

DISERTASI

**PERAN *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP)
GEN *ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASE 1*
(ERAP 1) TERHADAP AKTIVITAS PENYAKIT
SPONDILOARTRITIS AKSIAL MELALUI
JALUR IL-17 DAN IL-23**



LITA DIAH RAHMAWATI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

DISERTASI

PERAN *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN *ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASE 1* (ERAP 1) TERHADAP AKTIVITAS PENYAKIT SPONDILOARTRITIS AKSIAL MELALUI JALUR IL-17 DAN IL-23

LITA DIAH RAHMAWATI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**PERAN *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP)
GEN *ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASE 1*
(ERAP 1) TERHADAP AKTIVITAS PENYAKIT
SPONDILOARTRITIS AKSIAL MELALUI
JALUR IL-17 DAN IL-23**

DISERTASI

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan
Dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Akhir
Tahap 2 (Terbuka)**

Oleh :

LITA DIAH RAHMAWATI

011417017330

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**PERAN *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN
ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASE 1 (ERAP 1)
TERHADAP AKTIVITAS PENYAKIT SPONDILOARTRITIS AKSIAL
MELALUI JALUR IL-17 DAN IL-23**

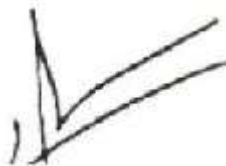
YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 30 DESEMBER 2021

Oleh Promotor :



Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc. Sp.PD, K-R
NIP. 19500701 197703 1 001

Ko Promotor :



Prof. Dr. Aryati, dr, MS. Sp.PK(K)
NIP. 19630815 199002 2 001

PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Disertasi ini telah diuji dan dinilai
Oleh panitia penguji pada ujian Tahap 1 (Tertutup)
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Pada Tanggal 27 Januari 2022

PANITIA PENGUJI

Ketua : 1. Dr. Yuliasih, dr., Sp.PD, K-R
Anggota : 2. Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR
3. Prof. Dr. Aryati, dr., MS., Sp.PK(K)
4. Prof. Usman Hadi, dr., PhD, Sp. PD, K-PTI
5. Dr. Soebagijo Adi Soelistijo, dr., Sp.PD, K-EMD
6. Dr. S. Ugroseno Yudho B, dr., Sp.PD, K-HOM
7. Dr. Budi Utomo, dr, M.Kes
8. Prof. Dr. Nyoman Kertia, dr., Sp. PD, KR

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga
Nomor : 834/UN3.1.1/DL/2022
Tanggal : 21 Januari 2022

SURAT PERNYATAAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lita Diah Rahmawati, dr., SpPD - K-R
NIM : 011417017330
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Alamat / No. Telp : Jl. Karang Empat Besar No. 196 Surabaya / 0817588684

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli, benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas-namakan saya, serta bukan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiatism*) hasil karya orang lain. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, 17 Mei 2022
Yang membuat pernyataan



Lita Diah Rahmawati, dr., SpPD - K-R
NIM. 011417017330

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas karunia, rahmat, serta hidayah yang diberikan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan naskah disertasi ini dengan baik. Tidak lupa mengucapkan sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW. Disertasi ini dapat terselesaikan, karena penulis mendapat dorongan, bimbingan, arahan, saran, dan perbaikan dari berbagai pihak. Sebagai ungkapan rasa syukur atas terselesainya pendidikan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih dengan tulus dan hormat kepada:

1. Prof. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR, selaku pembimbing akademik dan promotor. Beliau senantiasa memberikan ilmu, waktu, bimbingan, arahan, wawasan, serta berdiskusi dalam proses pelaksanaan penelitian dan penyusunan naskah disertasi ini.
2. Prof. Dr. Aryati, dr., M.S., Sp.PK (K), selaku ko-promotor yang senantiasa memberikan ilmu, waktu, bimbingan, arahan, wawasan, serta berdiskusi dalam proses pelaksanaan penelitian dan penyusunan naskah disertasi ini.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, S.E., Mt., Ak., CMA, selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Doktorat di Universitas Airlangga Surabaya.
4. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan bagi penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan jenjang Doktorat di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
5. Dr. Joni Wahyuhadi, dr, Sp.BS (K), selaku Direktur RSUD Dr. Soetomo yang telah memberikan fasilitas bagi penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Doktorat di Universitas Airlangga Surabaya.
6. Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG (K), selaku Koordinator Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Beliau telah memberi bimbingan, motivasi, dan kemudahan kepada penulis selama masa pendidikan jenjang doktor.
7. Jajaran penguji di tahap ujian kualifikasi, ujian proposal, ujian kelayakan, hingga ujian tertutup, yaitu Dr. Yuliasih, dr., Sp.PD-KR, Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR, Prof. Dr. Aryati, dr., MS., Sp.PK(K), Prof. Usman Hadi, dr., PhD, Sp. PD, K-PTI, Dr. Soebagijo Adi Soelistijo, dr., Sp.PD, K-EMD, Prof. Dr. S. Ugroseno Yudho B, dr., Sp.PD, K-HOM, Dr. Budi Utomo, dr, M.Kes, Prof. Dr. Nyoman Kertia, dr., Sp. PD, KR. Penulis mengucapkan terimakasih atas ilmu, saran, kritik, dan waktu yang diberikan oleh para penguji selama proses penyelesaian disertasi ini.
8. Dr. Yuliasih, dr., Sp.PD-KR, Poernomo Boedi Setiawan, dr., Sp.PD-KGEH, dan Dr. Soebagijo Adi Soelistijo, dr., Sp.PD-KEMD, selaku guru dan senior penulis selama menempuh pendidikan. Penulis mengucapkan terimakasih untuk segala ilmu dan nilai hidup yang telah diberikan.
9. Prof. Dr. S. Ugroseno Yudho Bintoro dr., Sp.PD-KHOM, selaku Ketua Departemen Ilmu Penyakit Dalam dan staf Departemen Ilmu Penyakit Dalam

