

MUTASI TITIK HINGGA MUTASI FRAMESHIFT GEN INSR EXON 22 PADA PASIEN PENDERITA DIABETES MELLITUS

Fatchiyah^{1,2)}, S. Widyarti^{1,2)}, I. Mustofa¹⁾, IY. Kusumowardhani²⁾, R. Fatimah²⁾, L. Firdausi²⁾, SP. Ayu²⁾, Aulanni'am³⁾, dan DW. Soeatmaji⁴⁾

¹Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya.

²Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya.

³Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya.

⁴Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Email: fatchiya@yahoo.co.id

ABSTRACT

Mutations of human insulin and insulin receptor family can lead autosomal dominant syndrome on diabetes, fasting hyperinsulinemia, and insulin resistant. The aim of this research was to identify mutation types of hINSR gene exon 22 which mutation hot spot region. To analyze hINSR gene exon 22 of DM patient and control, we isolated DNA from their blood. DNA was then amplified by PCR using a set of primer for exon 22. PCR product was sequenced by Sequencer and nucleotide sequence analyzed by BLAST analysis. According to Gene Bank database, hINSR gene has two variant with Gene ID 3643, at chromosome 19p13.3-p13.2, and has 22 exons with mRNA 4200bp. The result of research showed that the mutation types of hINSR gene exon 22 of DM patients are point mutation, single base deletion and substitution. We found mutation of single deletion at Met¹²⁹⁵→Cys¹²⁹⁵ and Glut¹³⁰⁰→Gly¹³⁰⁰, also point mutation are at Met¹²⁹⁶→Ser¹²⁹⁶ and Trp¹²⁹⁹→Ala¹²⁹⁹ and Met¹³⁸⁹→Iso¹³⁸⁹. Because these two deletion are so close, the polypeptids sequence of these changed as frameshift mutation, normal IR has six amino acids -Met Arg Met Cys Trp Glut- and DM patient has differed the five amino acids - Cys Ala Ser Ala Gly. According to the mutation of DM patient, the IR protein function against tyrosine kinase become abnormal, perhaps its were correlated with genetic syndrome of insulin resistance.

Key words: Diabetes Millitus, Insulin Receptor mutation, Tyrosine Kinase, Insulin resistance

PENGANTAR

Insulin reseptor merupakan anggota *INSR family tyrosine kinase*, selain *insulin-like growth factor type I receptor* (IGF1R) dan *insulin receptor-related receptor* (IRR). IR dan IGF1R mempunyai aktivitas biologis yang sinergi melalui perantara reseptor yang ada di permukaan sel. Kedua reseptor ini merupakan *tyrosine kinase* (Tk-ase) yang meregulasi berbagai *signaling pathway* melalui serial aktivitas fosforilasi (*series of phosphorylation cascades*). INSR dan IGF1R adalah protein heterotetramerik yang terdiri atas 2 *ligand-binding subunit-α* dan 2 *subunit-β* yang masing-masing memiliki domain Tk-ase. *Insulin/Igfl binding* pada *extracellular domain* menginduksi autofosforilasi reseptor dan mengaktifkan aktivitas intrinsik Tk-ase, sehingga substrat menjadi *substrat-phosphorylated*. Sedang heterodimerik dari reseptor Ir/Irr diaktivasi oleh insulin melalui *signaling* dari aktivitas Tk-ase seperti Ir dan Igflr (Acilli *et al.*, 2001; Kitamura *et al.*, 2001).

