



Deteksi Mutasi Gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 pada Defek Septum Atrium Sekundum Sporadik

Sri Endah Rahayuningsih

Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Abstrak: Mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 telah ditemukan pada DSA familial, tetapi sampai saat ini belum ada penelitian tentang mutasi gen GATA4 dan MYH6 pada DSA sporadik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah ada hubungan mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik. Subjek penelitian ini adalah pasien DSA sekundum dan kontrol adalah pasien tanpa penyakit jantung bawaan yang memenuhi kriteria inklusi. Penelitian merupakan penelitian epidemiologi genetik dengan rancangan kasus kontrol. Untuk menguji hipotesis adanya hubungan mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik digunakan perhitungan Rasio Odds. Jumlah sampel dihitung berdasarkan prevalensi. Deteksi mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 dilakukan dengan pemeriksaan sekuensing terhadap isolasi DNA. Hasil penelitian menunjukkan tempat mutasi NKX2.5, GATA4, dan MYH6 yang berbeda dengan penelitian terdahulu. Terdapat hubungan mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik (Rasio Odds= 16,01; IK=13,97-18,05. Tidak ditemukan mutasi TBX5. Ditemukan tujuh anak DSA sekundum sporadik dengan mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 yang terdiri dari satu **missense mutation** gen NKX2.5, satu **frameshift mutation** dengan **denovo mutation**, satu **missense mutation** gen GATA4, dan empat **missense mutations** gen MYH6. Kesimpulan tempat mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya, terdapat hubungan bermakna mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik. Ditemukan satu **frameshift mutations** gen GATA4 yang merupakan **de novo mutations**.

Kata kunci: DSA sporadik, NKX2,5, GATA4, TBX5, MYH6.

Detection of NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 Gene Mutations in Finding an Association with Sporadic Secundum Atrial Septal Defect

Sri Endah Rahayuningsih

Pediatric Department, Faculty of Medicine Padjadjaran University

Abstract: Mutations of NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 gene had been identified in familial ASD, but until recently reports on GATA4 and MYH6 gene mutations in sporadic ASD was still not available. The aim of this study was to determine the association between NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 gene mutations and sporadic secundum ASD. The subjects of this study were patients with secundum ASD and the control group were patients without congenital heart disease. A genetic epidemiology study was conducted with case control design to determine the association between NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 gene mutations and sporadic secundum ASD. Hypothesis whether there was an association between NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 gene mutations and sporadic secundum ASD was tested by Odds Ratio calculation. The sample size was calculated based on prevalence. Sequencing of DNA isolation was performed to detect NKX2.5, TBX5, GATA4, and MYH6 gene mutations. Results of the study revealed locations of NKX2.5, GATA4, and MYH6 gene mutations which differed from previous studies. There was an association between NKX2.5, GATA4, and MYH6 gene mutations and sporadic secundum ASD (Odds Ratio=16.01; CI=13.97-18.05). Mutations of TBX5 gene was not found. Mutations of NKX2.5, GATA4, and MYH6 gene were found in seven children with sporadic secundum ASD, comprised of one NKX2.5 gene missense mutation, one frameshift mutation with de novo mutation, one GATA4 gene missense mutation, and four MYH6 gene missense mutations. As a conclusion, locations of NKX2.5, GATA4, and MYH6 gene mutations in this study differ from previous studies. There was an association between NKX2.5, GATA4, and MYH6 gene mutations and sporadic secundum ASD. One GATA4 gene frameshift mutation was found, which was de novo mutation

Keywords: sporadic ASD, NKX2.5, GATA4, TBX5, MYH6.

Pendahuluan

Defek septum atrium (DSA) adalah terdapatnya defek pada sekat yang memisahkan atrium kiri dan kanan serta merupakan salah satu penyakit jantung bawaan (PJB). Insidens DSA adalah satu di antara 1000 kelahiran atau 10% diantara PJB.¹⁻⁴ Insidensi ini hampir sama antara satu negara dan negara yang lain.¹ Angka kelahiran di Indonesia adalah 4 000 000 kelahiran/tahun.⁵ Hal itu berarti akan terdapat penambahan jumlah kasus DSA sebesar 4000 kasus pertahun. Di antara seluruh tipe DSA, defek septum sekundum merupakan tipe DSA yang paling sering terjadi, yaitu 85% dari seluruh DSA.^{3,4} DSA adalah suatu penyakit yang penyebabnya multifaktor, yaitu faktor genetik, faktor nongenetik dan interaksi faktor genetik dan non genetik.⁶⁻¹⁴ Faktor genetik yang telah dilaporkan berperan pada DSA familial adalah mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4 dan MYH6¹⁵⁻²⁰. Pada DSA sporadik mutasi gen yang telah dilaporkan adalah mutasi gen NKX2.5¹⁶ dan TBX5,¹⁷ sedangkan mutasi gen GATA4 dan MYH6 pada DSA

sporadik belum pernah dilaporkan. Walaupun penelitian tentang mutasi gen NKX2.5 dan TBX5 telah dilakukan pada DSA sporadik, tetapi dengan adanya perbedaan kultur dan budaya dimungkinkan untuk menemukan tempat mutasi yang berbeda dengan penelitian sebelumnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tempat mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 pada tiap ekson penderita DSA sekundum sporadik dan mengetahui hubungan mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik.

