

Analisis *Differentially Expressed Genes* (DEG) dari Profil Ekspresi Gen Granuloma Kaseosa Paru Manusia Tuberkulosis (TB) Dibandingkan dengan Jaringan Paru Sehat

PENDAHULUAN

Pasien dengan tuberkulosis (TB) aktif diduga memiliki bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam berbagai kondisi metabolik, mulai dari bakteri yang bertumbuh aktif sampai membentuk kondisi persisten (Fenhalis *et al.*, 2002). Tuberkulosis memiliki pengaruh yang besar pada kesehatan global, diestimasikan satu per tiga manusia terinfeksi oleh *M. tuberculosis*, akan tetapi hanya 5-15% individual yang terinfeksi mengalami penyakit. Sebagian besar individu yang terinfeksi *M. tuberculosis* dapat mengontrol infeksi dengan membentuk dan mempertahankan granuloma TB pada lokasi infeksi. Akan tetapi, ketika infeksi kronis menjadi aktif, pusat kaseosa dari granuloma TB membesar dan melepaskan bakteri menuju saluran pernafasan (Kim *et al.*, 2010). Analisis *differentially expressed genes* (DEG) dilakukan dengan tujuan memahami properti biologis pada granuloma TB.

METODE

Dataset yang digunakan diperoleh GEO (*Gene Expression Omnibus*) NCBI yang diakses pada <https://ncbi.nlm.nih.gov/geo> dengan kode akses *GSE20050*. Pembagian grup dilakukan dengan membagi dua grup antara kaseosa paru penderita TB dan grup kaseosa sehat. Parameter utama GEO2R yang diperhatikan adalah *adjusted p-value*, *fold change*, dan *log2(fold change)*. Skema replikasi yang dilakukan sebanyak satu kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enam DEGs dengan $-\log_{10}(P \text{ value})$ tertinggi dipilih dari masing-masing *upregulated genes* dan *downregulated genes* (Tabel 1). Gen yang terpilih adalah gen-gen yang terlibat dalam *pathway* imun. C-C motif chemokine ligand 3 (CCL3) dikenal juga sebagai *macrophage inflammatory protein-1 α* , yang merupakan sitokin multifungsi dalam respon imun, peradangan dan perekrutan sel darah putih (Diamant *et al.*, 2024). Gen CCL3 mengalami *upregulation* pada *Group 1* (kelompok granuloma TB) jika dibandingkan dengan *Group 2* (kelompok sehat).

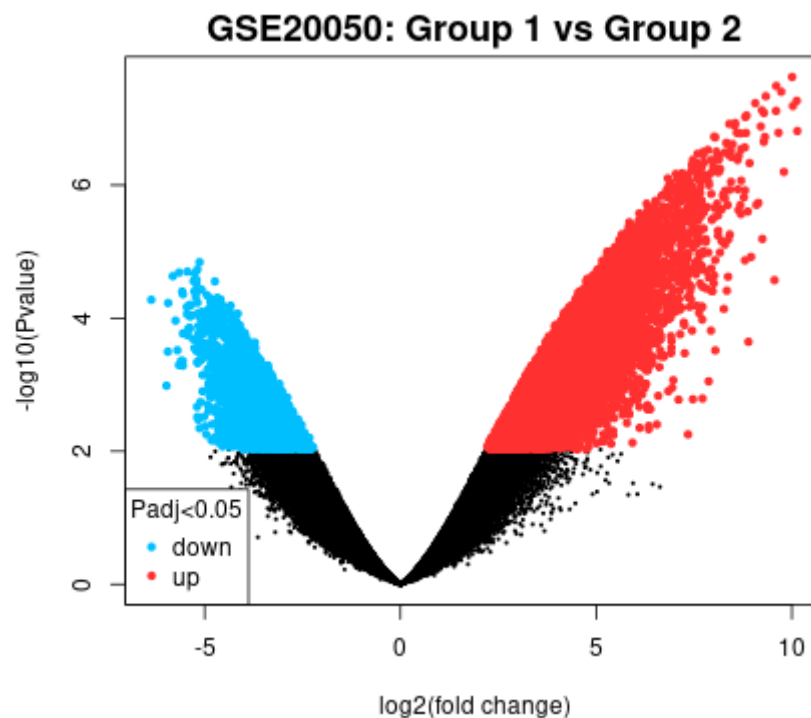
Tabel 1 *Differentially expressed genes* pada *Group 1* jika dibandingkan *Group 2*

ID	Kode gen	Deskripsi	$\log_2(\text{fold change})$	$-\log_{10}(P \text{ value})$
g4506842_3p_at	CCL3	C-C motif chemokine ligand 3	10.007	7.625
Hs.110309.2.S1_3p_at	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	9.729	7.404
g10047123_3p_s_at	SLC50A1	solute carrier family 50 member 1	9.601	7.491

g1903391_3p_a_at	CD6	CD6 molecule	-5.131	4.842
Hs.306533.0.S1_3p_at	NEK9	NIMA related kinase 9	-5.442	4.701
Hs2.434338.1.S1_3p_at	ERVMER61-1	Endogenous retrovirus group MER61 member 1	-5.653	4.685