Insulin reseptor pada manusia mempunyai dua isoform, yaitu hINSR tipe A dan tipe B, yang dihasilkan dari proses *splicing* transkrip gen primer dan kedua tipe ini berbeda 12 asam amino yang terdapat pada subunit-α. Kedua isoform insulin reseptor itu dapat berikatan dengan insulin dengan

afinitas yang tidak sama dan ekspresi kedua isoform itu dijumpai pada jaringan yang berbeda. Hasil penelitian Mosthaf membuktikan bahwa pada pasien *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM) dijumpai perbedaan ekspresi kedua tipe INSR, *level* mRNA hINSR tipe-A lebih rendah pada jaringan otot pasien NIDDM dibanding *level* mRNA hINSR-A pada kontrol normal (Mosthaf *et al.*, 1991). Berbagai hasil penelitian menyebutkan bahwa insulin (INSR) dan *insulin growth factor type I receptor* (IGF-1R) meregulasi dua proses kunci pada siklus kehidupan sel beta, kedua reseptor ini berperan pada saat pre- maupun *post-natal* di saat pertumbuhan dan perkembangan suatu jaringan atau organ (Acilli *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 1996; Kitamura *et al.*, 2001).

Kelainan diabetes yang disebabkan oleh abnormalitas INSR memang jarang tetapi tidak berarti faktor ini bisa diabaikan. Kelainan pada reseptor ini terjadi kemungkinan besar memengaruhi abnormalitas metabolik dari mulai hyperinsulinemia, *modest* hyperinsulinemia dan kelainan diabetes yang parah (Greenspan dan Gardner, 2004). Oleh karena itu, untuk mengidentifikasi kelainan INSR maka pada penelitian ini perlu dikaji kelainan atau mutasi pada gen INSR manusia, terutama pada daerah *hot spot mutation* seperti pada gen INSR exon 22.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan di 3 lokasi penelitian meliputi RSSA Malang, LSIH UB, Beberapa Klinik Medik di Malang, dan Lab. Bioteknologi LIPI Serpong. Sebelum dilakukan pengambilan sampel tim peneliti mengajukan *ethic clearance* (sertifikat laik etik) ditujukan ke komisi etik penelitian medik di Fakultas Kedokteran UB. Pengambilan sampel darah dilakukan setelah Sertifikat Layak Etik diperoleh.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel darah dan serum dari pasien penderita diabetes di Bagian Penyakit Dalam RS Saeful Anwar Malang. Sedangkan sampel kontrol diambil dari nonpenderita diabetes. Perbandingan sampel antara kontrol dan penderita DM 3:1 (Fatchiyah dkk., 1998). Semua sampel baik kontrol maupun penderita diabetes disimpan di *blood storage box* untuk dianalisis di laboratorium. Sebelum pengambilan sampel darah baik kontrol dan penderita diminta mengisi formulir "Inform Concern" kesediaan untuk diambil sampelnya sesuai ketentuan *International Scientific Bioethics*. Seleksi dan pengelompokan uji sampel penderita DM berdasarkan data klinis dari bagian penyakit dalam RS Saeful Anwar Malang.

Isolasi dan Amplifikasi DNA

Darah perifer diambil dengan jarum *BD Vacutainer precisionGlide multi-sampling* yang terpasang pada *vacutainer-EDTA*, darah diambil sebanyak 3 ml. Isolasi DNA dari darah dilakukan dengan sistem purifikasi menggunakan kolom berfilter (*NucleoSpin*). DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi dengan sepasang primer untuk gen IR exon 22, yaitu F-hINSR-INT21 5'-GAC TCA CCC AGG ACG TGT CCT TC-3' dan R-hINSR-EX22 5'-CTC CAG GTT CAC AGT TAAATC C-3', dengan program amplifikasi denaturasi awal: 94° C, 1 menit, 30 siklus yang terdiri dari: *Denaturation*: 94° C, 60 detik, *Annealing*: 57° C, 90 detik, dan *Extension*: 72° C, 90 detik, dan diakhir program *post-extension*: 72° C, 7 menit (Kodawaki *et al*, 1990), dengan alat *GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems)*. Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5%.

DNA Sequencing

DNA sampel dari kontrol dan penderita DM *disequencing* dengan primer yang sama untuk diidentifikasi mutasi pada urutan basa nukleotidanya. *Sequencing* dilakukan di Lab. Bioteknologi LIPI serpong, dengan menggunakan *ABI Prism Sequencer (Applied Biosystems)* dan *GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems)*.