Metode

Populasi penelitian adalah pasien DSA sekundum yang datang ke instalasi rawat jalan dan instalasi gawat darurat, serta yang dirawat di instalasi rawat inap Bagian Ilmu Kesehatan Anak RS dr. Hasan Sadikin Bandung. Pasien yang didiagnosis DSA sekundum dan memenuhi kriteria inklusi dimasukkan ke dalam kelompok DSA sekundum sporadik, sedangkan pasien bukan penyakit jantung bawaan

dimasukkan ke kelompok kontrol. Diagnosis ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, elektrokardiografi, foto toraks, dan ekokardiografi yang dilakukan oleh konsultan kardiologi anak. Kriteria inklusi: a) Sampel adalah pasien DSA sekundum. b) Kontrol adalah pasien yang datang ke Bagian Ilmu Kesehatan Anak RS dr. Hasan Sadikin Bandung yang tidak memiliki penyakit jantung bawaan. c) Pasien DSA sekundum dan kontrol adalah anak kandung. Kriteria eksklusi: a) Pasien DSA sekundum atau kontrol yang disertai riwayat keluarga dengan penyakit jantung bawaan. b) Pasien DSA sekundum dengan kelainan kardiak lain. c) Pasien DSA sekundum dan kontrol dengan kelainan bawaan ekstrakardiak.

Sampel penelitian diambil berdasarkan urutan kedatangan pasien (*consecutive sampling from admission*) sampai jumlah sampel terpenuhi. Jumlah sampel dihitung berdasarkan prevalensi dengan rumus:

$$n = \frac{Z^2 \frac{p}{2} (1-p)}{\delta^2}$$

Sehingga n minimal yang diambil adalah 97

Penelitian ini merupakan penelitian epidemiologi genetik pada DSA sekundum sporadik dengan rancangan kasus kontrol untuk hubungan mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6. Untuk menguji hipotesis adanya hubungan mutasi gen NKX2.5, TBX5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik digunakan perhitungan Rasio Odds.

Pasien pada kelompok DSA sekundum dan kelompok kontrol yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak termasuk kriteria eksklusi diambil darah vena sebanyak 6 mL, disimpan di dalam tabung EDTA. Lima mL sampel darah dilakukan isolasi DNA, sedangkan 1 mL disimpan pada suhu -80°C (sebagai bahan cadangan jika isolasi DNA rusak). Isolasi DNA dilakukan di Unit Penelitian Kedokteran FK Unpad Bandung. Hasil isolasi DNA dibawa ke *Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine* Jepang untuk dilakukan sekuensing DNA. Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan komisi etik.

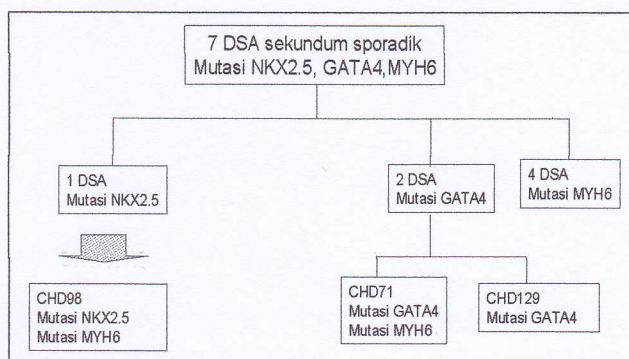
Hasil

Selama kurun waktu pengumpulan bahan/sampel, Juli 2006 sampai 30 Juli 2007 di Rumah Sakit Dr Hasan Sadikin Bandung, didapatkan 110 anak DSA sekundum sporadik dan 110 anak bukan penderita PJB sebagai kontrol yang memenuhi kriteria inklusi.

