

**Analisis Pengaruh Mutasi Titik pada Faktor Transkripsi Gen HNF4A
(Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha)**

Melinda Remelia,^{1,2*} Silvia T. Widyaningtyas,^{3,4}

¹Program Doktorat Ilmu Biomedik Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia,
Jakarta Indonesia

²Departemen Ilmu Biomedik Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia,
Jakarta Indonesia

³Pusat Penelitian dan Layanan Kesehatan Virologi dan Kanker Patobiologi
- RSCM Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta Indonesia

⁴Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta Indonesia

Abstrak

Mutasi titik pada basa nukleotida yang ke-370 pada gen *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A) diketahui menyebabkan sindrom renal Fanconi. Penelitian molekular terhadap mutasi tersebut masih perlu dikembangkan untuk pencegahan dan terapi. Sejumlah perangkat lunak dapat digunakan untuk analisis bioinformatika sebelum dilakukan penelitian molekular. Pada penelitian ini, dilakukan prediksi struktur sekunder protein, analisis enzim restriksi, serta analisis perubahan struktur tiga dimensi protein yang dihasilkan. Informasi yang diperoleh menunjukkan perubahan satu basa nukleotida tersebut mempengaruhi karakteristik protein yang dihasilkan melalui analisis komposisi protein. Perubahan struktur sekunder berkaitan dengan perubahan fungsi biologis gen HNF4A sebagai DNA *binding* pada proses transkripsi. Analisa struktur tiga dimensi menampilkan beberapa perubahan interaksi antar asam amino pada protein HNF4A yang termutasi.

Kata kunci: HNF4A, mutasi titik, sindrom renal fancony

**Analysis of the Effect of Point Mutations on Transcription Factor HNF4A Gene
(Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha)**

Abstract

Point mutations in the 370th nucleotide base in the hepatocyte nuclear factor (HNF4A) gene are known to cause renal Fancony syndrome. Molecular research on these mutations still needs to be developed for the prevention and therapy. A number of software can be used for bioinformatics analysis before molecular research is conducted. We predicted the secondary structure of the protein, analyzed restriction enzymes, and analyzed the changes in the three-dimensional structure of the protein produced. The information obtained shows how changes in one nucleotide base affect the characteristics of the protein produced through analysis of protein composition. Changes in secondary structure are related to changes in the biological function of the HNF4A gene as DNA binding in the transcription process. Three-dimensional structure analysis shows some changes in interactions between amino acids in mutated HNF4A proteins.

Keywords: HNF4A, point mutation, renal fancony syndrom

*MR: Penulis Koresponden; E-mail: melindaremelia@gmail.com

Pendahuluan

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A) adalah protein faktor transkripsi di inti sel yang mengikat DNA dalam bentuk homodimer.¹ Protein HNF4A merupakan anggota superfamili reseptor hormon steroid yang diekspresikan di hati, ginjal, usus halus, dan pankreas (termasuk sel beta). Beberapa studi menunjukkan fungsi protein HNF4A sebagai *DNA binding, fatty DNA binding, receptor binding, protein homodimerization activity, RNA pol II activating transcription factor binding, RNA pol II core promoter sequence-specific DNA binding, steroid hormone receptor activity, transcriptional activator activity, dan zinc ion binding*. Protein HNF4A juga berperan pada proses koagulasi darah, homeostasis glukosa, homeostatis lipid, proses metabolisme lipid, regulasi proliferasi dan pertumbuhan sel, homeostatis fosfolipid dan trigliserida, serta regulasi enzim metabolisme.^{1,2}

Beberapa mutasi titik di gen HNF4A dapat menyebabkan penyakit dan kelainan kongenital. Mutasi pada gen HNF4A asam amino ke 85 (R85W) diketahui dapat menyebabkan kelainan klinis yaitu *fanconi renotubular syndrome-4* (FRTS-4).^{2,3} Penyakit tersebut ditandai oleh sindrom Fanconi yang terkait dengan fenotipe sel beta hiperinulinisme neonatal dengan makrosomia, dan diabetes awitan muda. Diabetes yang disebabkan oleh HNF4A cenderung terjadi pada masa kanak-kanak atau awal masa dewasa walaupun beberapa orang mungkin tidak terdiagnosis sampai usia lanjut.³

