

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Sindroma CHARGE (OMIM 214800) merupakan salah satu penyakit genetik dengan pola pewarisan *autosomal dominant*. Sindroma ini dikenal karena menyebabkan berbagai kelainan pertumbuhan (*developmental disorder*) yang mempengaruhi banyak organ tubuh. Prevalensi sindroma ini bervariasi antara 1/8500 hingga 1/12000 kelahiran hidup<sup>1,2</sup>. Angka tersebut merupakan gambaran insidensi di Eropa dan Kanada, sedangkan untuk prevalensi sindroma CHARGE di Indonesia sendiri belum pernah diteliti atau dikaji lebih jauh. Akronim 'CHARGE' diciptakan oleh Pagon *et al.* pada tahun 1981 untuk menggambarkan enam tanda kardinal berupa: koloboma (*Coloboma*), kelainan jantung (*Heart Disease*), atresia koanal (*choanal Atresia*), retardasi pertumbuhan dan perkembangan (*Retardation of growth and development*), kelainan genitalia (*Genital anomalies*) dan kelainan telinga (*Ear anomalies*)<sup>3</sup>. Berdasarkan gambaran klinis, untuk membuat diagnosis sindroma CHARGE diperlukan adanya empat sampai enam tanda-tanda kardinal yang tampak, baik atresia koanal maupun koloboma.

Sindroma CHARGE merupakan efek dari proses *dysblastogenetic* dan *dysneurulative* yang dihubungkan dengan mekanisme patogenik umum yang mengakibatkan gangguan perkembangan *neural crest*<sup>4</sup>. Keadaan ini terutama disebabkan oleh adanya mutasi *nonsense* atau mutasi *frame shift* yang terjadi secara *de novo* pada gen *CHD7* (*Chromodomain Helicase DNA binding 7*)<sup>5</sup>. Gen tersebut mengkode protein CHD7 yang berperan dalam remodelisasi kromatin

yang prosesnya tergantung ATP (*Adenosine Tri Phosphate*). Adanya mutasi *de novo* tersebut akan mengakibatkan haploinsufisiensi protein atau bahkan tidak terbentuknya sama sekali protein CHD7 sehingga menimbulkan patogenesis kelainan kongenital multipel yang tampak pada kasus sindroma CHARGE<sup>6, 7, 8</sup>. Menurut beberapa penelitian yang telah dilakukan, mutasi pada gen *CHD7* telah berhasil diidentifikasi dan mutasi tersebut bertanggung jawab pada sekitar 2/3 kasus sindroma CHARGE<sup>9, 10, 11</sup>.

Studi yang telah dilakukan oleh Zentner *et al.*, pada tahun 2010 menggunakan sel kanker kolorektal manusia (DLD1) dan plasmid FLAG-CHD7 (*wild-type*) dengan metode imunodeteksi berhasil mengidentifikasi lokasi CHD7 yaitu protein CHD7 sebagian besar diekspresikan di nukleoplasma<sup>12</sup>. Selanjutnya pada tahun 2012, Kita *et al.*, dengan menggunakan sel karsinoma serviks manusia (HeLa) dan sel embrionik ginjal manusia (HEK 293) serta plasmid EGFP-CHD7 (*wild-type*) dan FLAG-CHD7 (*wild-type*) berhasil mengidentifikasi lokasi CHD7 di nukleoplasma dan nukleolus<sup>13</sup>. Hal ini membuktikan bahwa protein CHD7 berfungsi dalam berbagai proses pengendalian dan pemrograman ekspresi gen melalui remodelisasi kromatin yang prosesnya tergantung ATP dan berperan sebagai aktivator transkripsi, dimana peran tersebut dilakukan oleh protein nukleolar, sehingga abnormalitas protein CHD7 tersebut dapat mengakibatkan berbagai macam kelainan kongenital multipel yang tampak pada sindroma CHARGE<sup>12, 14</sup>.

Beberapa studi tentang fungsi protein CHD7 menunjukkan bahwa CHD7 berfungsi sebagai regulator transkripsi 45S prekursor rRNA di nukleolus<sup>12, 15</sup>. Penentuan lokasi ekspresi protein CHD7 sangat penting untuk mempelajari fungsi

dari protein tersebut dan selanjutnya dapat dikembangkan sebagai suatu tes fungsional pada protein CHD7, terutama pada gen *CHD7* yang mengalami mutasi.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk menganalisis ekspresi protein CHD7 (*wild-type*) dan mengkonfirmasi lokasi protein tersebut dengan menggunakan dua plasmid dan dua model seluler yang berbeda (sel HeLa dan HEK 293).