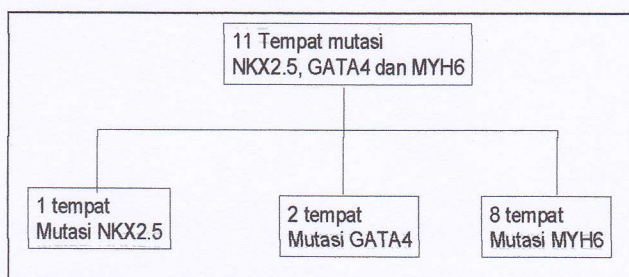
Ditemukan mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 pada tujuh anak DSA sekundum sporadik dan tidak ditemukan mutasi gen TBX5 (Gambar 1). Jenis dan jumlah tempat mutasi

adalah: NKX2.5 satu tempat dan MYH6 tiga tempat mutasi pada satu anak DSA; GATA4 dua tempat mutasi pada dua anak DSA sekundum sporadik, satu di antaranya disertai satu tempat mutasi MYH6; MYH6 delapan tempat mutasi pada empat anak DSA (Gambar 2). Jenis mutasi yang terjadi pada DSA sekundum sporadik terlihat pada Gambar 3.

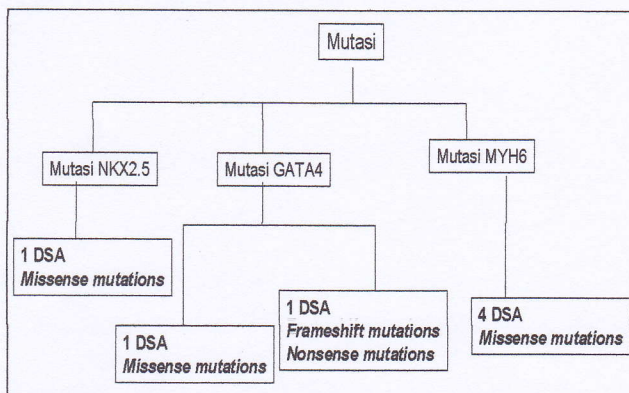
Pada sampel CHD71 yang mengalami mutasi NKX2.5 dan MYH6, sampel CHD98 yang mengalami mutasi GATA4 dan MYH6, serta sampel CHD129 yang mengalami mutasi GATA4, dilakukan pemeriksaan mutasi gen pada kedua orangtua dan saudara kandung yang lain, ternyata tidak didapatkan mutasi baik pada orangtua maupun saudara kandung. Pada sampel yang mengalami mutasi MYH6 tidak dilakukan pemeriksaan mutasi gen pada orangtua maupun saudara kandung yang lain karena keterbatasan biaya.



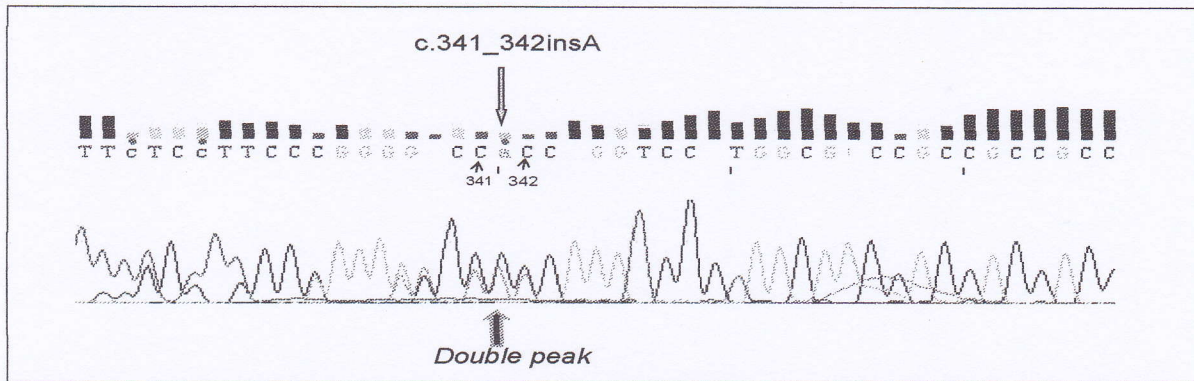
Gambar 1. Skema Anak DSA Sekundum Sporadik dengan Mutasi NKX2.5, GATA4, dan MYH6



Gambar 2. Skema Tempat Mutasi NKX2.5, GATA4, dan MYH6



Gambar 3. Skema Anak DSA Sekundum Sporadik dengan Jenis Mutasi Gen (Missense Mutation, Frameshift Mutations, Nonsense Mutations)



Gambar 4. Frameshift Mutation gen GATA4 pada CHD71

Hasil sekuensing DNA pada penelitian ini menunjukkan mutasi gen GATA4 pada CHD71 yaitu terdapatnya insersi A (adenine=a) diantara nukleotida no 341 dan 342 (c341_342) dan terdapat *double peak*, menunjukkan mutasi yang terjadi adalah *frameshift mutation* (Gambar 4).

