

SNP PADA GEN KEMOKIN C-C MOTIF LIGAN 7 (CCL7) PENDERITA STROKE DI KABUPATEN MANOKWARI

SNP in The Chemokine C-C Motif Ligan 7 (CCL7) Gene in Stroke Patients in Manokwari District

Muti Dornita Simamora¹, Muhammad Fajar Islam¹, Achmad Taher^{1*}

Jurusan kimia, FMIPA, Universitas Papua, Manokwari, Indonesia
Jalan Gunung Salju Amban, Manokwari, 98314

*E-mail korespondensi: a.taher@unipa.ac.id

ABSTRACT

Chemokines are key components in the development of chronic disease. Chemokine C-C motif ligan 7 (CCL7) is one of the chemokines believed to be associated with the pathology of atherosclerosis that causes stroke. CCL7 may play a role in inflammatory events by attracting macrophages and monocytes to further amplify inflammatory processes and contribute to atherosclerosis progression. Common Genetic variation in CCL7 gene has been associated with atherosclerosis progress, so the main objective of this study was identification of polymorphism of CCL7 gene in stroke patients. Five blood samples were taken from five patients suffering from stroke. The DNA of the blood samples were extracted, amplified its CCL7 gene, and sequenced. The results showed a sequence of 1151 bp consisting of regulator, exon 1, intron and exon 2. One polymorphic sites were found in the intron 1 region, at position 1447. The SNP genotype identified was TC.

Keywords: CCL7 gene, Chemokines, SNP, stroke

PENDAHULUAN

Kemokin adalah sitokin kemotaktik berbobot molekul kecil yang disekresikan oleh beberapa sel, seperti sel endotel, fibroblas, neutrofil, dan makrofag. Secara garis besar kemokin dapat dibagi menjadi empat subfamili, yaitu CC, C, CXC, dan CX3C (Kufareva *et al*, 2015 & Rollins, 1997) Kemokin mempunyai jalur sinyal yang kompleks karena sering kali mempunyai reseptor kemokin yang sama dan spesifik. Dengan kata lain, beberapa kemokin berikatan dengan banyak reseptor, dan reseptor dapat berbagi beberapa kemokin dari subfamili yang sama. Kemokin

didefinisikan sebagai homeostatis atau inflamasi tergantung pada karakteristiknya. Kemokin homeostatik disekresikan secara konstitutif dan terutama terlibat dalam lalu lintas limfosit, sedangkan kemokin inflamasi berhubungan dengan mekanisme pro-inflamasi dan menginduksi rekrutmen leukosit untuk memperparah penyakit (Rollins *et al*, 2015). Kemokin yang bersirkulasi dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu dengan penyakit aterosklerosis yang signifikan secara klinis (Ardigo *et al*, 2007).

Kemokin C-C motif ligan 7 (CCL7), juga dikenali sebagai protein

kemotaktik monosit (MCP)-3, adalah faktor kemotaktik untuk monosit dan neutrofil. Ada empat jenis MCP, yaitu MCP-1 atau CCL-2, MCP-2 atau CCL-8, MCP-3 atau CCL-7, dan MCP-4 atau CCL13, dalam sub keluarga kemokin CC, dengan homologi urutan asam amino 56-71% (Salanga *et al*, 2014). Kemampuan bindarit untuk menghambat produksi MCP oleh monosit dan sel endotel mungkin mendasari aktivitas anti-inflamasi dari obat tersebut terhadap penyakit (Grassia *et al*, 2009). Meskipun ke empat jenis MCP memiliki kesamaan yang tinggi dalam urutan asam amino, namun mereka memiliki reseptor dan aktivitas biologis yang berbeda.

