

Transcriptomic Analysis and Laboratory Experiments Reveal Potential Critical Genes and Regulatory Mechanisms in Sepsis-Associated Acute Kidney Injury

Pendahuluan

Sepsis adalah kerusakan fungsi organ tubuh akibat respon imun tubuh yang berlebihan terhadap infeksi. Salah satu organ yang paling umum terpengaruhi oleh sepsis adalah ginjal, disebut juga kondisi *sepsis-associated acute kidney injury* (SA-AKI). Komplikasi ini memiliki angka mortalitas yang tinggi sehingga penelitian untuk menemukan terapi yang efektif sangat penting dilakukan. Pada penelitian Liu *et al.* (2022), dilakukan studi identifikasi mekanisme molekuler SA-AKI untuk meningkatkan pemahaman respon tubuh ketika terjadi komplikasi. Dataset dari penelitiannya tersedia untuk publik dari basis data Gene Expression Omnibus (GEO). Dataset dengan judul *Transcriptomic Profiling on Kidneys of Mice after Cecal Ligation and Puncture (CLP) Compared to Sham Operation* (ID GSE186822) ini memiliki tujuan utama mengidentifikasi mekanisme genetik baru pada SA-AKI melalui pendekatan bioinformatik dan percobaan laboratorium.

Model sepsis dibuat pada ginjal tikus (*Mus musculus* C57BL/6) menggunakan prosedur *cecal ligation and puncture* (CLP) untuk meniru efek infeksi intra-abdomen. Sebanyak lima ekor tikus dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok CLP (n= 3) dan kelompok kontrol (sham, n= 2). Enam jam setelah perlakuan, jaringan ginjal diambil untuk analisis ekspresi gen menggunakan *RNA sequencing* (RNA-seq). Analisis yang dilakukan pada laporan ini bertujuan mengidentifikasi gen-gen yang mengalami perubahan ekspresi signifikan (*Differentially Expressed Genes/DEGs*) antara kelompok CLP dan kontrol, menampilkan pola ekspresi 50 gen teratas menggunakan *heatmap*, serta melakukan analisis *enrichment* menggunakan *Gene Ontology* (GO) dan *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

Metode

Analisis ini dilakukan menggunakan perangkat lunak R versi 4.3.2 dengan beberapa paket pendukung, yaitu *DESeq2* untuk analisis diferensial, *clusterProfiler* dan *org.Mm.eg.db* untuk analisis fungsional, serta *ggplot2* dan *pheatmap* untuk visualisasi data. Dataset GSE186822 diunduh dari basis data GEO dalam format berkas GSE186822_counts_anno.txt, yang berisi data hasil *RNA sequencing* dari jaringan ginjal tikus model sepsis (CLP) dan kontrol (sham). Data ini berisi 76203 gen (baris) yang mewakili tingkat ekspresi gen pada masing-masing sampel. Semua analisis dilakukan di lingkungan kerja RStudio.

Langkah pertama adalah membaca berkas data ekspresi gen ke dalam R menggunakan fungsi *read.delim()*. Data kemudian dibersihkan dengan menghapus nilai duplikat berdasarkan *gene ID*, menghasilkan 21990 gen unik. Matriks hitungan (*count matrix*) ini kemudian digunakan sebagai input untuk analisis diferensial. Informasi kondisi sampel, yaitu CLP dan kontrol, dimasukkan dalam bentuk metadata untuk membedakan dua kelompok tersebut.

Analisis diferensial dilakukan menggunakan fungsi `DESeq()` dari paket *DESeq2*. Proses ini mencakup normalisasi data, estimasi variasi antar replikasi biologis, serta pengujian signifikansi perubahan ekspresi gen menggunakan uji Wald. Gen yang memenuhi kriteria *adjusted p-value* (*padj*) di bawah 0,05 dan perubahan ekspresi absolut $|\log_2 \text{fold change}|$ lebih dari 1 dianggap signifikan. Hasil analisis berupa tabel *Differentially Expressed Genes* (DEGs) yang kemudian digunakan untuk analisis lanjutan.

Visualisasi hasil dilakukan dengan beberapa cara. *Volcano plot* dibuat menggunakan paket *ggplot2* untuk menggambarkan distribusi seluruh gen berdasarkan \log_2 fold change dan tingkat signifikansi. Gen dengan ekspresi meningkat (*upregulated*) ditandai warna merah, gen dengan ekspresi menurun (*downregulated*) ditandai warna biru, sedangkan gen tidak signifikan berwarna abu-abu. Selain itu, 50 gen dengan nilai *padj* terkecil divisualisasikan dalam bentuk *heatmap* menggunakan paket *pheatmap* untuk melihat pola ekspresi antar sampel.