Sindrom Fanconi umumnya menghasilkan tubulopati proksimal yang menghasilkan aminoasiduria, proteinuria dengan berat molekul rendah, glikosuria, hiperfosfaturia dan hipourisemia. Beberapa pasien FRTS4 memiliki nefrokalsinosis, kerusakan ginjal, hiperkalsiuria dengan hipokalsemia relatif, dan hipermagnesemia.^{3,4}

Seiring dengan waktu, beberapa pasien juga memerlukan peningkatan dosis obat/insulin untuk dapat menjaga kadar gula darah normal. Glukosa darah yang tidak terkontrol dapat memengaruhi pembuluh darah kecil di mata dan ginjal. Bayi yang mewarisi mutasi tersebut sering memiliki berat lahir lebih dari 4 kilogram, dan mungkin memiliki gula darah rendah di awal kelahirannya sehingga memerlukan perawatan (*neonatal hypoglycaemia*).^{1,4}

Penelitian di bidang molekular umumnya menghabiskan banyak waktu, biaya, dan spesimen percobaan. Data bioinformatika mengenai gen HNF4A yang akan dianalisis sebelum penelitian di laboratorium basah dimulai perlu dilakukan. Penelitian bioinformatika merupakan analisis berbasis komputer, sehingga *trial* dan *error* tidak menjadi kendala.⁵ Pada penelitian ini dilakukan analisis gen HNF4A manusia yang diketahui memiliki 13 ekson, terdiri dari 4707 pasangan basa (pb) dan mengkode 464 asam amino. Pengkajian bioinformatika yang kami lakukan, yaitu membandingkan HNF4A normal dan yang termutasi R85W dari sekuen DNA, analisis struktur sekunder dan tersier tiga dimensi proteinnya.

Bahan dan Cara

Pemilihan Sekuens DNA HNF4A

Sekuen dikumpulkan dari data *gene bank National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan kata kunci "*Human Hepatocyte Nuclear Factor-4A (HNF4A)*", kemudian diseleksi berdasarkan kelengkapan aksesori protein, aksesori nukleotida, jumlah asam amino *single nucleotide polymorphism* (SNP), dan urutan sekuens asam amino. Data SNP dipilih yang memiliki manifestasi klinis pada analisis struktur protein berdasarkan data *online mendelian inheritance in man* (OMIM). Informasi tambahan juga diperoleh dari situs

prosite dengan kata kunci protein human HNF4A. Proses seleksi menghasilkan 1 sekuens lengkap dari HNF4A manusia dengan nomor akses NM_178849.2. Urutan nukleotida dan asam amino disimpan dalam format FASTA pada notepad “txt” untuk analisis selanjutnya.

Analisis Struktur Sekunder HNF4A

Menurut data OMIM, diketahui terdapat 4 macam mutasi yang menyebabkan manifestasi klinis. Selanjutnya dipilih satu mutasi SNP, terletak di bagian DNA binding, dan ditranslasi menjadi protein (OMIM: 600281). Berdasarkan data base SNP (dbSNP) dari situs NCBI diperoleh 11 model mutasi SNP Arginin menjadi Triptofan. Informasi situs pemotongan enzim restriksi basa nukleotida dianalisis menggunakan program NEB *cutter* dibandingkan antara gen HNF4A termutasi dengan normal. Analisa dapat dilakukan dengan memasukkan sekuens DNA HNF4A normal dan termutasi. Pemetaan enzim-enzim restriksi yang dapat digunakan akan ditampilkan lalu dibandingkan hasilnya dengan yang termutasi (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Prediksi lokasi SNP pada gen HNF4A dilakukan menggunakan situs *transmembrane helices based on a hidden markov model* (TMHMM).

Pembuktian kemampuan HNF4A sebagai *DNA binding* dianalisis dengan *nuclear receptor prediction prosite*. Pemodelan struktur sekunder dilakukan untuk memprediksi pengaruh mutasi struktur protein. Sekuens nukleotida HNF4A *wildtype* dengan kode NM_178849.2 kemudian diinput ke file notepad, diedit dengan perubahan basa ke 370 dari C menjadi T dan ditranslasi menjadi sekuens protein HNF4A termutasi. Kedua sekuens normal dan termutasi tersebut kemudian disimpan dalam format “txt”. Perubahan tersebut dianalisis pengaruhnya menggunakan

beberapa perangkat lunak dalam jaringan sebagai berikut *protscale*, *signal peptide*, *psipred*, *nuclear receptor prediction*, *prosite*, dan *peptide cutter*.