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas motivasi, bimbingan, dan bantuan yang diberikan kepada penulis saat penyelesaian masa studi.

10. Kepada para pasien yang saya kasihi dan saya hormati, yang merelakan untuk berpartisipasi pada penelitian ini, kami ucapkan terimakasih yang sebesar besarnya, semoga hasil dalam studi ini dapat memberikan manfaat yang berarti dalam perbaikan kualitas hidup.
11. Kepada Dr. Awalia, dr., Sp.PD KR, Cahyo Wibisono, dr, Sp.PD dan M. Rosyid Narendra, dr, SpPD, Penulis mengucapkan terimakasih atas bantuan dan dukungan yang diberikan.
12. Kepada para guru besar, senior dan teman sejawat staf Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. penulis mengucapkan terimakasih atas dukungan, dan motivasi yang diberikan.
13. Kepada teman seperjuangan pendidikan S3 Artaria Tjempakasari, dr., Sp.PD-KGH, Novira Widajanti, dr., Sp.PD-KGer, Deasy Fetarayani, dr., Sp.PD-KAI, Jongky Hendro Prajitno, dr., Sp.PD-KEMD, penulis mengucapkan terimakasih atas kebersamaan yang telah diberikan.
14. Kepada keluarga saya, suami Rudi Juliawantara, kedua orangtua (alm) Bapak Maimun dan Ibu Sri Nurhidayati, mertua Ibu Tussuhriningsih, kedua anak kami Mirza Amalia, dr. dan Nadia Dwi Maharani, drg., yang semuanya telah memberikan doa , motivasi dan semangat dalam menyelesaikan studi S3 ini.
15. Kepada Tim Laboran ITD TDC Kampus C Unair dan Divisi Immunologi Patologi Klinik RSUD Dr, Soetomo Surabaya, kami ucapkan terimakasih atas segala bantuan yang diberikan saat pengerjaan proses penelitian.
16. Kepada semua pihak yang belum dapat disebutkan satu-persatu, penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat atas bantuan dan doa kepadaselama masa studi.

Akhir kata, semoga hasil penelitian dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan sumbangsih kepada pasien. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkat bagi seluruh umatnya.

Hormat Saya,

Penulis

RINGKASAN

Peran *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Gen *Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1* (ERAP1) Terhadap Aktivitas Penyakit Spondiloarthritis Aksial Melalui Jalur IL-17 dan IL-23

Spondiloarthritis (SpA) adalah sekelompok penyakit arthritis inflamasi kronis dengan manifestasi arthritis aksial, perifer dan *ekstra artikuler*. Spondiloarthritis aksial (axSpA) adalah bagian dari SpA dengan prototipe klinis yaitu Ankilosing Spondilitis (AS). AxSpa memiliki masalah dalam hal diagnosis maupun penatalaksanaan. Gen ERAP 1 adalah faktor genetik yang berhubungan dengan HLA-B27 dan berperan pada patogenesis AxSpA. Hubungan SNP gen ERAP1 dengan terjadinya AS sedang diteliti pada berbagai populasi. SNP gen ERAP1 sangat bersifat polimorfis, sehingga kombinasi antara SNP gen ERAP1 pada lokus tertentu dengan HLA-B27 akan memberikan klinis berbeda untuk resiko terjadinya AS.

Hipotesis *Arthritogenic peptide*, mendukung fungsi gen ERAP dalam memotong dan mengatur urutan peptida antigen yang akan di presentasikan kepada HLA-B27. Hipotesis HLA-B27 *misfolding* menyebutkan jika pengaturan peptida tidak tepat akan menyebabkan terjadinya *misfolding* dan pembentukan HLA-B27 *homodimer Free Heavy Chain* (FHC) pada permukaan sel. Proses pemotongan peptida yang tidak sempurna akan meningkatkan proses *stress endoplasmic reticulum* (ER Stress). Ketiga hipotesis menjadi dasar terjadinya proses autoinflamasi secara seluler pada axSpA. Peran ERAP 1 menjadi penting pada aktivitas penyakit axSpA, karena proses pemotongan dan pengaturan peptida antigen menjadi dasar terjadinya kaskade autoinflamasi.