Gen CCL7 yang menyandi protein CCL7 manusia terletak pada kromosom 17q11.2-12. Gen ini berukuran 3000 pb yang meliputi 3 ekson dan 2 intron (Park *et al*, 2005). Protein CCL7 manusia disintesis sebagai prekursor dengan 99 asam amino. Setelah pelepasan peptida sinyal, protein matang yang disekresikan memiliki 76 asam amino (Ali S *et al*, 2005). Struktur CCL7 mengadopsi struktur lipatan alfabet (Kim *et al*, 1996). CCL7 pertama kali dikarakterisasi dari supernatan osteosarkoma manusia (Van Damme *et al*, 1992). Oleh karena itu, sebagian besar penelitian terkait CCL7 berfokus pada perannya dalam tumorigenesis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa CCL7 dapat mendorong invasi dan metastasis tumor; namun, penelitian lain menunjukkan bahwa CCL7 memiliki efek penekan tumor (Liu *et al*, 2018).

CCL7 dapat diinduksi pada beberapa tipe sel, seperti sel endotel, sel otot polos vaskular (VSMCs), dan sel

myelomonocytic, di bawah stimulasi phorbol 12-myristate 13-acetate (Kondo *et al*, 2000) tumor necrosis factor (TNF)- α (Zhao *et al*, 2013), atau lipopolisakarida (Murakami *et al*, 1997). Dalam pengaturan klinis, tingkat CCL7 yang lebih tinggi diamati pada subjek dengan indeks massa tubuh yang tinggi (Pang *et al*, 2021)/ CCL7 dominan diekspresikan dalam preadiposit dibandingkan dengan adiposit (Ignacio *et al*, 2016). Peningkatan kadar CCL7 diamati pada makrofag M1 dan M2a (Melton *et al*, 2015). Faktor pertumbuhan turunan trombosit-BB menstimulasi ekspresi CCL7 dalam sel prekursor perivaskular dan menyebabkan peningkatan akumulasi makrofag (Au *et al*, 2009) Selain itu, ekspresi CCL7 menurun setelah stimulasi interleukin (IL)-4 dan IL-10 dan meningkat setelah stimulasi IL-1 dan TNF- α (Polentarutti *et al*, 1997)

Polimorfisme pada gen CCL7 telah diketahui terkait dengan perkembangan penyakit aterosklerosis. Medina-Gill *et al*. (2022) melaporkan keberadaan polimorfisme pada 3'UTR CCL7 yang terkait dengan penurunan kerentanan terhadap penyakit aterosklerosis. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengidentifikasi polimorfisme, SNP, gen CCL7 pasien penderita stroke.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel yang digunakan adalah darah pasien penderita stroke di Rumah Sakit Umum Daerah Manokwari dan Rumah Sakit TNI AL Manokwari. Pasien telah didiagnosa oleh rumah sakit sebagai

penderita stroke dan berada dalam masa pemulihan. Jumlah pasien yang dijadikan sampel 5 orang. Kelima pasien telah diberi pemahaman terkait penelitian yang dilakukan dan bersedia darahnya diambil sebagai sampel dalam penelitian ini.

Pengambilan Darah Sampel

Sebanyak 0,5 ml darah diambil dari vena tangan pasien oleh perawat Rumah Sakit. Darah diambil dengan jarum suntik lalu ditempatkan pada tabung vakum yang berisi antikoagulan EDTA dan disimpan dalam lemari pendingin sebelum digunakan.

Isolasi DNA Genomik

DNA yang diekstraksi adalah DNA genomik. Ekstraksi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Geneaid* (tissue) berdasarkan prosedur baku yang dibuat perusahaan.

Amplifikasi, Elektroforesis dan Sekuensing Gen CCL7

Metode PCR digunakan untuk mengamplifikasi daerah polimorfisme gen CCL7. Proses amplifikasi menggunakan mesin *SimpliAmp Thermal Cycler* dengan primer merujuk penelitian Febriani (2018). Proses PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit lalu diikuti tahapan 40 siklus. Setiap siklus meliputi proses denaturasi pada 94°C selama 30 detik, proses *annealing* pada 56°C selama 30 detik, dan diakhiri proses *extension* pada 72°C selama 30 detik. Setelah tahapan 40 siklus dilanjutkan tahap *post extension* pada 72°C selama 7 menit. dan diakhiri pada 25°C selama 2 menit. Produk hasil PCR divisualisasikan pada elektroforesis gel agarosa 1,8%, Produk yang berhasil teramplifikasi dikirim ke

First Base Laboratory Sdh Bhd (Malaysia) untuk disekuensing.