Analisis Tiga Dimensi HNF4A

Analisis tiga dimensi dilakukan dengan cara menyimpan sekuens protein kemudian juga disimpan dalam format “pdb” menggunakan situs SWISS-MODEL dan divisualisasi menggunakan program Pymol2. Analisis interaksi antar asam amino juga dapat dilihat dengan program tersebut.

Hasil & Diskusi

Analisis Perbandingan Sekuen DNA HNF4A

HNF4A manusia dengan nomor akses NM_178849.2 diketahui terletak pada kromosom 20q13.12 dan memiliki 13 ekson. Gen HNF4A manusia terdiri atas 4707 pasangan basa (pb) atau 464 asam amino. Analisis SNP menunjukkan bahwa terdapat mutasi titik pada gen HNF4A dan merupakan mutasi *missense*. Mutasi *missense* merupakan perubahan satu nukleotida yang menyebabkan perubahan satu asam amino. Implikasi klinis faktor transkripsi HNF4A terletak pada mutasi basa ke-370, di ekson ke-5, yaitu perubahan basa “C” menjadi basa “T”. Perubahan pada basa ini menyebabkan perubahan asam amino Arginin(R) menjadi Tryptopan (W) (Tabel 1).

Analisis Struktur Sekunder Protein HNF4A

Prediksi HNF4A manusia menggunakan program TMHMM menunjukkan protein tersebut bukan merupakan protein transmembran baik normal maupun mutan.^{5,6} Protein HNF4A diketahui merupakan protein yang seluruhnya diekspresikan di

Tabel 1. SNP pada Gen HNF4A Manusia yaitu Perubahan Basa ke 370 dari C menjadi T

Function	mRNA				Protein		
	SNP to mRNA	Accession	Position	Allele change	Accession	Position	Residue change
Missense	Fwd	NM_178849.2	370	CGG⇒TGG	NP_849180.1	85	R[Arg] ⇒ W [Trp]

inti sel. Berdasarkan analisis signaling peptide, pada protein HNF4A juga tidak memiliki *signaling peptide* (score: 0). Hal ini disebabkan bahwa protein HNF4A diekspresikan dan berintegrasi dengan protein lain untuk berada di inti sel. Data yang kami peroleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Marchesin *et al.*,⁶ pada tahun 2013, protein HNF4A diekspresikan semua di dalam nukleus, sedangkan hepatosit residual pada nekrosis masif menunjukkan ekspresi rendah di sitoplasma. Ekspresi mRNA HNF4A pada hepatosit duktular ditunjukkan pada tingkat sel tunggal dengan mikrodensi pencitraan laser.

Berdasarkan analisis situs pemotongan enzim restriksi, perubahan mutasi R85W juga menyebabkan berkurangnya jumlah enzim restriksi yang dapat memotong sekuens DNA. Analisa dilakukan dengan menggunakan *Nebcutter* menunjukkan terdapat 4 situs pemotongan yang tereliminasi pada HNF4A yang termutasi diantaranya: BpmI, MslI, BspEI, dan BsaWI. Pemetaan enzim-enzim restriksi yang dapat digunakan akan ditampilkan lalu dibandingkan hasilnya dengan yang termutasi (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Mutasi pada asam amino ke 85 diketahui berkaitan dengan domain fungsi HNF4A sebagai DNA *binding*⁷ sehingga diperlukan analisis DNA *binding* dengan *nuclear receptor prediction prosite*. Hasil perbandingan menunjukkan terjadi penurunan score yang dihasilkan antara HNF4A normal (21.189) dengan mutasi R85W HNF4A (score 20,41). Penurunan skor tersebut menunjukkan perubahan satu sekuens menyebabkan

penurunan kemampuan protein HNF4A berfungsi sebagai *nuclear receptor*. Analisa dapat dilakukan secara online pada (<http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi?scanfile=1667307158744.scan.gz>).