AxSpA adalah penyakit autoimun autoinflamasi dengan penyimpangan jalur sitokin inflamasi. Respon sel T CD8 terhadap peptida antigen melalui presentasi MHC kelas 1 akan merangsang sel *innate* imun mensekresi IL-23 yang memicu Th17 untuk memproduksi IL-17A, IFN- γ , IL-22, IL-6 dan TNF α . Aktivitas penyakit axSpA secara klinis dinilai dengan skor. Skor ASDAS LED dapat digunakan sebagai skor tunggal dengan validitas yang baik, menunjukkan kepekaan terhadap perubahan aktivitas penyakit secara klinis. Penilaian untuk menggambarkan tingkat inflamasi kronik adalah dengan gambaran radiologi *skoring modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spinal Score* (mSASSS) yang menilai proses erosi, sklerosis dan sindesmofit pada tulang spinal.

Metode penelitian terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah studi observasional metode *cross sectional*. Populasi penelitian menggunakan pasien spondiloarthritis aksial dengan kriteria *Assessment of Spondyloarthritis International Society* (ASAS) 2010 di Instalasi Rawat Jalan Reumatologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Sampel penelitian terpilih melalui kriteria inklusi dan eksklusi dan didapatkan subjek penelitian sebesar 60 orang. Pada tahap pertama dilakukan PCR SSP untuk membedakan pasien HLA- B27 positif dan HLA- B27

negatif, selanjutnya pada HLA- B27 positif dilakukan PCR ERAP1 dan sekuensing untuk menentukan SNP gen ERAP1 rs 27434. Tahap kedua adalah studi eksperimental invitro *post test only control design*. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana pada kelompok HLA-B27 positif diberikan perlakuan induksi Lipopolisakarida dan Interferon γ serta dilakukan pengukuran kadar ERAP1, IL-17 dan IL-23 sebelum dan sesudah perlakuan dengan metode ELISA *sandwich*.

Hasil penelitian menunjukkan pengukuran inter-observer dengan metode Cohen-Kappa didapatkan korelasi inter-observer sebesar 0,86 artinya kesesuaian nilai mSASSS yang tinggi antara kedua pembaca. Penelitian tahap 1 pada kelompok HLA B27 positif didapatkan SNP gen ERAP 1 rs 27434 pada nukleotida -147033 dengan Allel A bermutasi menjadi A dan A/G, didapatkan genotip AA 20%, genotip GG 40% dan genotip A/G 40%. Tidak terdapat hubungan antara SNP gen ERAP 1 dengan ASDAS LED dan terdapat hubungan antara SNP gen ERAP 1 dengan mSASSS ($r=0,533, p<0.05$). Tahap kedua pada uji beda tidak terdapat perbedaan pengaruh SNP gen ERAP 1 dengan kadar ERAP 1, IL-17 dan IL-23 pada PBMC sebelum dan sesudah induksi dengan Lipopolisakarida dan Lipopolisakarida dengan IFN γ . Pada analisis jalur didapatkan hubungan signifikan antara SNP gen ERAP 1 dan skor mSASSS ($\beta=0,559$ Sig=0,005)

Kesimpulan penelitian ini, pada kelompok HLA B27 positif didapatkan SNP gen ERAP 1 rs 27434 pada nukleotida -147033 dengan Allel A bermutasi menjadi G dan A/G. Tidak terdapat hubungan SNP gen ERAP1 dengan ASDAS LED. Terdapat hubungan SNP gen ERAP 1 dengan mSASSS. Tidak terdapat peran SNP gen ERAP1 melalui jalur IL-17 dan IL-23 terhadap ASDAS LED dan mSASSS. Pada analisis jalur terdapat hubungan SNP gen ERAP 1 dan mSASSS.

SUMMARY

The Role of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP 1) Gene Against Axial Spondyloarthritis Disease Activity Through IL-17 and IL-23 Pathways

Spondiloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory arthritis diseases with manifestations of axial, peripheral and extra-articulate arthritis. Axial spondiloarthritis (axSpA) is part of SpA with a clinical prototype, Ankylosing Spondylitis (AS). AxSpA has problems in terms of diagnosis and management. The ERAP 1 gene is a genetic factor associated with HLA-B27 and plays a role in the pathogenesis of AxSpA. The SNP ERAP1 gene relationship with the occurrence of AS is being studied in various populations. The SNP ERAP1 gene is highly polymorphic, so the combination of the SNP ERAP1 gene at certain loci with HLA-B27 will provide a different clinical risk for the risk of AS.