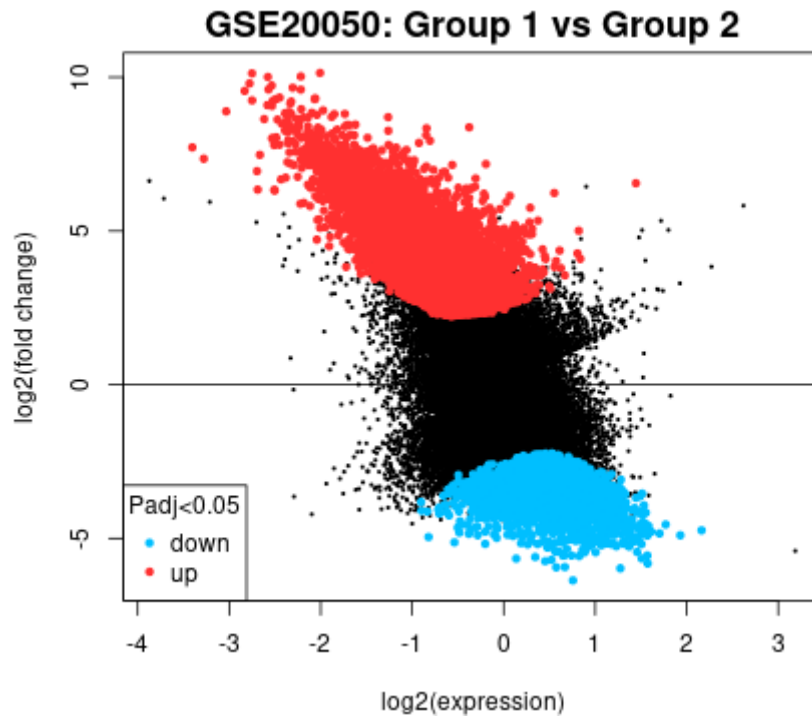
Keterangan: ■ = *upregulated genes* ■ = *downregulated genes*

Data pada *volcano plot* (Gambar 1) menunjukkan gen yang mengalami *upregulation* dan *downregulation* pada grup sehat (*Group 2*) jika dibandingkan dengan grup sakit (*Group 1*). Warna merah menunjukkan gen yang mengalami *upregulation*, sedangkan warna biru adalah gen yang mengalami *downregulation*. Antara gen yang mengalami *upregulation* dan *downregulation* memiliki nilai *fold changes* yang berbeda jauh dan dapat dikatakan memiliki signifikansi statistik yang tinggi. Gen yang memiliki $-\log_{10}(P \text{ value})$ tertinggi merupakan kandidat terkuat yang dapat digunakan dalam validasi biologis.



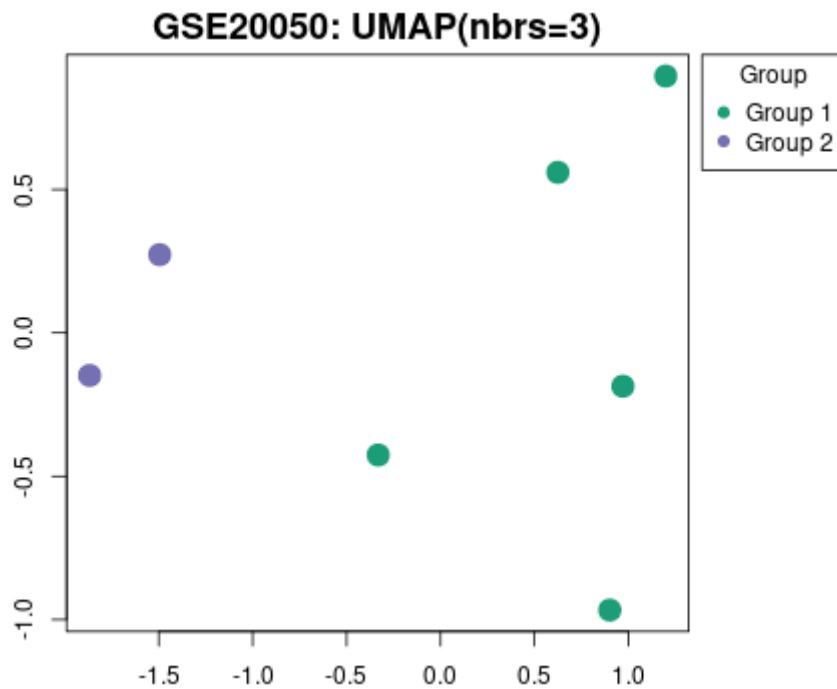
Gambar 1. *Volcano plot*

MD (*Mean-Difference*) plot (Gambar 2) menunjukkan hubungan antara level ekspresi rata-rata dari suatu gen (pada sumbu X) dan $\log_2 \text{fold change}$ (sumbu Y) dari gen tersebut. Warna merah mewakili gen yang mengalami *upregulation*, sedangkan warna biru mewakili gen yang mengalami *downregulation*. MD plot menunjukkan persebaran yang merata pada intensitas ekspresi yang berbeda, sehingga dapat dikatakan bahwa ekspresi diferensial tidak mengalami bias terhadap gen intensitas tinggi atau rendah saja.