Data pendukung struktur protein lainnya adalah analisis prosite. Tidak ada perbedaan bermakna antara profil skala asam amino normal dan termutasi. Posisi hidrofobik dan hidrofilik yang dihasilkan sama. Analisis komposisi protein yang dilakukan dengan protparam menunjukkan beberapa perbedaan, dari komposisi asam amino, berat molekul, nilai isoelektrik (pI), komposisi atom, dan *coefficient extinction* (Tabel 2).

Perubahan satu basa nukleotida C menjadi T pada HNF4A di posisi 370 menyebabkan perbedaan persentasi pada Arginin (5,8%) menjadi (5,6%) dan Triptofan dari 0,4% menjadi 0,6%, terjadi peningkatan berat molekul dari 51619.40 menjadi 51649.43, perubahan komposisi atom karbon dan hidrogen, dan penurunan nilai isoelektrik. Jumlah atom keseluruhan pada HNF4A termutasi dengan formula $C_{2272}H_{3642}N_{634}O_{682}S_{28}$ hanya mengalami peningkatan 1 angka dari 7257 pada HNF4A normal dengan formula $C_{2267}H_{3644}N_{636}O_{682}S_{28}$, menjadi 7258.

Mutasi yang terjadi pada sindrom fanconi renotubular ini menyebabkan penurunan nilai pI, artinya memengaruhi kelarutan HNF4A pada tingkat keasaman (pH) tertentu.⁸ Titik isoelektrik memiliki peranan terhadap fungsi protein karena nilai pI dapat memengaruhi kelarutan suatu molekul pada pH tertentu.^{8,9} *Extinction coefficient* merupakan ukuran penyerapan cahaya dalam suatu media.

Tabel 2. Perbandingan Komposisi Protein Hnf4a Arg R-85 (Normal) dan Trp W-85

Keterangan	HNF4A		
	Arg-85	Trp-85	
Asam Amino (AA)	464	464	
Berat Molekul (gr/mol)	51619.40	51649.43	
Theoretical pI	6.86	6.64	
Komposisi Asam Amino :	Ala (A)	7.1%	7.1%
	Arg (R)	5.8%	5.6%
	Asn (N)	3.7%	3.7%
	Asp (D)	6.0%	6.0%
	Cys (C)	2.6%	2.6%
	Gln (Q)	5.0%	5.0%
	Glu (E)	5.4%	5.4%
	Gly (G)	5.8%	5.8%
	His (H)	2.6%	2.6%
	Ile (I)	5.8%	5.8%
	Leu (L)	11.2%	11.2%
	Lys (K)	5.4%	5.4%
	Met (M)	3.4%	3.4%
	Phe (F)	2.8%	2.8%
	Pro (P)	6.0%	6.0%
	Ser (S)	8.2%	8.2%
	Thr (T)	4.3%	4.3%
	Trp (W)	0.4%	0.6%
	Tyr (Y)	2.8%	2.8%
	Val (V)	5.6%	5.6%
Pyl (O)	0.0%	0.0%	
Sec (U)	0.0%	0.0%	
Komposisi Atom :	Karbon (C)	2267	2272
	Hidrogen (H)	3644	3642
	Nitrogen (N)	636	634
	Oksigen (O)	682	682
	Sulfur (S)	28	28
Formula	C ₂₂₆₇ H ₃₆₄₄ N ₆₃₆ O ₆₈₂ S ₂₈	C ₂₂₇₂ H ₃₆₄₂ N ₆₃₄ O ₆₈₂ S ₂₈	
Jumlah Atom	7257	7258	
Indeks Instabilitas	43.82	42.59	
Indeks Alifatik	89.76	89.76	
Extinction Coefficient	Negatif (Cys reduced/terurai)	35870	30370
	Positif (Residu Cys terbentuk)	36620	31120

Keterangan: Perbedaan ditunjukkan pada warna abu-abu. Data diperoleh dari situs <http://web.expasy.org/protparam/>

Berdasarkan data protparam mutasi yang terjadi juga menyebabkan penurunan nilai *extinction coefficient*. Indeks instabilitas yang ditampilkan juga menunjukkan penurunan dari 43,82 menjadi 42,59. Hal tersebut menunjukkan bahwa struktur protein HNF4A normal lebih stabil dibandingkan yang termutasi.