Analisis Data

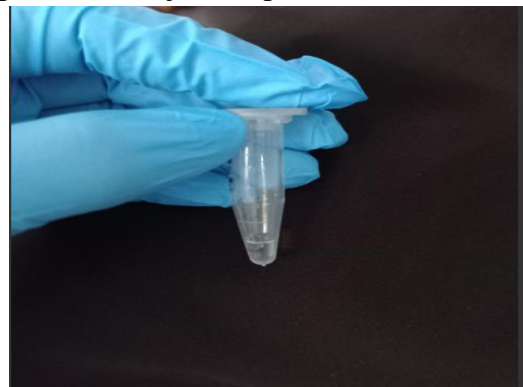
Sekuens yang diperoleh dari primer *forward* dan *reverse* untuk setiap amplicon dianalisis menggunakan Program Mega Versi 10 untuk mendapatkan sekuens konsensus. Selanjutnya hasil sekuens konsensus disejajarkan dengan sekuens rujukan di *GenBank* (nomor akses X72309.1) dengan *Basic Local Search Alignment Tools (BLAST)*.

Hasil pensejajaran selanjutnya dianalisis untuk menentukan komposisi nukleotida, SNP dan genotipe. Pensejajaran menggunakan Clustal W pada Program Mega Versi 10. Analisis situs polimorfisme dan genotipe juga menggunakan program yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA Genomik

Proses ekstraksi yang dilakukan berhasil mengekstrak DNA dari ke lima sampel yang digunakan. DNA yang diperoleh berupa larutan jernih yang tidak berwarna. DNA genomik yang diekstraksi berasal dari inti sel darah putih (leukosit) nukleus. Ekstrak DNA genomik yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 1.



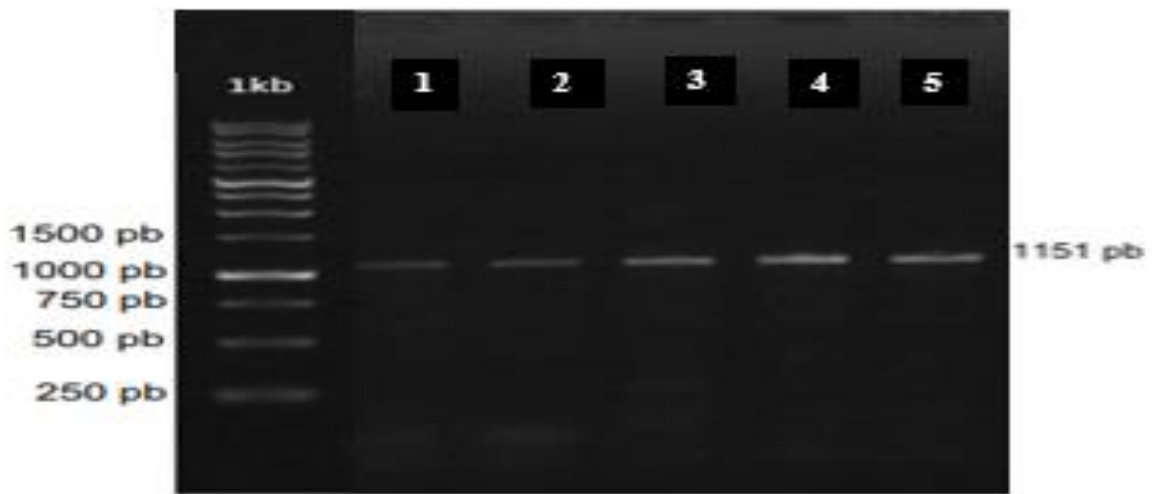
Gambar 1. Ekstrak DNA Genomik

Amplifikasi dan Elektroforesis

Amplifikasi fragmen gen CCL7 diperoleh produk PCR yang panjangnya 1151 pb. Visualisasi produk PCR ditunjukkan melalui proses elektroforesis berupa keberadaan pita-pita terang pada gel hasil elektroforesis. Berdasarkan sekuens DNA gen CCL7 di *GenBank* dengan kode akses X72309.1 dan primer yang digunakan, panjang fragmen DNA target sesuai dengan yang diharapkan, yaitu 1151 pb. Hasil amplifikasi berupa pita-pita terang pada gel hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa fragmen gen CCL7 teramplifikasi secara