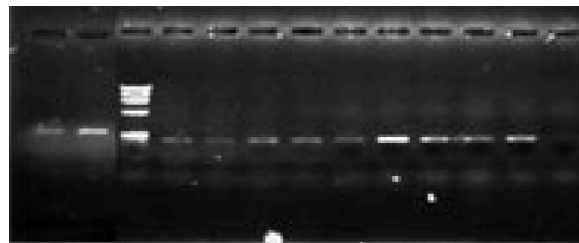
Analisis *in Silico*

Data sekuen DNA dianalisis secara *in silico* dengan program BLAST dan PDP pada website Gene Bank.

HASIL

Berdasarkan *database* Gene Bank gen hINSR ada dua macam varian INSR-A dan INSR-B dengan GeneID 3643, terletak pada kromosom 19p13,3-p13,2 dan mempunyai 22 exon dengan panjang urutan mRNA 4200bp. Adapun pada ekson 22 merupakan bagian dari Tk-ase domain untuk *ATP-binding site*.

N1 N2 M P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 K+ K-



Gambar 1. Hasil PCR exon 22 gen INSR pasien DM (P), normal (N), kontrol positif (K+) dan kontrol negatif (K-).

	Met Arg Met Cys Trp Glut
N	<u>A</u> TGCGCA <u>T</u> GTGCTGGCA <u>A</u> T
DM	<u>T</u> GCGCA <u>A</u> GTGCAGGC <u>_</u> <u>Cys Ala Ser Ala Gly</u>
N	FNPKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFH
DM	FNPKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFH
N	FNPKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFH
N	SEENKAPESSELEMEFEDMENVPLDRSSH
DM	SEENKAPESSELEMEFEDMENVPLDRSSH

Gambar 2. *Alignment* urutan gen hINSR exon 22 DM pasien terhadap urutan gen normal. Mutasi titik dan delesi tampak pada urutan gen pada pasien yang mengakibatkan terjadi perubahan *frameshift mutation* susunan poplipeptida. Urutan di bawahnya adalah urutan asam amino selanjutnya dari TK-ase domain

Pada penelitian ini sampel darah diperoleh dari 40 sampel DM kontrol dan 21 sampel DM dari RS Saeful Anwar, Malang. Hasil amplifikasi DNA dengan analisis PCR (Gambar 1) menunjukkan bahwa untuk gen *Insulin receptor* (INSR) telah diamplifikasi 64 sampel 20 di antaranya pasien DM memperlihatkan hasil untuk gen hINSR exon 14: 2 homozygote dan 25 heterozygote; gen INSR exon 21: 23 homozygote dan 7 heterozygote; dan hINSR exon 22: 27 homozygote dan 4 heterozygote.



Gambar 3. Struktur kristal *tyrosine kinase* pada gen INSR hasil analisis *in silico* dari sekuen gen hINSR normal. Tanda panah tempat terjadinya mutasi *frameshift*.

Pada exon 22 dijumpai pada pasien DM dengan riwayat resisten insulin menunjukkan mutasi titik dan delesi tunggal. Mutasi-mutasi ini mengakibatkan perubahan susunan asam amino pada reseptor insulin, seperti pada Gambar 2 memperlihatkan hasil analisis program BLAST perubahan protein yang dihasilkan.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini (Gambar 2) pada exon 22 ditemukan delesi tunggal Met¹²⁹⁵→Cys¹²⁹⁵ dan Glut¹³⁰⁰→Gly¹³⁰⁰, dan substitusi tunggal Met¹²⁹⁶→Ser¹²⁹⁶ dan Trp¹²⁹⁹→Ala¹²⁹⁹ dan Met¹³⁸⁹→Iso¹³⁸⁹. Akibat delesi di dua tempat yang berdekatan menyebabkan perubahan *frameshift* susunan asam amino pada INSR normal ada enam asam amino -Met Arg Met Cys Trp Glut- hasilnya menjadi lima asam amino -Cys Ala Ser Ala Gly-. Susunan polipeptida pada IR exon 22 ini merupakan bagian INSR yang berada di sitoplasma. Pada Gambar 3 diperlihatkan struktur kristal *tyrosine kinase domain* dari hINSR orang normal, pada tanda panah terputus terjadi *frameshift mutation* atau perubahan susunan asam amino. **Perubahan ini diduga menyebabkan fungsi pada domain Tyrosine Kinase** dari protein IR itu berubah. Kodawaki *et al.* (1990) melaporkan bahwa mutasi pada gen *insulin receptor* exon 22 mempunyai profil *genetic syndrome* yang berhubungan dengan resisten insulin, demikian pula mutasi pada INSR exon 14 (Kodawaki *et al.*, 1990). Insulin resisten merupakan ketidakmampuan insulin memproduksi efek biologis secara umum yang diperlukan pada orang sehat. Selain meregulasi *level* glukosa darah dan transportasi asam amino, insulin juga berperan terhadap metabolisme lipoprotein, proses koagulasi, dan regulasi

