada sampel anggota keluarga LHON pembawa mutasi G11778A dengan manifestasi klinik positif diperoleh nilai distribusi varian 111R sebesar 79,07% (34 alel) dan varian 111L sebesar 20,93% (9 alel), sedangkan pada sampel tanpa manifestasi klinik diperoleh varian 111R sebesar 56,52% (26 alel) dan varian 111L sebesar 43,48% (20 alel). Hasil uji statistik dengan menggunakan metode

Fischer Exact menyatakan secara statistik berbeda bermakna ($\alpha = 0,05$; $P = 0,0262$). Berdasarkan nilai persentase distribusi varian 111L yang cukup besar pada individu pembawa mutasi G11778A yang tidak menunjukkan manifestasi klinik LHON, nampaknya varian 111L memiliki efek perlindungan terhadap manifestasi penyakit LHON. Sebaliknya, berdasarkan persentase distribusi varian 111R yang cukup besar pada individu pembawa mutasi G11778A dengan manifestasi klinik LHON, agaknya varian 111R bersifat sebagai faktor yang memicu timbulnya ekspresi klinik khas LHON.

Tabel 4. Distribusi Polimorfisme G332T (R111L) ANT2 pada Keluarga LHON Pembawa Mutasi mtDNA G11778A baik yang Menunjukkan maupun yang Tidak Menunjukkan Manifestasi Klinik LHON

	N (alel)	111R (%)	111L (%)
Mutasi(+)/Manifestasi klinik (+)	43	34 (79,07)	9 (20,93)
Mutasi(+)/Manifestasi klinik (-)	46	26 (56,52)	20 (43,48)

Keterangan :

$\alpha=0,05$; $P=0,0262$ (Fischer Exact)

DISKUSI

111R Dipertahankan pada Ant2 dari Berbagai Spesies

Dari sekuensing DNA gen ANT2 ditemukan beberapa polimorfisme DNA ANT2 pada ekson 1, 2 dan 4. Salah satu polimorfisme ANT2 G332T mengakibatkan perbedaan asam amino R111L mungkin penting. Jika diketahui bahwa pada posisi yang 111R ini umumnya ditempati oleh arginin. Asam amino arginin tersebut

dilihat dari segi konservasi asam amino pada posisi 111, varian G332T yang mengubah asam amino yang disandi menjadi R111L mungkin berarti penting untuk fungsi Ant. Dari analisis sekuens asam amino ant2 berbagai spesies dijumpai pada sekuens ANT1, ANT2 dan ANT3 pada manusia (*Homo sapiens*), *Rattus norvegicus*, *Mus*

musculus, dan *Bos taurus*, sedangkan pada *Chlamydomonas reinhardtii*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Kluyveromyces lactis* asam amino yang dijumpai adalah lisin (K). Baik arginin maupun lisin termasuk pada kelompok asam amino yang polar, sehingga perbedaan antara arginin dengan lisin tidak akan banyak berarti pada konformasi protein. Oleh karena itu disimpulkan bahwa arginin pada posisi tersebut dipertahankan dan mungkin berarti penting pada hubungan antara struktur dan fungsi Ant.

Hasil analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa polimorfisme ANT2 G332T yang mengakibatkan perbedaan asam amino R111L ditemukan pada semua populasi normal yang diuji yaitu Kaukasia, Cina, Mandar, Batak Toba, Jawa dan Papua, dengan perbedaan distribusi yang nyata. Perbedaan distribusi varian 111R dan 111L juga ditemukan pada kelompok individu yang membawa mutasi mtDNA 11778G>A dan nampaknya berasosiasi dengan manifestasi klinik berupa neuropati optik (LHON).

Untuk mengetahui lebih jauh apakah polimorfisme R111L pada ANT2 mempengaruhi fungsinya sebagai translokator ADP/ATP dan apakah memang berperan sebagai *nuclear modifier* mutasi mtDNA LHON beberapa studi lanjut masih perlu dilakukan, termasuk:

1. Sekuensing DNA keseluruhan dari gen ANT2 menggunakan sampel individu dari beberapa populasi etnis lain yang lebih beragam untuk menapis adanya varian-varian lain, termasuk di daerah intron dan daerah regulasi.
2. Analisis fungsi varian protein Ant2 untuk mengetahui apakah perbedaan sekuens asam amino yang terdeteksi mengakibatkan perbedaan fungsi Ant2 baik dari segi sifat biokimia protein Ant2 maupun dalam ekspresi gen penyandinya. Untuk keperluan ini protein Ant2 dapat diperoleh dengan mengekspresikan cDNA ANT2 menggunakan sistem ekspresi *E. coli* atau yeast *S. cerevisiae* sebagai sel inang. Protein yang diperoleh dipurifikasi dan dimasukkan ke dalam sistem liposom untuk selanjutnya dilihat sifat-sifat karakter biokimiawinya terutama pada kecepatan dan spesifisitas translokasi ADP/ATP.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Heddi, A., Faure-Vigny, H., Wallace, D.C. and Stepien, G. *Coordinate expression of nuclear and mitochondrial genes involved in energy production in carcinoma and oncocyoma*. Biochim Biophys Acta 1996; 1316: 203-209.
2. Torroni, A., Stepien, G., Hodge, J.A. and Wallace, D.C. *Neoplastic transformation is associated with coordinate induction of nuclear and cytoplasmic oxidative phosphorylation genes*. J Biol Chem 1990; 265: 20589-20593.
3. Lunardi, J. and Attardi, G. *Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells*. J Biol Chem 1991; 266: 16534-16540.
4. Battini, R., Ferrari, S., Kaczmarek, L., Calabretta, B., Chen, S.T. and Baserga, R. *Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated*. J Biol Chem 1987; 262: 4355-4359.
5. Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A. and Wallace, D.C. *Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation*. J Biol Chem 1992; 267: 14592-14597.