The Arthritogenic peptide hypothesis supports the function of the ERAP gene in cutting and regulating the sequence of antigen peptides to be presented to HLA-B27. The HLA-B27 misfolding hypothesis states that improper peptide regulation will lead to misfolding and formation of HLA-B27 homodimer Free Heavy Chain (FHC) on the cell surface. The process of cutting imperfect peptides will increase the process of endoplasmic reticulum stress (ER Stress). These three hypotheses form the basis for cellular autoinflammation in axSpA. The role of ERAP 1 is important in the activity of axSpA disease, as the process of cutting and regulating antigen peptides is the basis for the occurrence of the autoinflammatory cascade.

AxSpA is an autoimmune disease autoinflammatory with deviation of inflammatory cytokine pathways. CD8 T cell response to antigen peptides through the presentation of MHC class 1 will stimulate innate immune cells to secrete IL-23 which triggers Th17 to produce IL-17A, IFN- γ , IL-22, IL-6 and TNF α . AxSpA disease activity was clinically assessed by scores. ASDAS ESR scores can be used as a single score with good validity in disease activity clinically. Another assessment describing chronic inflammatory levels is with a radiological picture of modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spinal Score (mSASSS) to assess the process of erosion, sclerosis and syndesmophyte in spinal bones.

The research method consists of two phase which the first phase is observational study of cross sectional methods. The study population is axial spondyloarthritis patients based on criteria of Assessment SpondyloArthritis International Society (ASAS) 2010 at Dr. Soetomo Surabaya Hospital Rheumatology Outpatient Installation. The research sample was selected through inclusion and exclusion criteria and obtained 60 research subjects. In the first stage PCR SSP to distinguish patients HLA- B27 positive and negative, then HLA B27 positive undergo PCR ERAP1 and sequencing to determine SNP ERAP1 gene rs 27434. The second phase is the experimental study of invitro post test only control design. The positive HLA B27 group was given Lipopolysaccharide and

Interferon γ induction treatment. The levels of ERAP1, IL-17 and IL-23 before and after treatment were measured using sandwich ELISA method.

The results showed inter-observer measurements with the Cohen-Kappa method obtained an interobserver correlation of 0.86 which means the conformity of high mSASSS values between the two readers. Phase 1 research in the HLA B27 group positively obtained SNP ERAP 1 gene rs 27434 in nucleotides -147033 with Allel A mutated into A and A / G, obtained genotype AA 20%, genotype GG 40% and genotype A / G 40%. There is no association between SNP ERAP 1 gene and ASDAS ESR and there is an association between SNP ERAP 1 gene and mSASSS ($r=0.533, p<0.05$). The second stage in the different tests did not increase influence of SNP genes ERAP 1 with levels of ERAP 1, IL-17 and IL-23 in PBMC before and after induction with Lipopolysaccharides and Lipopolysaccharides with IFN γ . In the track analysis, a significant association was found between the SNP ERAP 1 and the mSASSS score ($\beta = 0.559$ Sig =0.005)

The conclusion of this study, in the HLA B27 group positively obtained SNP gene ERAP 1 rs 27434 in nucleotides -147033 with Allel A mutated into G and A / G. There is no relationship of SNP genes ERAP1 with ASDAS ESR. There is a relationship between SNP gen ERAP 1 and mSASSS. There is no role of SNP erap1 genes through the IL-17 and IL- 23 pathways against ASDAS ESR and mSASSS. In the track analysis there is relationship between SNP ERAP1 genes and mSASSS.

ABSTRAK

Peran *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *Endoplasmic Reticulum Amino peptidase 1* (ERAP1) Terhadap Aktivitas Penyakit Spondiloarthritis Aksial Melalui Jalur IL-17 dan IL-23

Lita Diah Rahmawati

Latar belakang: Spondiloarthritis aksial (axSpA) adalah penyakit artritis inflamasi kronis terutama pada sendi aksial. Gen ERAP 1 adalah faktor genetik yang berperan pada patogenesis AxSpA. SNP Gen ERAP 1 diduga berperan pada proses autoinflamasi melalui jalur aktivasi sitokin IL-17 dan IL-23.

Tujuan Penelitian: Menganalisis SNP gen ERAP 1 pada axSpA HLA B27 positif. Menganalisis hubungan SNP gen ERAP1 terhadap ASDAS LED dan skor mSASSS serta pengaruh SNP gen ERAP1 terhadap kadar ERAP1, IL-17 dan IL-23 sebelum dan sesudah induksi Lipopolisakarida (LPS) dan IFN γ pada kultur PBMC.