Penelitian ini menunjukkan terdapat hubungan mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik (Rasio Odds= 16,01; IK= 13,97-18,05). (Tabel 1)

Tabel 1. Hubungan Mutasi Gen dengan DSA Sekundum Sporadik

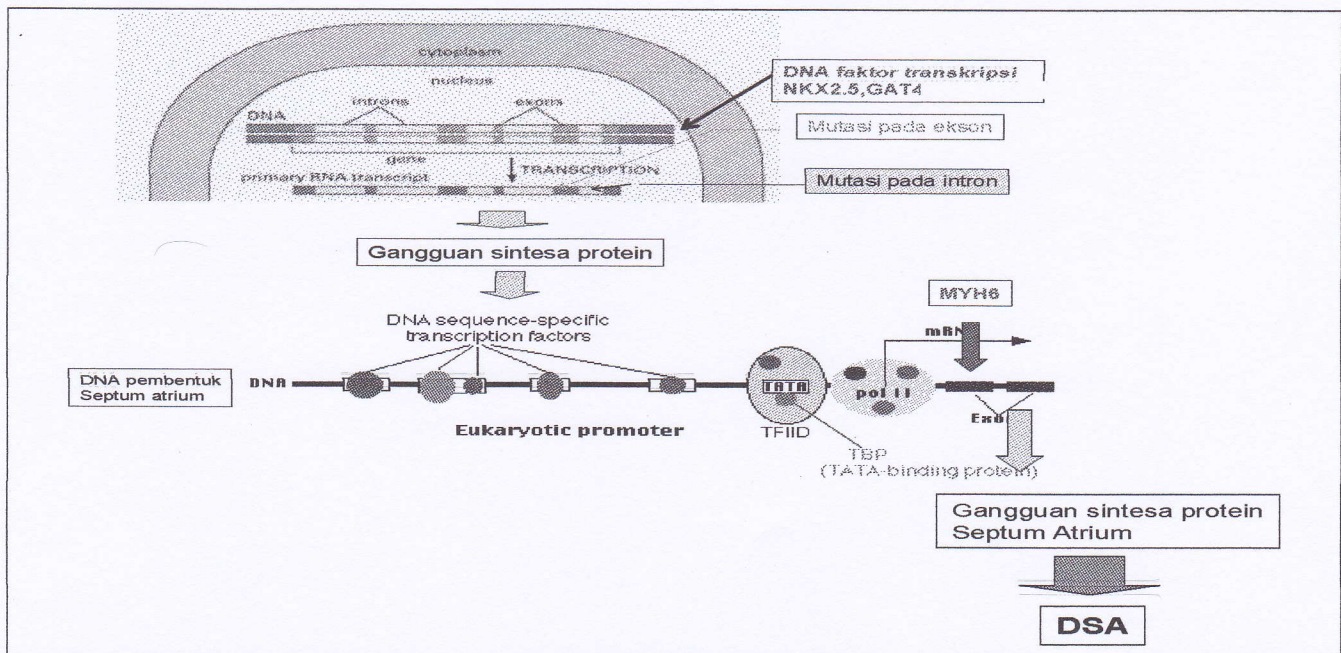
	DSA	Kontrol	Jumlah
Mutasi Gen (+)	7	-	-
Mutasi Gen (-)	103	110	
	110	110	220

Rasio Odds=16,01, IK=13,97-18,05

Pada Tabel 1 tersebut hubungan mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 pada DSA sekundum sporadik dilakukan perhitungan statistik dengan menggabungkan ketiga jenis mutasi NKX2.5, GATA4, dan MYH6. Tabel 2 adalah perhitungan statistik masing masing mutasi gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA sekundum sporadik.

Tabel 2 Hubungan Masing Masing Mutasi Gen NKX2.5, GATA4, dan MYH6 dengan DSA Sekundum Sporadik

Mutasi gen	Rasio Odds	Interval kepercayaan
NKX2.5	3,03	2,70-3,35
GATA4	5,09	4,49-5,69
MYH6	28,05	24,42-31,6