spesifik karena hanya ada satu pita terang dan tipis pada setiap slot blok (sumur) agarosa dan sesuai dengan prediksi primer yang digunakan. Jika terdapat lebih dari satu pita atau ukuran pita tidak sesuai dengan prediksi primer PCR yang dipakai, maka produk hasil PCR tidak spesifik dan dianggap gagal. Demikian pula apabila tidak ada pita terang yang muncul pada gel agarosa hasil elektroforesis, maka amplifikasi dikatakan tidak berhasil. Primer yang digunakan pada proses amplifikasi merupakan komponen utama penentu keberhasilan. Primer adalah pembatas pada fragmen gen target sehingga menentukan ukuran dari basa-basa nucleotida yang (Saraswati *et al*, 2019).



Gambar 2. Pita-pita produk PCR hasil elektroforesis. Keterangan: 1 kb = DNA marker 1 kb ; 1 – 5 = berurut-turut adalah sampel 1 - sampel-5.

Selain primer, penentuan suhu aneling juga merupakan faktor penting dalam keberhasilan proses amplifikasi DNA. Suhu aneling yang tepat akan menyebabkan primer menempel pada target dan memulai proses amplifikasi. Sebaliknya suhu yang tidak tepat membuat primer tidak mampu menempel pada

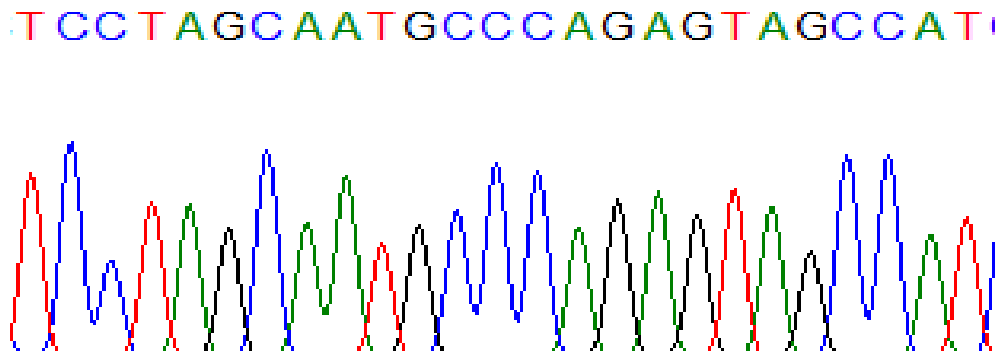
basabasa nukleotida target sehingga proses pemanjangan tidak terjadi (Yang *et al*. 2013).

Sekuensing Amplikon

Produk amplifikasi (amplikon) dari kelima sampel berhasil disekuensing. Hasil sekuensing yang diperoleh

ditunjukkan oleh elektroferogram. Elektroforegram yang dihasilkan dari proses sekuensing berupa puncak berwarna yang menunjukkan urutan basa basa nukleotida DNA. Puncak berwarna hijau menunjukkan basa Adenin (A), hitam menunjukkan Guanin (G), merah

menunjukkan Timin (T) dan biru menunjukkan sitosin (C). Fragmen elektroforegram dapat ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 2. Fragmen Elektroforegram Hasil Sekuensing Amplikon

Dari pita berukuran 1151 pb yang berhasil disekuensing hanya 1062 pb yang digunakan untuk dianalisis lanjut. Hal ini karena hasil elektroforegram yang terletak pada bagian awal dan akhir menunjukkan bentuk tidak beraturan. Sebanyak 49 pb pada bagian awal dan 40 pb pada akhir tidak digunakan. Urutan sekuens dari ke 1151 pb untuk setiap sampel dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil pensejajaran pada data di *GenBank* menunjukkan bahwa sekuens yang diperoleh merupakan bagian dari gen CCL7 manusia dengan kode akses X72309.1). Diketahui pula bahwa dari 1151 pb yang disejajarkan, 144 pb terletak pada daerah regulator, 106 pb merupakan bagian ekson 1, 779 pb bagian intron 1 dan 122 adalah bagian ekson 2.