Metode: Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu metode cross sectional dan penelitian *invitro pre post test only control design*. Populasi penelitian adalah pasien axSpA sesuai kriteria *Assessment of SpondyloArthritis International Society 2010* di IRJ Reumatologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Subjek terpilih melalui kriteria inklusi dan eksklusi dan terbagi 2 kelompok yaitu HLA B27 positif dan negative berdasarkan PCR SSP. Seluruh subjek diperiksa DL LED serta x-ray cervical dan lumbosacral untuk ASDAS LED dan skor mSASSS. Kelompok HLA B27 positif dilakukan PCR gen ERAP1 dan sekuensing untuk SNP. Tahap kedua adalah studi *invitro post test case control design* pada PBMC, dengan induksi LPS dan IFN γ , dan pemeriksaan kadar enzim ERAP1, IL-17 dan IL23 sebelum dan sesudah perlakuan dengan ELISA.

Hasil: Pada SNP gen ERAP 1 rs 27434 terdapat mutasi di titik -140733 dimana Allel A menjadi G dan A/G. Tidak terdapat hubungan SNP gen ERAP 1 dengan ASDAS LED. Terdapat hubungan antara SNP dgen ERAP 1 dengan mSASSS ($r=0.553$, $p<0,05$). Analisis jalur terdapat hubungan SNP gen ERAP 1 dengan mSASSS ($\beta:0,559$ $p:0,005$). Uji beda antara SNP gen ERAP 1 dengan kadar ERAP 1, IL-17A dan IL-23 pada kultur PBMC tidak terdapat perbedaan sebelum dan sesudah paparan dengan LPS dan IFN γ .

Kesimpulan: Terdapat hubungan SNP gen ERAP1 dengan skor mSASSS. Tidak terdapat peran SNP gen ERAP1 pada aktivasi jalur IL17 dan IL23. Terdapat SNP gen ERAP 1 rs 27434 yang mengalami mutasi dari A menjadi G dan A/G .

Kata Kunci: SNP gen ERAP1, Spondiloarthritis aksial, ASDAS-LED, mSASSS

ABSTRACT

The Role of Single Nucleotide Polymorphisme (SNP) Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP 1) Gene Against Axial Spondiloarthritis Disease Activity Through IL-17 and IL-23 in Axial Spondyloarthritis Patient

Lita Diah Rahmawati

Background: Axial spondiloarthritis (axSpA) is a chronic inflammatory arthritis disease especially in axial joints. The ERAP 1 gene is a genetic factor that plays a role in the pathogenesis of axSpA. SNP Gen ERAP 1 is thought to play a role in the autoinflammatory process through the activation pathways of cytokines IL-17 and IL-23 through changes in erap1 enzyme activity.

Research Objective: Determining SNP gene ERAP 1 in axSpA HLA B27 positive. Analyzed the relationship of ERAP1 gene SNP to LED ASDAS and mSASSS scores and the effect of ERAP1 gene SNP on ERAP1, IL-17 and IL-23 levels before and after lipopolysaccharide (LPS) and IFN γ in PBMC cultures.

Method: Research consists of two stages, namely the cross sectional method and invitro pre post test only control design research. The study population was an axSpA patient according to the Assessment of Spondyloarthritis International Society 2010 criteria at Outpatient Rheumatology Clinic Dr. Soetomo Surabaya. Subjects were selected through inclusion and exclusion criteria and divided into 2 groups was positive and negative HLA B27 based on PCR SSP. All subjects were examined for ESR as well as cervical and lumbosacral xrays for ASDAS ESR and mSASSS scores. The HLA group B27 positive performed PCR gene ERAP1 and sequencing for the SNP. The second stage is the invitro post test case control design study on PBMC, with LPS and IFN induction γ , and examination of ERAP1, IL-17 and IL23 levels before and after treatment with ELISA.

Results: There is mutation SNP gen ERAP 1 rs 27434 at the point -140733 where Allel A becomes G and A/G. There is no association between SNP ERAP 1 gene and ASDAS ESR. There is a relationship between SNP ERAP 1 gene and mSASSS ($r=0.553$, $p<0.05$). In the track analysis there is an association of SNP ERAP 1 gene and mSASSS ($\beta:0.559$ $p:0.005$). In the different tests between SNP ERAP 1 gene with ERAP 1, IL-17A and IL-23 levels in PBMC cultures there was no difference before and after exposure of LPS and IFN γ induction.

Conclusion: There is an association SNP-ERAP1 gene with mSASSS score. There is no role of the SNP ERAP1gene in the activation of the IL17 and IL23 pathways. There is an SNP ERAP 1 gene rs 27434 that undergo mutations from A to G and A/G.