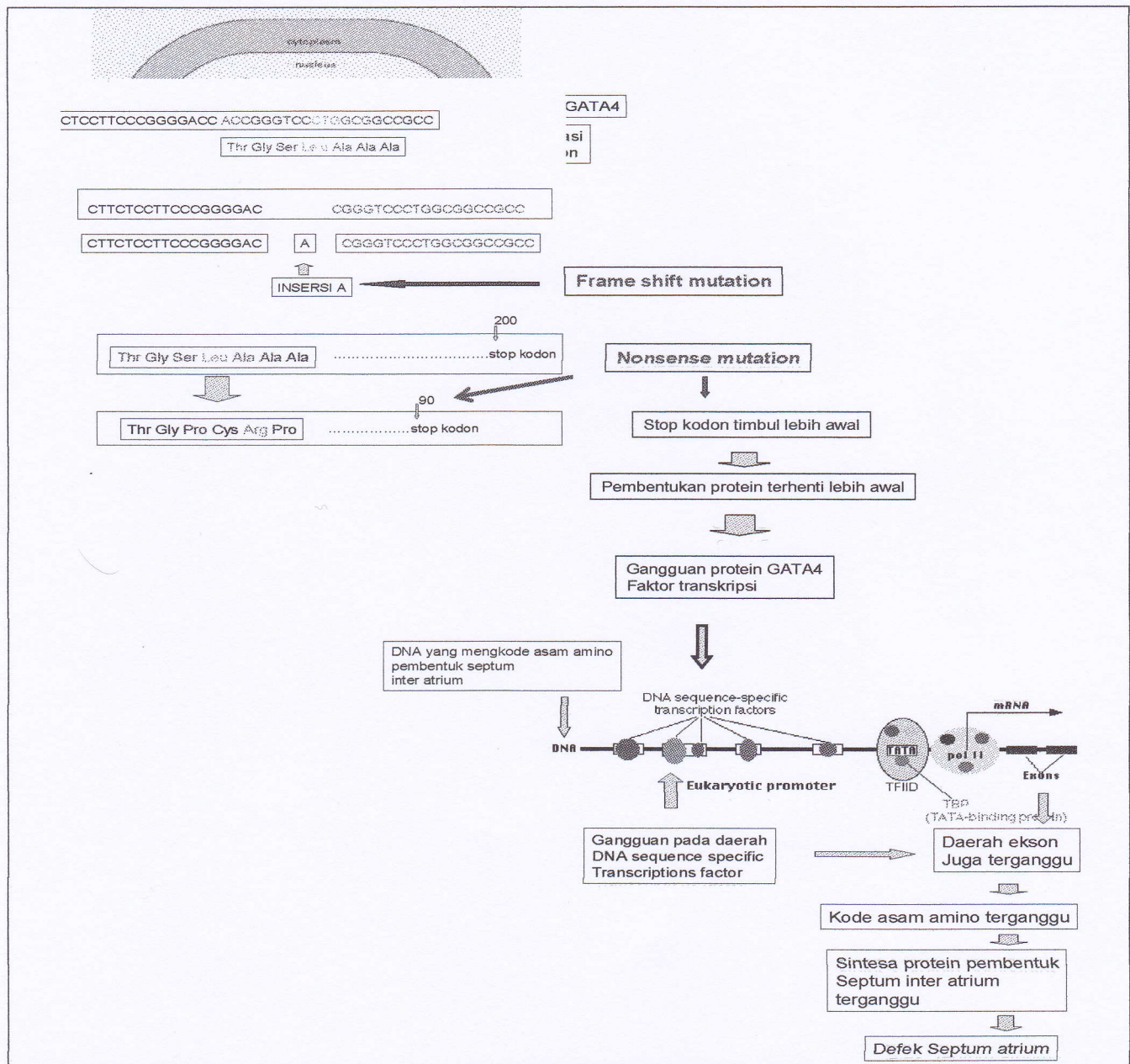
Gambar 4. Mekanisme Gen NKX2.5 dan GATA4 Sebagai Faktor Transkripsi dan MYH6 yang Bukan Faktor Transkripsi Sebagai Penyebab DSA Modifikasi dari Lewin²²

Diskusi

DSA adalah termasuk PJB yang dapat disebabkan oleh faktor genetik. Penelitian sebelumnya menunjukkan peran mutasi gen NKX2.5, GATA4, MYH6, dan TBX5 pada DSA. Gen NKX2.5, GATA4, dan TBX5 merupakan faktor transkripsi, yaitu suatu faktor yang menghasilkan protein yang dapat mempengaruhi gen lain Sedangkan gen MYH6 berperan pada sintesis protein pembentuk septum atrium.¹⁵⁻²⁰ (Gambar 4)

Dalam penelitian ini ditemukan mutasi GATA4 berupa terdapatnya insersi A pada c 341. Insersi A ini menyebabkan urutan nukleotida bergeser sehingga asam amino yang dikode menjadi berubah. Walaupun dua asam amino yang pertama

tidak berubah (Thyr dan Gly), tetapi asam amino urutan selanjutnya berubah dan dikenal sebagai *frame shift mutation* yang akan menimbulkan *premature stop codon*. Hal itu menyebabkan sintesis protein terhenti lebih awal sehingga terdiperubahan struktur protein.^{21,22} GATA4 merupakan gen faktor transkripsi yang akan menyebabkan perubahan struktur protein faktor transkripsi¹⁵ sehingga menyebabkan gangguan pada daerah *sequence specific transcription factors gene* DNA dan akan mengkode asam amino pembentuk septum atrium sehingga pada akhirnya struktur protein pembentuk septum atrium juga berubah dan terjadilah DSA. (Gambar 5)