otonomik sistem saraf. Insulin juga dapat mengaktifkan enzim sitoplasmik dan membran, dengan mengubah *level* sintesis dan degradasi berbagai protein dan spesifik mRNA pada saat pertumbuhan dan perkembangan (Muazevic-Katanev *et al.*, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan terjadi mutasi titik, delesi, dan mutasi titik pada gen INSR exon 22. Berdasarkan hasil penelitian ini pada exon 22 ditemukan delesi tunggal Met¹²⁹⁵→Cys¹²⁹⁵ dan Glut¹³⁰⁰→Gly¹³⁰⁰, dan mutasi titik Met¹²⁹⁶→Ser¹²⁹⁶ dan Trp¹²⁹⁹→Ala¹²⁹⁹ dan Met¹³⁸⁹→Iso¹³⁸⁹. Akibat delesi di dua tempat yang berdekatan menyebabkan perubahan *frameshift* susunan asam amino pada INSR normal ada enam asam amino -Met Arg Met Cys Trp Glut- hasilnya menjadi lima asam amino -Cys Ala Ser Ala Gly-. Susunan polipeptida pada INSR exon 22 ini merupakan bagian INSR yang berada di sitoplasma. Perubahan ini diduga menyebabkan perubahan fungsi *domain tyrosine kinase* pada protein INSR itu. **Mutasi pada gen insulin receptor** exon 22 ini diduga merupakan profil *genetic syndrome* yang berhubungan dengan resisten insulin.

KEPUSTAKAAN

- Acilli D, Kido Y, Nake J, Lauro D, dan Park BC, 2001. **Genetics** of type2 diabetes: insights from targeted mouse mutants. *Curr. Mol. Med.* 1: 9–23.
- Fatchiyah, Soeatmaji DW, Hakim L, Rahayu M, 1998. Analysis of HLA DQB1 gene on Indonesian Population by PCR technique. *J of Natural.* 2(1): 1–5.
- Greenspan FS, and Gardner DG, 2004. Basic and Clinical Endocrinology. 7th ed. McGraw Hill, San Fransisco USA.
- Joshi N, Kaplowitz PB, and Furlanetto RW, 1996. Homozygote nonsense mutation in the Ir gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of Igf1. *Clin Endocrinol.* 45: 229–23.
- Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, and Acilli D, 2001. Preserved pancreatic β-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol.* 21(6): 5624–30.
- Kodawaki T, Kodawaki H, Rechler MM, Serrano-Rios M, Roth J, Gorden P, and Taylor SI, 1990. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in Patients with genetic forms of Insulin resistance. *The J. Clin. Investigation.* 86: 254–64.
- Mosthaf L, Vogtt B, Haringt HU, and Ullrich A, 1991. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 88: 4728–30.
- Muazevic-Katanev D, Provozc V, Metelco Z. 2005. The importance of determining the presence and degree of insulin resistance in the general population and some clinical states. *Diabetologia Croatica.* 34–1: 3–12.

Reviewer: **Dr. Abinawanto**