Keywords: SNP ERAP1 gene, Spondiloarthritis, ASDAS ESR, mSASSS

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DALAM	i
HALAMAN AWAL DISERTASI	ii
PRASYARAT GELAR	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
PERNYATAAN PENELITIAN	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
 BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN.....	 7
2.1 Spondiloarthritis dan Spondiloarthritis Aksial.....	7
2.2. Epidemiologi aksial spondyloarthritis	7
2.3 Patogenesis Spondyloarthritis	8
2.3.1 Faktor Genetik	9
2.3.1.1 HLA B-27.....	10
2.3.1.1.1 Subtipe HLA B-27.....	10
2.3.1.1.2 Struktur HLA B-27.....	12
2.3.1.2 Peran HLA-B27 pada Spondiloarthritis Aksial ...	13
2.3.1.2.1 Hipotesis Peptida Arthrogenik	13
2.3.1.2.2 Hipotesis <i>Unfolded Protein Respons</i>	14
2.3.1.2.3 Hipotesis HLA-B27 <i>Free Heavy Chain</i> dan <i>Homodimers</i>	16
2.3.1.3 HLA-C	18

2.3.2	Faktor Lingkungan	19
2.4	Gambaran Klinis Spondyloarthritis	21
2.4.1	Enthesitis	22
2.4.2	Pembentukan Tulang Baru	23
2.4.3	Sacroilitis	25
2.5	Diagnosis Spondyloarthritis	26
2.6	Peta Genetik dari HLA B27	27
2.7	Gen ERAP 1 (Endoplasmic Reticulum Amino Peptidase)	30
2.7.1	Fungsi dan peran patogen ERAP pada AS	31
2.7.2	Presentasi peptida antigen dan infeksi pada AS	32
2.7.3	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan Aktivitas Enzim ..	33
2.8	Peran sitokin proinflamasi terhadap deformitas tulang	35
2.8.1.	Peran Th17 pada Spondiloarthritis Aksial	35
2.8.2	Peran Interleukin 17 pada Aksial Spondyloarthritis	36
2.8.3	Interleukin 23	37
2.8.4	Aksis IL23/IL 17	38
2.9	Instrumen pengukuran Disease Activity pada Aksial SpA ...	39
2.9.1	ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score)	39
2.9.2	Skoring mSASSS	41
2.10	Studi Hubungan ERAP1 dengan AS	43
2.11	Matrix Penelitian Gen ERAP1 pada AS	46
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	50
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	50
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep	51
3.3	Hipotesis Penelitian	54
BAB 4	METODE PENELITIAN	55
4.1	Metode Penelitian Tahap I	55
4.1.1	Rancangan Penelitian	55
4.1.2	Desain Sampling Penelitian	55
4.1.2.1	Populasi	55
4.1.2.2	Sampel	56
4.1.2.3	Besar Sampel	56
4.1.2.4	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	56
4.1.2.4.1	Kriteria Inklusi	57
4.1.2.4.2	Kriteria Eksklusi	57
4.1.2.4.3	Lokasi Penelitian	57
4.1.3	Variabel Penelitian	57
4.1.3.1	Variabel Bebas	57
4.1.3.2	Variabel Antara	57
4.1.3.3	Variabel Tergantung	57
4.1.4	Definisi Operasional Variabel	58
4.1.5	Instrumen penelitian dan metode pemeriksaan	61
4.1.5.1	Bahan Penelitian	61

4.1.5.2	Alat Pemeriksaan.....	61
4.1.6	Pengelolaan dan Analisis data	61
4.1.6.1	Ekstraksi DNA	61
4.1.6.2	Pemeriksaan PCR SSP Identifikasi HLA B27	61
4.1.6.3	Pemeriksaan PCR Gen ERAP1	63
4.1.6.4	Sekuensing DNA Gen ERAP1	63
4.1.6.5	Pengukuran Aktivitas Penyakit ASDAS LED dan mSASSS.....	64
4.1.7	Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1	65
4.1.8	Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1	66
4.2	Metode Penelitian Tahap II.....	67
4.2.1	Rancangan Penelitian	67
4.2.2	Tujuan Penelitian.....	68
4.2.3	Unit Eksperimental dan Replikasi	68
4.2.4	Variabel Penelitian	68
4.2.4.1	Variabel Bebas.....	68
4.2.4.2	Variabel Tergantung	68
4.2.5	Definisi Operasional Variabel	69
4.2.6	Instrumen Penelitian dan Metode Pemeriksaan.....	71
4.2.6.1	Prosedur Penelitian	71
4.2.6.2	Alat Penelitian	71
4.2.7	Prosedur Penelitian	71
4.2.7.1	Prosedur Isolasi PBMC dari Whole Blood.....	71
4.2.7.2	Pemberian Perlakuan Kultur pada Sampel Subjek Penelitian	72
4.2.7.3	Prosedur Pemeriksaan IL-17 Serum (ELISA).	72
4.2.7.4	Prosedur Pemeriksaan IL-23 Serum (ELISA).	73
4.2.7.5	Prosedur Pemeriksaan ERAP1 Serum (ELISA)	73
4.2.8	Pengelolaan dan Analisis Data	74
4.2.9	Kerangka Operasional Penelitian Tahap II.....	75
BAB 5	HASIL PENELITIAN	76
5.1	Karakteristik Subjek Penelitian	76
5.1.1	Karakteristik Demografi Subjek Penelitian	77
5.1.2	Karakteristik Klinis Subjek Penelitian	77
5.1.3	Karakteristik Aktivitas Penyakit	79
5.1.3.1	ASDAS LED Subjek Penelitian	79
5.1.3.2	Skor mSASSS Subjek Penelitian.....	79
5.1.3.3	Aktivitas Penyakit Berdasarkan Kelompok HLA-B27	80
5.1.4	Hasil PCR SSP pada Subjek Penelitian	81
5.1.5	Hasil PCR dan Polimorfisme Gen ERAP1 pada Subjek Penelitian.....	82
5.2	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan ASDAS LED dan mSASSS	86
5.2.1	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan ASDAS LED.....	86