Gambar 2. MD *plot*

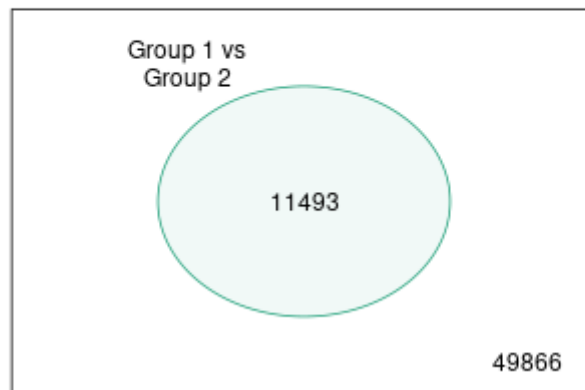
UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) plot menunjukkan visualisasi kelompok sampel berdasarkan profil ekspresi gen secara keseluruhan. Sampel dari *Group 1* (ditandai dengan warna hijau) dan *Group 2* (warna ungu) terpisah ke dalam dua *cluster* yang berbeda (Gambar 3). Hasil ini cukup baik karena menunjukkan bahwa perbedaan biologis diantara kedua grup cukup signifikan.



Gambar 3. UMAP *plot*

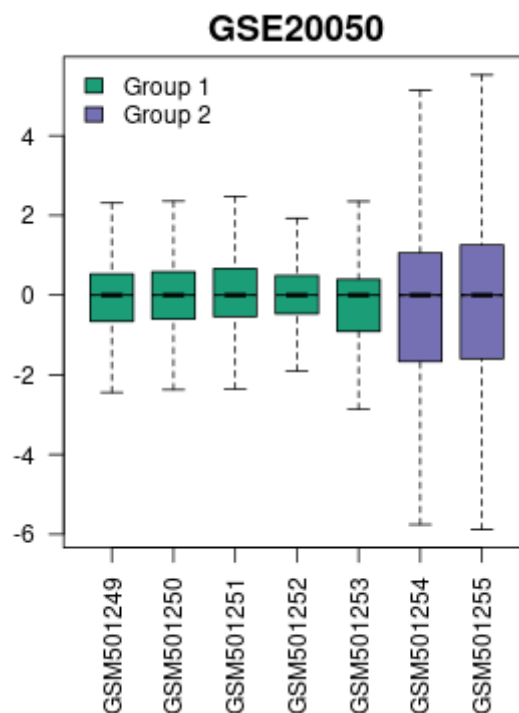
Diagram venn menunjukkan jumlah gen yang memiliki *adjusted p-value* < 0.05 (Gambar 4). Sebanyak 11.493 gen mengalami ekspresi diferensial diantara *Group 1* dan *Group 2*. Sedangkan 49.866 tidak mencapai signifikansi statistik untuk disebut sebagai DEG.

GSE20050: limma, Padj<0.05



Gambar 4. Diagram venn

Data *boxplot* menunjukkan distribusi ekspresi gen untuk setiap sampel (Gambar 5). Garis horizontal hitam (median) pada tiap sampel terletak sejajar pada level yang sama (sekitar 0). Hal ini mengindikasikan bahwa data telah mengalami normalisasi silang. Normalisasi data bertujuan memastikan bahwa variasi teknis diantara tiap sampel telah diminimisasi, sehingga perbandingan perbedaan biologis terhitung dengan baik.



Gambar 5. Boxplot

KESIMPULAN

Analisis ekspresi gen diferensial menunjukkan bahwa granuloma kaseosa tuberkulosis (*Group 1*) mengalami *reprogramming* transkriptomik yang cukup signifikan jika dibandingkan dengan jaringan paru sehat (*Group 2*). Jumlah DEGs yang cukup tinggi dan perbedaan *cluster* yang signifikan pada UMAP menunjukkan bahwa terjadinya penyakit tuberkulosis melibatkan aktivasi berbagai macam *pathway* kompleks yang berkaitan dengan imun, seperti *pathway* inflamasi dan infiltrasi sel imun.

DAFTAR PUSTAKA

- Diamant, I., Clarke, D. J. B., Evangelista, J. E., Lingam N., Ma'ayan A. 2024. Harmonizome 3.0: integrated knowledge about genes and proteins from diverse multi-omics resources. *Nucleic Acids Research*, 53(1), 1016-1028.
- Fenhalis, G., Stevens, L., Moses, L., Bezuidenhout, J., Betts, J. C., Helden, P., Lukey, P. T., Duncan, K. 2002. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infection and Immunity*, 70(11), 6330-6338. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6330-6338.2002>
- Kim, M. J., Wainwright, H. C., Locketz, M., Bekker, L., Walther, G. B., Dittrich, C., Visser, A., Wang, W., Fong-Fu, H., Wiehart, U., Tsenova, L., Kaplan, G., Russel, D. G. 2010. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Molecular Medicine*, 2(7), 258-274. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000079>