Komposisi Basa-Basa Nukleotida

Analisis komposisi basa-basa nukleotida menunjukkan bahwa komposisi nukleotida timin (T/U) pada sampel 1, 2, 4 dan 5 sebesar 25,32 % sedangkan pada pasien 3 sebesar 25,42 %. Komposisi nukleotida Sitosin (C) untuk pasien 1, 2, 4 dan 5 sebesar 26,64%, sementara pada pasien 3 yaitu sebesar 26,55%. Komposisi nukleotida Adenin (A) untuk semua pasien sebesar 25,80%, dan komposisi nukleotida Guanin (G) pada semua pasien juga sama yaitu sebesar 22,22. Komposisi nukleotida hasil sekuensing ditunjukkan pada Tabel 1.

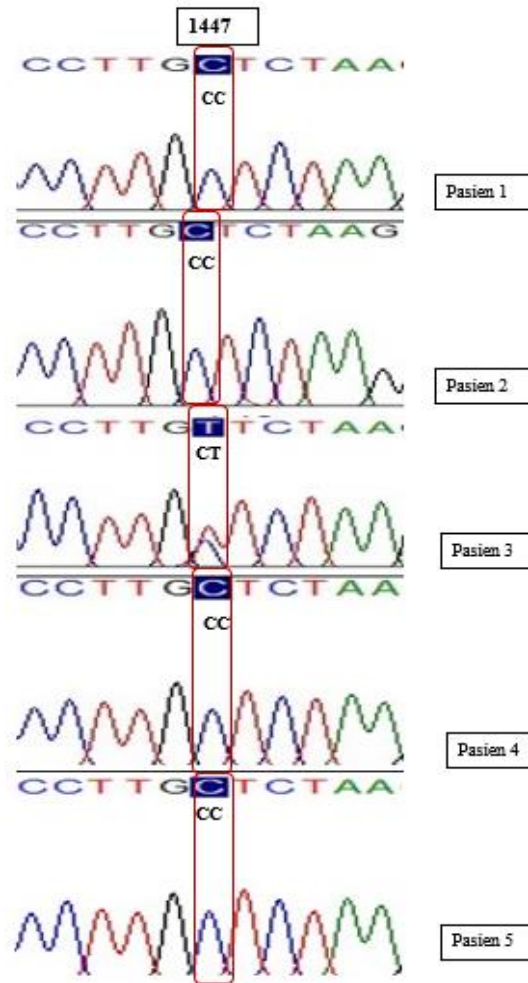
Tabel 1 Komposisi nukleotida hasil sekuensing

No	Id Sampel	Jumlah Nukleotida (Pb)	Komposisi Nukleotida (%)			
			T(U)	C	A	G
1	Pasien 1	1062 pb	25,32	26,64	25,80	22,22
2	Pasien 2	1062 pb	25,32	26,64	25,80	22,22
3	Pasien 3	1062 pb	25,42	26,55	25,80	22,22
4	Pasien 4	1062 pb	25,32	26,64	25,80	22,22
5	Pasien 5	1062 pb	25,32	26,64	25,80	22,22
Rata – Rata			25,34	26,62	25,80	22,22

Polimorfisme Nukleotida Tunggal dan Genotipe

Hasil analisis pensejajaran sekuens ampikon ditemukan 1 SNP pada basa urutan ke-688 dari 1062 basa nukleotida. Posisi SNP yang diperoleh ini bila disejajarkan terhadap sekuens rujukan yang diambil dari *GenBank* (kode akses X72309.1) terletak pada posisi ke 1447 dan berada dalam intron 1. SNP ditemukan pada sekuens pasien 3, dengan genotipe SNP adalah TC, sementara pada sekuens pasien 1,2,4, dan 5 serta sekuens rujukan genotipenya adalah CC. Genotip dari SNP yang ditemukan