5.2.2	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan mSASSS.....	86
5.3	Uji Perbandingan SNP gen ERAP1 dengan Kadar ERAP1 ..	87
5.4	Uji Perbandingan SNP gen ERAP1 dengan Kadar IL-17A ..	88
5.5	Uji Perbandingan SNP gen ERAP1 dengan Kadar IL-23.....	89
5.6	Hubungan SNP gen ERAP1, ASDAS LED, mSASSS ERAP1, IL-17A, IL-23 dengan Metode Analisis Jalur.....	90
5.6.1	Hubungan HLA-B27 dengan ASDAS LED.....	90
5.6.2	Hubungan HLA-B27 dengan mSASSS.....	91
BAB 6	PEMBAHASAN	92
6.1	Karakteristik Subjek Penelitian	92
6.1.1	Karakteristik Demografi Subjek Penelitian	92
6.1.2	Karakteristik Klinis Subjek Penelitian	93
6.1.3	Karakteristik Aktivitas Penyakit	96
6.1.4	PCR SSP	97
6.1.5	PCR dan SNP rs27434 Gen ERAP1 Subjek Penelitian	99
6.2	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan Aktivitas Penyakit	102
6.2.1	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan ASDAS LED	102
6.2.2	Hubungan SNP Gen ERAP1 dengan mSASSS	102
6.3	Hubungan SNP gen ERAP1 dengan Kadar ERAP1	103
6.4	Hubungan SNP gen ERAP1 Terhadap Kadar IL-17A	105
6.5	Hubungan SNP gen ERAP1 Terhadap Kadar IL-23.....	106
6.6	Hubungan SNP gen ERAP1, ASDAS LED, mSASSS ERAP1, IL-17A, IL-23 dengan Metode Analisis Jalur.....	107
6.7	Temuan Baru.....	108
6.8	Keterbatasan Penelitian.....	108
BAB 7	PENUTUP	109
7.1	Kesimpulan	109
7.2	Saran	110
	DAFTAR PUSTAKA	111
	LAMPIRAN	121

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Daftar sub tipe HLA-B27 yang saat ini teridentifikasi.....	10
Tabel 2.2 Susunan protein asam amino sub tipe	11
Tabel 2.3 ASDAS	41
Tabel 2.4 Matrix penelitian Terdahulu.....	46
Tabel 4.1 Definisi Operasional.....	57
Tabel 4.2 Primer Spesifik untuk HLAB27.....	62
Tabel 4.3 Sekuensi primer spesifik untuk ERAP1rs27434.....	62
Tabel 4.4 Definisi Operasional	69
Tabel 5.1 Distribusi demografi subjek penelitian.....	76
Tabel 5.2 Karakteristik klinis subjek penelitian.....	78
Tabel 5.3 Penilaian Aktivitas Penyakit (ASDAS LED).....	79
Tabel 5.4 Perbandingan Skor mSASSS Interobserver.....	80
Tabel 5.5 Aktivitas penyakit berdasarkan kelompok HLAB27.....	81
Tabel 5.6 Mutasi Gen ERAP 1.....	84
Tabel 5.7 Hasil Analisis Uji <i>Pearson</i> SNP gen ERAP 1 dengan ASDAS LED.....	86
Tabel 5.8 Hasil Analisis Uji <i>Pearson</i> SNP gen ERAP 1 dengan mSASSS.....	86
Tabel 5.9 Uji perbedaan SNP gen ERAP 1 dengan ERAP 1.....	87
Tabel 5.10 Uji perbedaan SNP gen ERAP 1 dengan IL-17A.....	88
Tabel 5.11 Uji perbedaan SNP gen ERAP 1 dengan IL-23.....	89