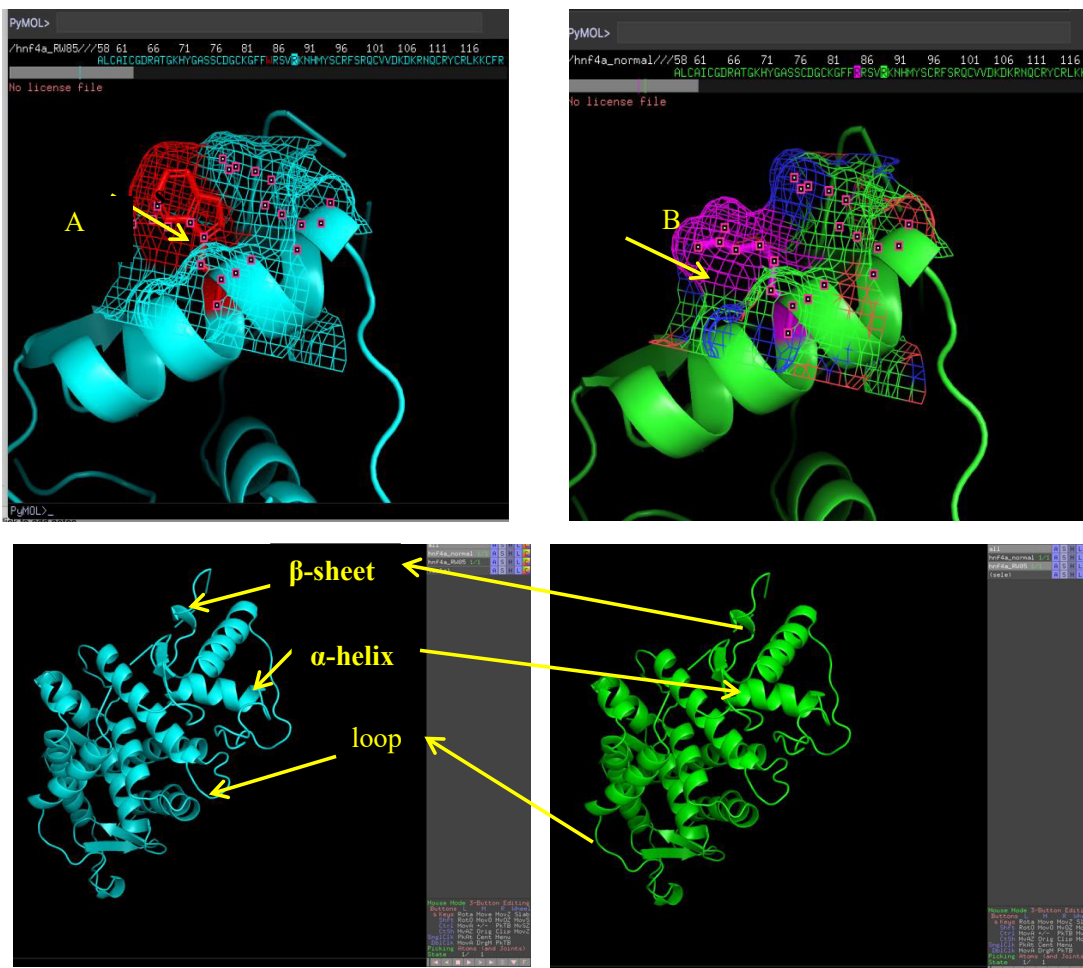
Analisis struktur tiga dimensi HNF4A

Mutasi satu titik dapat memiliki pengaruh yang berbeda pada fungsi protein, bergantung pada apakah mutasi tersebut bersifat konservatif atau non-konservatif.^{9,10} Mutasi *missense* dapat terjadi apabila asam amino yang terbentuk dari proses translasi