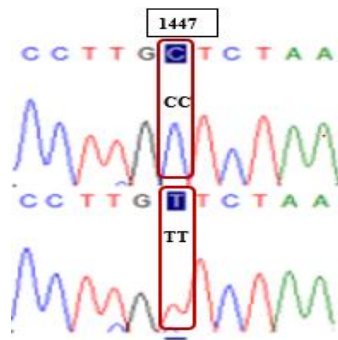
ditunjukkan pada Gambar 5. Meskipun intron merupakan daerah noncoding dalam gen, namun telah banyak penelitian terkait yang menunjukkan bahwa intron, khususnya yang terdapat pada sel eukariot memiliki fungsi yang beragam, salah satunya meningkatkan kelimpahan protein. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa meskipun sintesis protein dalam kenyataannya tidak melibatkan secara langsung peran dari intron, namun sebenarnya ada peran tidak langsung intron melalui variasi basa-basa nukleotida terhadap kelimpahan protein yang mekanismenya belum diketahui (Asaf *et al*, 2014).



Gambar 4. Jenis-jenis genotipe SNP yang teridentifikasi

Penelitian sebelumnya oleh Rahmawati *et al.* (2021) terkait variasi genetik gen CCL7 pada penderita asma juga diidentifikasi SNP pada posisi yang sama, yaitu 1447, dengan genotipe SNP nya TT. Genotipe TT dimiliki oleh satu sampel penderita asma dan genotipe CC dimiliki oleh tiga sampel penderita asma lainnya dan dua sampel non penderita asma. Genotipe TC tidak ditemukan dalam sampel yang diteliti. Dengan demikian

hasil penelitian ini menunjukkan adanya keberadaan genotipe baru yang belum diidentifikasi sebelumnya sehingga melengkapi data genotipe SNP pada posisi 1447 di dalam daerah intron 1 gen CCL7, yaitu genotipe TT, TC dan CC. Keberadaan genotipe TT dan TC berpotensi dijadikan sebagai penanda genetik terjadinya inflamasi kronis pada penderita asma maupun aterosklerosis.



Gambar 5 Jenis genotipe yang diidentifikasi pada penelitian Rahmawati *et al.* (2021)

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi satu polimorfisme nukleotida tunggal dalam daerah intron 1 gen dari gen CCL7 pasien penderita stroke. Genotip SNP yang diidentifikasi adalah TC yang belum diidentifikasi pada penelitian gen CCL7 pada penderita asma.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, S, Robertson, H, Wain, J. H, Isaacs, J. D, Malik, G, Kirby, J. A. 2005. A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation. *J. Immunol* 175 (2): 1257–66.

Ardigo, D, Assimes, T. L, Fortmann, S. P, Go, A. S, Hlatky, M, Hytopoulos E, Iribarren, C, Tsao, P. S, Tabibiazar, R. 2007. Circulating chemokines accurately identify individuals with clinically significant atherosclerotic heart disease. *Physiological Genomics* 31 (3):402-409.

Asaf, V. N. 2014. An Overview on Single Nucleotide Polymorphism Studies In Mastitis Research Veterinary World. EISSN: 2231-0916.

Au, P, Tam, J, Duda, D. G, Lin, P. C, Munn, L. L, Fukumura, D, Jain, R.K. 2009. Paradoxical effects of PDGF-BB overexpression in endothelial cells on engineered blood vessels in vivo. *Am J Pathol* 175 (1):294–302.

Grassia, G, Maddaluno, M, Guglielmotti A, Mangano, G, Biondi, G, Maffia P, Ialenti, A. 2009. The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointima formation in both rats and hyperlipidaemic mice. *Cardiovasc Res* 84(3):485–93.

Pang, Y, Kartsonaki, C, Lv J, Fairhurst-Hunter, Z, Millwood, I.Y, Yu, C, Guo, Y, Chen, Y, Bian, Z, Yang L, *et al.* 2021. Associations of adiposity, circulating protein biomarkers, and risk of major vascular diseases. *JAMA cardiol* 6 (3):276–86.