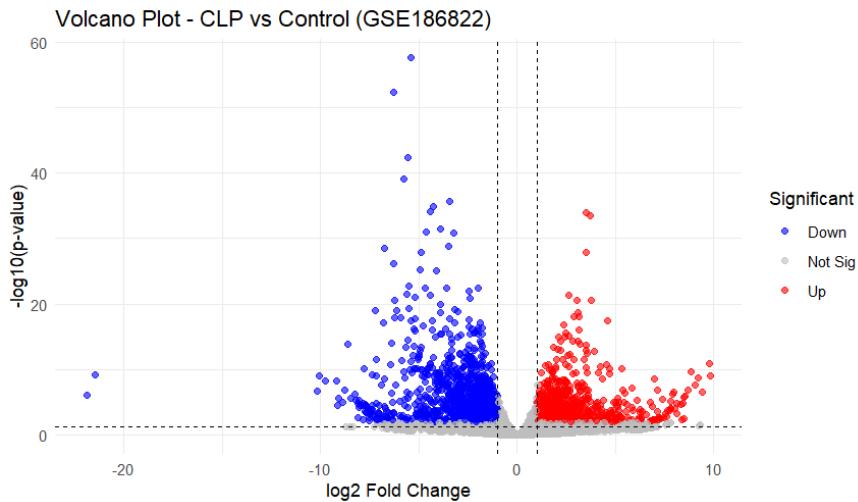
Untuk memahami fungsi biologis dari gen yang berubah signifikan, dilakukan analisis *Gene Ontology* (GO) dan *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) menggunakan paket *clusterProfiler*. Analisis GO mencakup tiga kategori utama, yaitu *Biological Process* (BP, proses biologis), *Cellular Component* (CC, komponen seluler), dan *Molecular Function* (MF, fungsi molekuler). Hasil pengayaan (*enrichment*) divisualisasikan menggunakan *barplot* untuk menampilkan kategori yang paling signifikan berdasarkan nilai p-value. Sementara itu, analisis KEGG digunakan untuk mengidentifikasi jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam respon biologis akibat sepsis.

Analisis ini menggunakan pendekatan *Over-Representation Analysis* (ORA), yaitu metode yang menilai apakah gen-gen signifikan lebih sering muncul dalam kategori biologis tertentu dibandingkan secara acak. Penelitian asli juga menggunakan pendekatan *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) yang mempertimbangkan seluruh data ekspresi gen, sehingga perbedaan hasil dapat muncul akibat perbedaan pendekatan statistik.

Hasil dan Interpretasi

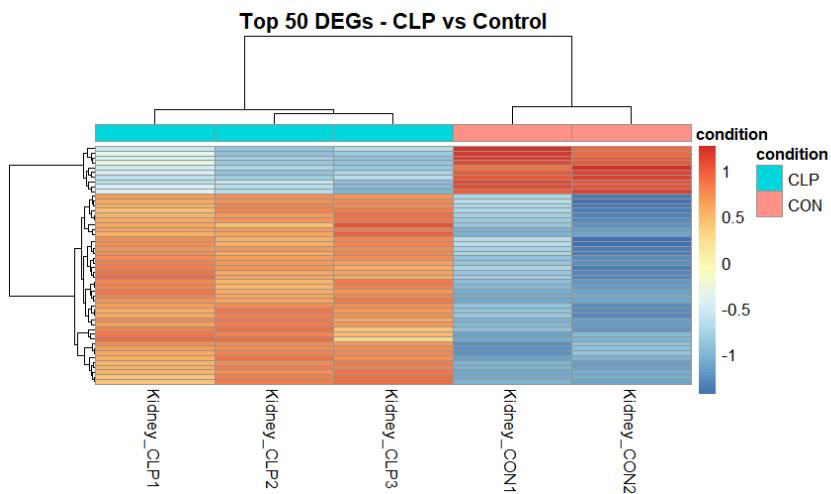
Hasil analisis *DESeq2* menunjukkan adanya perubahan ekspresi gen yang cukup besar pada ginjal tikus setelah perlakuan CLP. Dari total 16471 gen yang terdeteksi, sebanyak 2270 gen memenuhi kriteria sebagai *Differentially Expressed Genes* (DEGs), dengan 1623 gen mengalami peningkatan ekspresi (*upregulated*) dan 2015 gen mengalami penurunan ekspresi (*downregulated*) (Gambar 1). Gen-gen yang meningkat cenderung berkaitan dengan respons imun dan inflamasi, seperti gen pengatur pensinyalan sitokin dan migrasi sel imun, sedangkan gen yang menurun sering kali berhubungan dengan fungsi metabolismik dan struktur sel ginjal. Pola ini konsisten dengan mekanisme biologis SA-AKI, di mana peradangan sistemik menyebabkan stres oksidatif dan gangguan fungsi ginjal. Hal ini menunjukkan bahwa sepsis menyebabkan

ketidakseimbangan regulasi transkripsi di jaringan ginjal, mencerminkan adanya respons inflamasi dan gangguan metabolisme yang kompleks.