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perumusan masalah penelitian ini adalah: "Bagaimanakah ekspresi protein CHD7 (*wild type*) dan dimanakah lokasi ekspresi protein CHD7 (*wild type*)? Untuk tujuan tersebut, analisis ekspresi protein CHD7 dan konfirmasi lokasi protein CHD7 dilakukan dengan menggunakan dua plasmid dan dua model seluler yang berbeda.

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi protein CHD7 (*wild-type*) dan mengidentifikasi lokasi protein tersebut dengan menggunakan dua plasmid dan dua model seluler yang berbeda (sel HeLa dan HEK 293).

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Membandingkan efektivitas transfeksi antara reagen lipofectamin dan reagen FuGENE.
- 2) Menentukan kondisi optimal untuk proses transfeksi (volume reagen lipofection, konsentrasi plasmid serta lama waktu inkubasi sebelum proses transfeksi).

- 3) Menganalisis ekspresi protein CHD7 (*wild type*) dengan teknik *western blot* dengan menggunakan plasmid pCIneo-CHD7-HA dan pcDNA3-FLAG-CHD7 yang ditransfeksi ke dalam sel HeLa dan sel HEK 293.
- 4) Mengidentifikasi lokasi protein CHD7 (*wild type*) dengan menggunakan teknik imunofluoresensi pada sel HeLa dan sel HEK 293 yang ditransfeksi plasmid pCIneo-CHD7-HA dan pcDNA3-FLAG-CHD7.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan: 1) Memberikan informasi tentang bagaimana ekspresi protein CHD7 (*wild-type*) pada sel HeLa dan HEK 293; 2) Memberikan konfirmasi lokasi protein CHD7, dimana lokasi ekspresi suatu protein sangat penting terkait fungsi protein tersebut di dalam sel; 3) Dengan ditentukannya lokasi protein CHD7 dapat memberikan landasan teoritik untuk melakukan tes fungsional pada protein CHD7, terutama pada gen *CHD7* yang mengalami mutasi.

#### 1.5. Orisinalitas Penelitian

Penelitian-penelitian yang sudah melaporkan tentang ekspresi protein CHD7 dan identifikasi lokasi protein CHD7 dijelaskan pada tabel 1 berikut.

**Tabel 1. Penelitian-penelitian terdahulu tentang ekspresi dan lokasi protein CHD7**

Peneliti (Tahun)	Judul	Metode	Hasil
Zentner et al., 2010	<i>CHD7 function in the nucleolus as a positive regulator of ribosomal RNA biogenesis</i>	Metode imunodeteksi dengan menggunakan plasmid FLAG-CHD7 ( <i>wild-type</i> ) yang ditransfeksi ke dalam sel kanker kolorektal manusia (DLD1)	Berhasil mengidentifikasi lokasi CHD7 yakni sebagian besar diekspresikan di nukleoplasma

---

Kita et al., 2012	<i>Identification of CHD7<sub>S</sub> as a novel splicing variant of CHD7 with functions similiar and antagonistic to those of the full-length CHD7<sub>L</sub></i>	Dengan menggunakan plasmid EGFP-CHD7 ( <i>wild type</i> ) dan FLAG-CHD7 ( <i>wild type</i> ) yang ditransfeksi ke dalam sel karsinoma serviks manusia (HeLa) dan sel embrionik ginjal manusia (HEK 293)	Berhasil mengidentifikasi lokasi CHD7 di nukleoplasma dan nukleolus.
-------------------	---	---	--

---

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah untuk identifikasi ekspresi protein CHD7 (*wild-type*) dan konfirmasi lokasi protein tersebut menggunakan dua galur sel manusia yang berbeda (sel HeLa dan HEK 293) dan dengan menggunakan dua plasmid yang berbeda: pCIneo-CHD7-HA yang mengkode CHD7 dengan epitop HA pada C terminal dan pcDNA3-FLAG-CHD7 yang mengkode CHD7 dengan epitop FLAG pada N terminal.