Ignacio, R. M, Gibbs, C.R, Lee, E.S, Son, D.S. 2016. Differential chemokine signature between human preadipocytes and adipocytes. *Immune network* 16 (3):189–94.

Kondo, A, Isaji, S, Nishimura, Y, Tanaka T. 2000. Transcriptional and post-transcriptional regulation of m 155 cyte chemoattractant protein-3

- gene expression in human endothelial cells by phorbol ester and cAMP signalling. *Immunology*. 99 (4):561–8.
- Kufareva, I, Salanga, C. L, Handel, T.M. 2015. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol Cell Biol* 93 (4):372–8.
- Liu, Y, Cai, Y, Liu L, Wu, Y, Xiong X. 2018. Crucial biological functions of CCL7 in cancer. *PeerJ* 6: e4928.
- Melton, D. W, McManus, L. M, Gelfond, J.A, Shireman, P. K. 2015. Temporal phenotypic features distinguish polarized macrophages in vitro. *Autoimmunity* 48 (3):161–76.
- Murakami, K, Nomiyama, H, Miura, R, Follens, A, Fiten, P, Van Coillie, E, Van Damme, J, Opdenakker, G. 1997. Structural and functional analysis of the promoter region of the human MCP-3 gene: transactivation of expression by novel recognition sequences adjacent to the transcription initiation site. *DNA Cell Biol* 16 (2):173–83.
- Park, B. L, Kim, L. H, Choi, Y. H, Cheong, H. S, Park, H. S, Hong, S. J, Choi, B. W, Lee, J. H, Uh, S. T, Park, C. S, Shin, H. D. 2005. Association Analysis of Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP3) Polymorphisms with Asthmatic Phenotypes. *J Biochem Mol Biol* 38:77-81.
- Polentarutti, N, Introna, M, Sozzani S, Mancinelli, R, Mantovani, G, Mantovani A. 1997. Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 8 (3):271–4.
- Rahmawati, D. O, Taher, A, Islam, M. F. 2021. Karakterisasi Daerah Intron 1 Gen C-C Ligan 7 (CCL7) pada Penderita Asma di Kabupaten Manokwari. *Jurnal Natural* 17 (2):131-142.
- Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood* 90 (3):909–28.
- Salanga, C.L, Dyer, D. P, Kiselar, J. G, Gupta, S, Chance, M.R, Handel, T.M. 2014. Multiple glycosaminoglycan-binding epitopes of monocyte chemoattractant protein-3/CCL7 enable it to function as a non-oligomerizing chemokine. *J Biol Chem* 289 (21):14896–912.
- Saraswati H, Seprianto S, Wahyuni FD. 2019. Desain primer secara in silico untuk amplifikasi gen *cryiii* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity* 3 (1):33-38.
- Van Damme, J, Proost, P, Lenaerts, J. P, Opdenakker, G. 1992. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 176 (1):59–65.
- Yang L, Wang C, Wang L, Xu C, Chen K. 2013. An Efficient Multiplex PCR Assay for Early Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in Transgenic Plant Material. *Turk J Agric For* 37:157-162.

Zhao, Y, Fu, Y, Hu, J, Liu, Y, Yin, X. 2013. The effect of tissue factor pathway inhibitor on the expression of monocyte chemotactic protein-3 and I κ B- α stimulated by tumour necrosis factor- α in cultured vascular smooth muscle cells. *Arch Cardiovasc Dis* 106 (1):4–11.

Medina-Gill, J. M, Garcia, A. P, Santana, P. S, Carrasco, A. D, Quantana, E. M, Gonzalez, F. R, Ramirez, C. M, Riano, M, Sanchez, P. G, Tugores, A. 2022. A Common Variant at the 3'untranslated Region of the CCL7 Gene (rs17735770) is Associated With Decreased Susceptibility to Coronary Heart Disease. *Frontier in Cardiovascular Medicine* (9): 908070.

Febriani, N. 2018. Karakterisasi Gen C-C Ligan 7 (CCL7) sebagai Penanda Genetik Asma pada Beruk (Macaca nemestrina). Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.