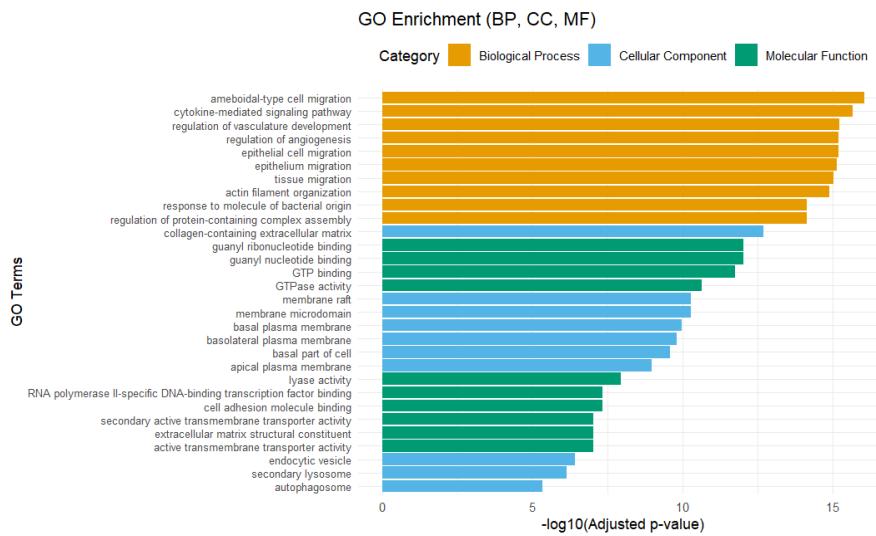
Gambar 1. Volcano plot sebaran DEGs dari analisis DESeq2

Visualisasi 50 DEGs teratas, yaitu gen dengan nilai *padj* terkecil dapat dilihat melalui *heatmap* (Gambar 2) di mana terlihat pemisahan pola ekspresi yang jelas antara kelompok CLP dan kontrol. Gen-gen yang diekspresikan lebih tinggi pada kelompok CLP cenderung berperan dalam proses imun dan peradangan, sementara gen-gen yang lebih rendah berkaitan dengan metabolisme energi dan homeostasis seluler. Pola ini memperlihatkan bahwa sepsis menyebabkan peningkatan ekspresi gen imun sekaligus penurunan fungsi fisiologis ginjal.