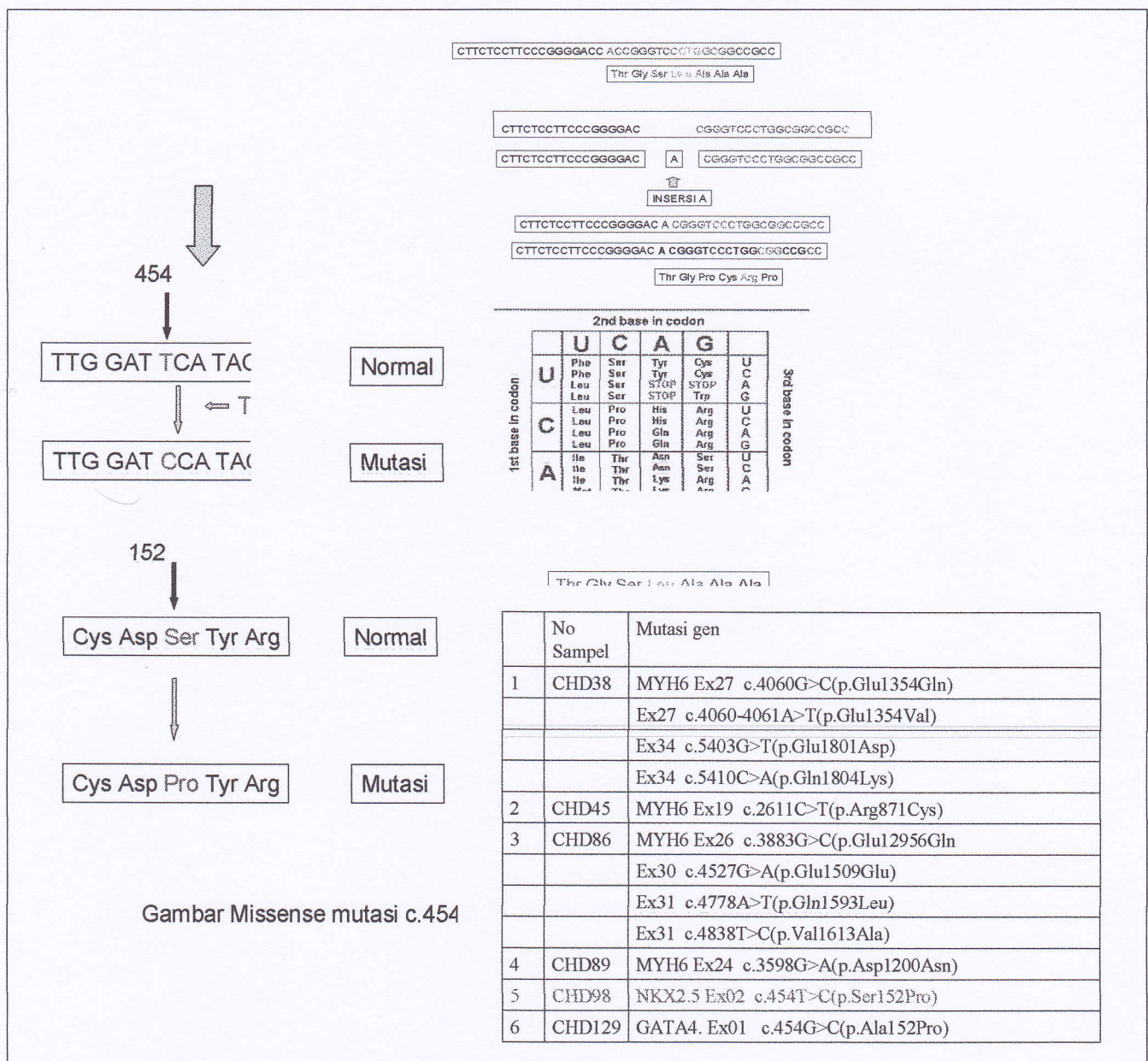
Gambar 5. Mekanisme *Frame Shift Mutation* dan *Nonsense Mutation* pada DSA
 Keterangan: mutasi GATA4 pada CHD71 Ex010c.341_342insA (p.Thr114Thr: 95cKodon)

Pemeriksaan yang dilakukan pada kedua orangtua dan saudara kandung tidak menunjukkan adanya mutasi GATA4 sehingga mutasi yang terjadi pada pasien ini adalah *de novo mutation*. Hal ini merupakan laporan pertama mutasi GATA4 pada DSA sporadik. Penelitian yang dilakukan O Kubo *et al*,²¹ menunjukkan sembilan di antara 11 DSA familial mengalami mutasi GATA4, mutasi yang terjadi adalah delesi c1074 pada ekson 6, sedangkan mutasi GATA4 pada DSA sporadik belum pernah dilaporkan.