KESIMPULAN

Variasi atau polimorfisme sekuens dan yang membentuk keanekaragaman genetik merupakan faktor penting yang menentukan variasi fungsi protein. Perbedaan sekuens DNA dapat secara langsung mempengaruhi sifat biokimia protein yang disandi atau secara tidak langsung pada pengaturan ekspresinya. Studi keanekaragaman genetik manusia merupakan topik penting pada saat ini karena diharapkan akan menghasilkan informasi mengenai faktor-faktor penting yang mungkin menjadi penentu kerentanan (predisposisi) maupun ketahanan (resistensi) terhadap berbagai penyakit.

Dari sekuensing DNA gen ANT2 ditemukan beberapa polimorfisme DNA ANT2 pada ekson 1, 2 dan 4. Hasil analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa salah satu polimorfisme ANT2 G332T yang mengakibatkan perbedaan asam amino R111L mungkin penting, karena mengubah pola hidrofobisitas protein Ant2. Pada populasi normal yang diuji yaitu Kaukasia, Cina, Mandar, Batak Toba, Jawa dan Papua, varian R111L tersebut ditemukan dengan perbedaan distribusi yang nyata. Perbedaan distribusi varian 111R dan 111L juga ditemukan pada kelompok individu yang membawa mutasi mtDNA 11778G>A dan nampaknya berasosiasi dengan manifestasi klinik berupa neuropati optik (LHON).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterima kasih kepada para dokter, termasuk Dr. Mulia Sitepu dari University of Atmajaya Hospital, Jakarta, Drs. Rosma and Inakawati Rivai dari School of Medicine University of Diponegoro, Semarang dan Dr. Tjahyono Ghondowirdjo dari School of Medicine University of Indonesia, yang telah mengirimkan pasien untuk analisis DNA. Penelitian ini dibantu dengan dana dari PT Krakatau Steel dan PT Inti melalui *The Agency for Strategic Industries* (Indonesia) dan Dana Pengembangan dari *The National Development Planning Agency* (BAPPENAS) of the Republic of Indonesia

6. Sudoyo, H., Suryadi, H., Lertrit, P., Pramoonjago, P., Lyrawati, D. and Marzuki, S. *Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's Hereditary Optic Neuropathy*. J Hum Genet 2002; 47: 594-604.
7. Sudoyo, H., Marzuki, S., Trounce, I. and Byrne, E. *Antimitochondrial autoantibodies of primary biliary cirrhosis as a novel probe in the study of the 2-oxo-acid dehydrogenase in patients with mitochondrial myopathy*. J Neurol Sci 1990; 98: 185-193.
8. Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York; 2001.
9. Ku, D.H., Kagan, J., Chen, S.T., Chang, C.D., Baserga, R. and Wurzel, J. *The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene molecular cloning and sequence*. J Biol Chem 1990; 265: 16060-16063.
10. Chen, C.N., Su, Y., Baybayan, P., Siruno, A., Nagaraja, R., Mazzarella, R., Schlessinger, D. and Chen, E. *Ordered shotgun sequencing of a 135 kb Xq25 YAC containing ANT2 and four possible genes, including three confirmed by EST matches*. Nucleic Acids Res 1996; 24: 4034-4041.
11. Houldsworth, J. and Attardi, G. *Two distinct genes for ADP/ATP translocase are expressed at the mRNA level in adult human liver*. Proc Natl Acad Sci USA; 1988; 85: 377-381.
12. Richards, F.M. In Creighton, T. F. (ed.), *Protein folding*. European Molecular Biology Laboratory, W.H. Freeman and Co., New York: pp. 30; 1992
13. Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y. and Terada. *Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline*. J Biol Chem 1995; 270: 29548-29554.
14. Heidkamper, D., Muller, V., Nelson, D.R. and Klingenberg, M. *Probing the role of positive residues in the adp/atp carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on transport and the four ATP versus ADP exchange modes*. Biochem 1996; 35: 16144-16152.
15. Mueller, V., Basset, G., Nelson, D.R. and Klingenberg, M. *Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on oxidative phosphorylation and AAC expression*. Biochem 1996; 35: 16132-16143.