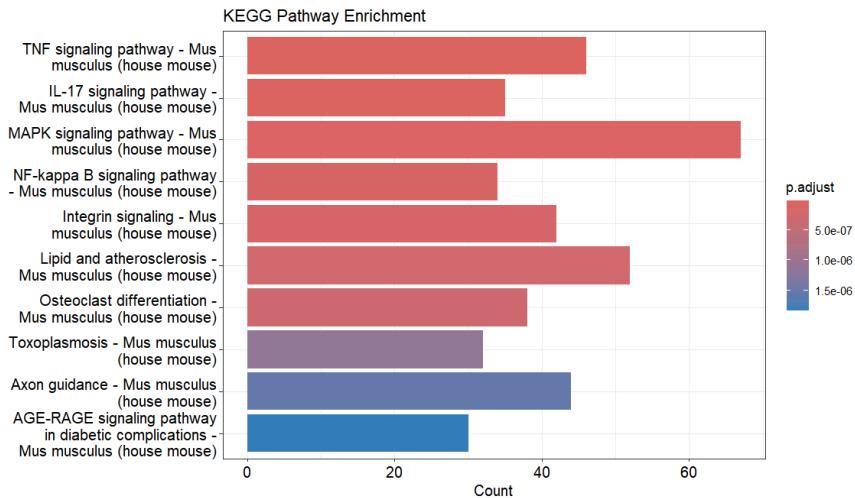
Gambar 2. Heatmap 50 DEGs teratas

Adapun analisis *Gene Ontology* (GO) menunjukkan hasil yang sejalan dengan dugaan tersebut (Gambar 3). Pada kategori *Biological Process*, gen-gen yang terekspresi berbeda secara signifikan berperan dalam *cytokine-mediated signaling pathway*, *ameboidal-type cell migration*, dan *regulation of vasculature development*. Proses-proses ini menunjukkan adanya aktivasi sistem imun dan peningkatan pergerakan sel imun ke jaringan yang rusak. Pada kategori *Cellular Component*, gen-gen yang signifikan banyak ditemukan pada *collagen-containing extracellular matrix* dan *membrane raft*, yang menandakan terjadinya perubahan struktur jaringan dan interaksi antar sel akibat inflamasi. Sementara itu, pada kategori *Molecular Function*, fungsi yang paling banyak diperkaya mencakup *GTPase activity* dan *cell adhesion molecule binding*, yang berkaitan dengan regulasi sinyal intraseluler dan perlakuan sel selama proses peradangan.



Gambar 3. Analisis *GO pathway enrichment* DEGs

Hasil analisis *KEGG pathway* juga memperkuat temuan tersebut (Gambar 4). Jalur pensinyalan yang paling signifikan adalah *Tumor Necrosis Factor (TNF) signaling pathway*, *IL-17 signaling pathway*, *MAPK signaling pathway*, dan *NF- κ B signaling pathway*. Keempat jalur ini merupakan jalur utama dalam pengaturan inflamasi dan kematian sel. Aktivasi jalur-jalur tersebut menunjukkan bahwa ginjal yang mengalami sepsis mengalami stres oksidatif, peningkatan sitokin proinflamasi, serta apoptosis sel epitel. Beberapa jalur lain yang juga signifikan mencakup *Integrin signaling* dan *lipid metabolism*, yang berhubungan dengan disfungsi membran dan gangguan struktur sel.



Gambar 4. Analisis *KEGG pathway enrichment* DEGs

Hasil analisis ini memperlihatkan kesamaan arah biologis dengan hasil penelitian Liu *et al.* (2022), meskipun terdapat perbedaan pada urutan dan rincian istilah yang muncul. Dilaporkan bahwa jalur yang paling dominan mencakup *ferroptosis*, *IL-17 signaling*, *apoptosis*, *PI3K-Akt signaling*, dan *NF- κ B signaling*, sedangkan hasil analisis ini menyoroti jalur inflamasi utama seperti *TNF*, *IL-17*, *MAPK*, dan *NF- κ B*. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh penggunaan metode analisis yang berbeda, di mana penelitian menggunakan kombinasi *ORA* dan *GSEA* berbasis kumpulan gen C5 dari MSigDB, sedangkan analisis ini menggunakan pendekatan *ORA* saja pada gen signifikan. Meski demikian, arah biologis dan fungsi gen yang ditemukan tetap konsisten, yaitu terjadinya aktivasi sistem imun, stres oksidatif, serta gangguan vaskular dan struktural pada ginjal selama sepsis.

Kesimpulan

Analisis ulang dataset GSE186822 menunjukkan bahwa model sepsis pada tikus melalui metode CLP menyebabkan perubahan ekspresi gen yang signifikan pada jaringan ginjal. Ditemukan 2270 gen yang terekspresi berbeda dengan 1623 gen mengalami peningkatan ekspresi (*upregulated*) dan 2015 gen mengalami penurunan ekspresi (*downregulated*). Hasil *volcano plot* menggambarkan pola perubahan dua arah ini, sedangkan *heatmap* 50 gen teratas memperlihatkan perbedaan pola ekspresi yang jelas antara kelompok CLP dan kontrol. Analisis fungsional melalui *Gene Ontology* dan *KEGG pathway* mengungkapkan bahwa gen-gen yang berubah banyak terlibat dalam proses imun, respon sitokin, migrasi sel, serta jalur pensinyalan inflamasi utama seperti *TNF*, *IL-17*, *MAPK*, dan *NF- κ B*. Secara keseluruhan, hasil ini memperkuat pemahaman bahwa aktivasi berlebihan dari sistem imun merupakan penyebab utama terjadinya SA-AKI, dan gen-gen yang ditemukan dapat menjadi kandidat potensial untuk penelitian lanjutan dalam pengembangan terapi berbasis regulasi stres oksidatif dan inflamasi pada penyakit ginjal akibat sepsis.

Daftar Pustaka

Liu, B., Ao, S., Tan, F., Ma, W., Liu, H., Liang, H., ... & Chi, X. (2022). Transcriptomic analysis and laboratory experiments reveal potential critical genes and regulatory mechanisms in sepsis-associated acute kidney injury. *Annals of Translational Medicine*. 10(13): 737.