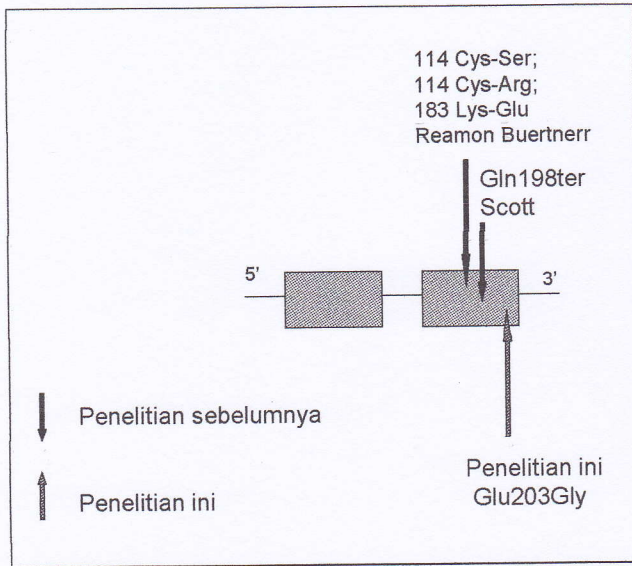
Pada CHD71 juga ditemukan mutasi MYH6 yaitu Ex34 IVS34+22 a>g, tetapi mutasi yang terjadi terletak pada intron yang tidak berdekatan dengan ekson sehingga tidak

menyebabkan gangguan proses *splicing*,²¹ maka pada CHD071 penyebab DSA adalah mutasi GATA4.

Mutasi gen NKX2.5 dan MYH6 pada penelitian ini adalah *missense mutations* yang tidak menyebabkan timbulnya *pre-mature stop codon*, hanya menyebabkan terjadinya perubahan pembentukan asam amino. (Gambar 6) Pada penelitian ini interaksi antara mutasi gen NKX2.5, MYH6 dan faktor lingkungan menyebabkan terjadinya DSA sekunder. Tempat mutasi NKX2.5 dan MYH6 pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya (Gambar 7 dan 8), hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kultur dan budaya yang bertindak sebagai filter pada ekspresi genetik seseorang.²³



Gambar 6. Missense Mutations pada NKX2.5, GATA4, dan MYH6
Keterangan: NKX2.5 Ex02 c.454T>C (p.Ser152Pro)



Gambar 7. Perbandingan Tempat Mutasi NKX2.5 pada Penelitian Ini dan Penelitian Sebelumnya

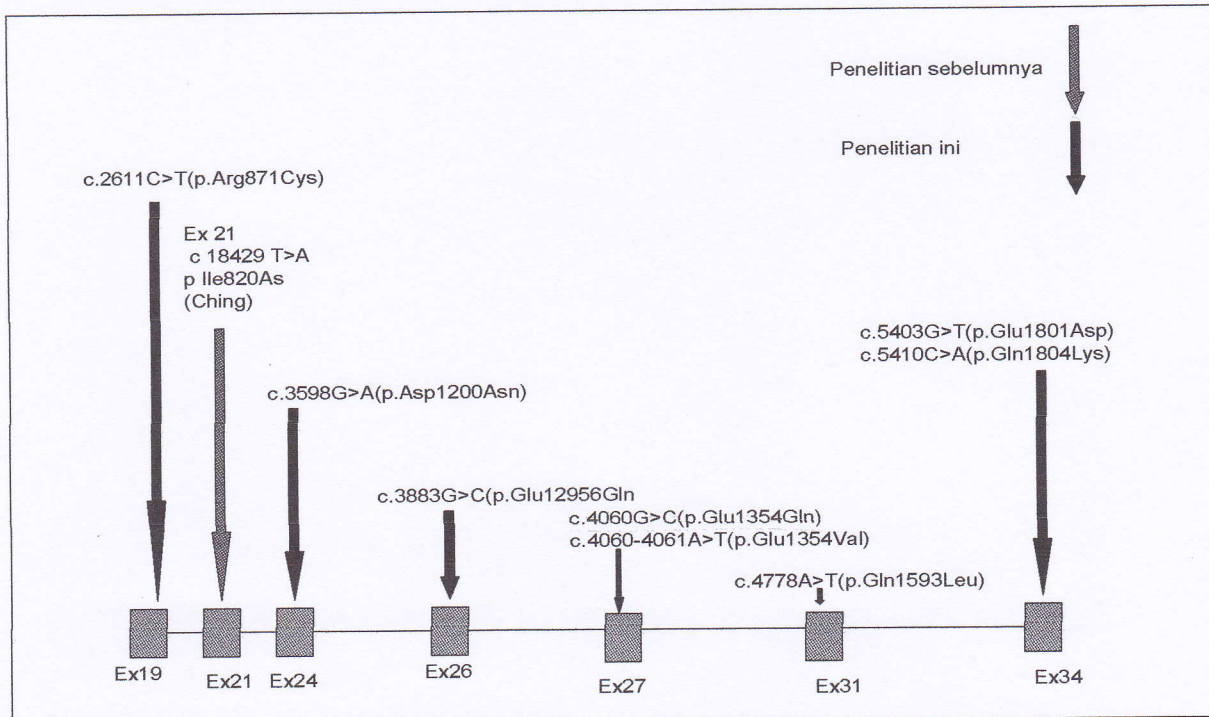
mutasi yang terjadi merupakan *frameshift mutation* yang menimbulkan pembentukan *premature stop codon*.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini mendapat dukungan dana dari *Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare* dan *Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan*. Ucapan terimakasih ditujukan kepada Prof Naomichi Matsumoto MD, PhD dan Haruka Hamanoue, MD dari *Departments of Human Genetics Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Jepang* yang telah membantu melaksanakan sekuensing DNA pada penelitian ini