sekuen yang termutasi memiliki peran dan fungsi biologis penting. Demikian halnya pengaruh mutasi satu titik C menjadi T pada basa nukleotida ke 370 yang terjadi pada protein faktor transkripsi HNF4A. Sejumlah perubahan terjadi memengaruhi komposisinya sehingga menimbulkan perubahan fungsinya sebagai faktor transkripsi. Berdasarkan informasi gen struktur HNF4A, wilayah DNA *binding* domain berada di antara asam amino ke 50-116. Hal ini memungkinkan pengaruh mutasi di asam amino ke-85 juga menimbulkan gangguan klinis (sindrom FRTS-4), karena menghambat aktivitas pengikatan DNA pada proses transkripsi. Selain itu, sindrom juga dapat disebabkan oleh sejumlah penurunan

fungsi pada protein tersebut seperti yang telah dijabarkan pada analisa protparam

Analisis struktur 3D protein termutasi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar peran mutasi yang dapat mempengaruhi struktur, ikatan maupun fungsi dari protein normalnya. Perubahan asam amino ke-4707 dari Arginin menjadi Triptofan pada HNF4A tidak menyebabkan perubahan struktur 3D yang signifikan akan tetapi apabila dilihat interaksi beberapa asam aminonya terdapat perubahan. Hal ini dikonfirmasi dengan perbandingan antara struktur 3D HNF4A *wildtype* (1A) berwarna merah tua, dengan HNF4A termutasi (1B) warna merah muda pada pemodelan Pymol2 (Gambar 1.)



Gambar 1. Prediksi struktur tiga dimensi protein HNF4A manusia dan interaksi asam amino pada mutasi W85 (1a) asam amino tryptopan dibandingkan dengan normal 85R dengan asam amino arginin (1b) [Pymol2]

Kesimpulan

Mutasi HNF4A pada perubahan basa ke 370 (C>T) mengakibatkan perubahan asam amino ke 85 yaitu Arginin menjadi Triptofan (R>W), mutasi ini terletak pada ekson ke-5. Beberapa perbedaan komposisi protein juga dapat dilihat dengan analisis proparam. Perubahan ini mengakibatkan perubahan fungsi DNA *binding* menurun, meskipun struktur tiga dimensi terlihat tidak berbeda signifikan, namun dengan analisis Pymol 2, dapat dilihat interaksi antar protein terdapat perbedaan.

Daftar Pustaka

1. Fang B, Mane-Padros D, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM. Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nuc Acid Res*, 2012; 40: 5343-56.
2. Online Mendelian Inheritance in Man [online]. 2020. Tersedia di: <https://omim.org/>. Diakses pada: 25 November 2020.
3. Stanescu DE, Hughes N, Kaplan B, Stanley CS, De Leon DD. Novel presentations of congenital hyperinsulinism due to mutations in MODY genes: HNF1A and HNF4A. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(10):E2026 –E2030.
4. Stanik J, Skopkova M, Brennerova K, Danis D, Rosolankova M, Salingova A, Bzduch V, et al. Congenital hyperinsulinism and glycogenosis-like phenotype due to a novel HNF4A mutation. *Diab Res & Clin Practice*. 2017; 126: 144-50.
5. Hamilton AJ, Bingham C, McDonald TJ, Cook PR, Caswell RC, Weedon MN, Oram RA, et al. The HNF4A R76W mutation causes atypical dominant Fanconi syndrome in addition to a β cell phenotype. *J Med Genet*. 2014; 51: 165-9.
6. Marchesin V, Perez-Marti A, Le Meur G, Pichler R, Grand K, Klootwijk ED, Kesselheim A, Kieta R, Lienkamp S, Simons M. Molecular basis for autosomal-dominant renal fanconi syndrome caused HNF4A. *Cell Reports*. 2019; 29: 4407-21.
7. Chandra V, Huang P, Nalini P, Wu D, Kim Y, Rastinejad F. Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex. *Nat*. 2013: e101038.
8. Krane DE, Raymer ML. Fundamental concepts of bioinformatics. Newyork, Benjamin Cummings. 2002.
9. Okada T, Katoh A. Metabolomics: data collection and analysis, chap 27. In: Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Westfall MV, editors. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. 3. London: Taylor & Francis Group (CRC Press); 2011. pp. 471–84.
10. Claverie J, Notredame C. Bioinformatics for dummies. 2. US: Wiley Publishing, Inc; 2007.