Daftar Pustaka

1. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890-900.
2. Porter CJ, Feldt RH, Edwards WD, Seward JB, Schaff HV. Atrial septal defects. Dalam: Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll



Gambar 8. Perbandingan Tempat Mutasi MYH6 pada Penelitian ini, yang Merupakan *Missense Mutations*, dengan Penelitian Sebelumnya

Kesimpulan

Ditemukan sebelas tempat mutasi NKX2.5, GATA4 dan MYH6 yang berbeda dengan penelitian terdahulu. Mutasi gen NKX2.5, dan MYH6 berhubungan dengan terjadinya DSA sekundum sporadik, karena mutasi yang terjadi adalah *missense mutation* yang tidak menimbulkan *premature stop codon*, sedangkan mutasi gen GATA4 pada penelitian ini adalah penyebab terjadinya DSA sekundum sporadik karena

DJ, penyunting. *Moss and Adam's heart disease in infants, children, and adolescents*, edisi ke-6. Philadelphia: William & Wilkins; 2001.h.603-17.

3. Vick GW. Defects of the atrial septum including atrioventricular septal defects. Dalam: Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR, penyunting. *The science and practice of pediatric cardiology*, edisi ke-2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. h. 1141-80.
4. Okubo A, Miyoshi O, Baba K. A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family. *J Med Genet.* 2004;41:97-102.

5. Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Barat. Profil kesehatan provinsi Jawa Barat. Bandung: Departemen Kesehatan Provinsi Jawa Barat; 2004.
6. Park MK. Pediatric cardiology for practitioners, edisi ke-5. Philadelphia: Mosby; 2007.
7. König K, Will JC, Berger F. Familial congenital heart disease, progressive atrioventricular block and the cardiac homeobox transcription factor gene NKX2.5: identification of a novel mutation. *Clin Res Cardiol.* 2006;95:1-5.
8. Khalid Y, Ghina M, Fadi B, Fadi C, May K, Joseph R, dkk. Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case-control study in the neonatal period. *Am J Med Genet.* 2006;140A:1524-30.
9. Cedergren MI, Kallen BAJ. Maternal obesity and infant heart defects. *Obes Res.* 2003;11:123-8.
10. Botto LD, Cornea A, Erickson JD. Racial and temporal variations in the prevalence of heart disease. *Pediatrics.* 2001;107:32-42.
11. Forrester MB, Merz RD. Descriptive epidemiology of selected congenital heart defects, Hawaii, 1986-1999. *Paed Perinat Epid.* 2004;18:415-24.
12. Morales-Suañez-Varela MM, Bille C, Christensen K, Olsen J. Smoking habits, nicotine use, and congenital malformations. *Obstet & Gynec.* 2006;107:51-7.
13. Clark EB. Etiology of congenital cardiovascular malformations: epidemiology and genetics. Dalam: Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DJ, penyunting. Moss and Adam's heart disease in infants, children, and adolescents, edisi ke-6. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2001.h.64-79.
14. Nora JJ, Nora AH. Recurrence risks in children having one parent with a congenital heart disease. *Circulations.* 1976;53:701-2.
15. Schott JJ, Benson DW, Basson CT. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factors NKX2-5. *Science.* 1998;281:108-11
16. Reamon-Buettner SM, Borlak J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J Med Genet.* 2004;41:684-90.
17. Reamon-Buettner SM, Borlak J. TBX5 mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat.* 2004;24(1):218-22.
18. Carniel E, Taylor MRG, Sinagra G, Lenarda A, Ku L, Fain PR. α Myosin heavy chain a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulations.* 2005;112:54-9.
19. Gruber PJ, Epstein JA. Development gone awry: congenital heart disease. *Circ Res.* 2004;94:273-83.
20. Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet.* 2005;37(4):423-8.
21. Strachan T, Read AP. Human molecular genetics, edisi ke-3. New York: Garland Science; 2004.
22. Lewin B. Genes VII. USA: Oxford University Press; 1999.
23. Jackson FLC. Human genetic variation and health: new assessment approaches based on ethnogenetic layering. *Brit Med Bull.* 2004;69:215-35.