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur molekul HLA-B27.....	13
Gambar 2.2 HLA-B27 <i>misfolding</i> dan <i>Spondyloarthritis</i>	16
Gambar 2.3 Patogenesis kerusakan tulang pada SpA.....	24
Gambar 2.4 Kriteria Spondiloarthritis berdasarkan ASAS 2010.....	27
Gambar 2.5 Peta distribusi HLA- B27 pada Aksial SpA.....	28
Gambar 2.6 Lokus non MHC pada Aksial SpA.....	29
Gambar 2.7 Fungsi ERAP1 pada autoimun autoinflamasi.....	31
Gambar 2.8 Struktur ERAP 1 berdasarkan mekanisme dan topologi tempat polimorfisme	34
Gambar 2.9 Peran sitokin inflamasi dalam aksial spondyloarthritis	36
Gambar 2.10 Gen ERAP1 skematik dengan 48 kb dan 19 exons.....	44
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	50
Gambar 4.1 Rancang Bangun Penelitian Tahap 1	55
Gambar 4.2 Kerangka Operasional Tahap 1.....	66
Gambar 4.3 Rancang bangun penelitian tahap 2.....	67
Gambar 4.4 Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2.....	75
Gambar 5.1 PCR SSP HLA-B27.....	82
Gambar 5.2 PCR Gen ERAP 1	83
Gambar 5.3 Sampel No. 31 Primer ERAP.....	84
Gambar 5.4 Sampel No. 05 Primer ERAP.....	84
Gambar 5.5 Sampel No. 01 Primer ERAP.....	85
Gambar 5.6 Sampel No. 46 Primer ERAP.....	85
Gambar 5.7 Hasil Diagram Analisis Jalur dengan Nilai Signifikansi dan Nilai Koefisien Jalur Variabel SNP Gen ERAP1, ERAP1, IL-17 dan IL-23 Terhadap mSASSS.....	90
Gambar 5.8 Hasil Diagram Analisis Jalur dengan Nilai Signifikansi dan Nilai Koefisien Jalur Variabel SNP Gen ERAP1, ERAP1, IL-17 dan IL-23 Terhadap ASDAS LED.....	91

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Data Penelitian.....	121
Lampiran 2 Artikel Jurnal	123
Lampiran 3 Hasil Pengolahan Data Statistik.....	130
Lampiran 4 Lampiran Definisi Operasional.....	146
Lampiran 5 Score mSAS.....	148
Lampiran 6 Lembar Persetujuan Laik Etik.....	149
Lampiran 7 Penjelasan Informasi (<i>Information for Consent</i>)	150
Lampiran 8 Pernyataan Persetujuan (<i>Informed Consent</i>).....	153
Lampiran 9 Lembar Persetujuan Tindakan Medis.....	154
Lampiran 10 Prosedur Laboratorium.....	156
Lampiran 11 <i>Alligment</i> Subjek Penelitian pada Nukleotida -14033 A>G dan A>R	158

DAFTAR SINGKATAN

AS	: <i>Ankilosing Spondilitis .</i>
Ax SpA	: <i>Aksial Spondiloarthritis</i>
A-LAP	: <i>Adipocyte-derived leucine aminopeptidase</i>
ASAS	: <i>Assessment of Spondyloarthritis International Society</i>
ASDAS	: <i>Ankilosing Spondylitis Disease Activity Score</i>
APLAR	: <i>Asia Pasific League of Associations for Rheumatology</i>
ANTXR2	: <i>Antrax Toxin Receptor 2</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATF6	: <i>Activating Transcription Factor 6</i>
BASRI	: <i>Bath- Ankylosing Radiology Indeks</i>
BASMI	: <i>Bath- Ankylosing Meterology Indeks</i>
CRP	: <i>C Reactive Protein</i>
CMG 2	: <i>Capillary Morpho Genesis 2</i>
CCL	: <i>C-C motif Chemokine Ligand</i>
Cat K	: <i>Cathepsin K</i>
CHOP	: <i>C/EBP Homologous Protein</i>
CBA	: <i>Cytometric Bead Array</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ESSG	: <i>European Spondyloarthropathy Study Grup</i>
ERAP1	: <i>Endoplasmic Retikulum Amino Peptidase 1</i>
ERAD	: <i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>
EULAR	: <i>European League Against Rheumatism</i>
ELISA	: <i>Enzym –Linked Immunosorbent Assay</i>
FHC	: <i>Free Heavy Chain</i>
GWAS	: <i>Genome Wide Association Studies</i>
GMCSF	: <i>Granulocyte-monocyte colony simulating factor</i>
GDC	: <i>Gedung Diagnostic Centre</i>

HLA- B27	: <i>Human Leucocyte Antigen-B27</i>
IL-1R	: <i>Interleukin 1 Receptor</i>
IL-6R	: <i>Interleukin 6 Receptor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IFN- γ	: <i>Interferon γ</i>
IBP	: <i>Inflammatory Back Pain</i>
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IRE1	: <i>Inositol Requiring Enzym1</i>
ITD	: <i>Institut Tropical Disease</i>
IMGT	: <i>International Immunogenetics Data Base</i>
KIR3DL2	: <i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor DL2</i>
KIR	: <i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i>
LED	: <i>Laju Endap Darah</i>
LPS	: <i>Lipo Poly Saccharide</i>
LILRB2	: <i>Leukocyte Ig Like Receptor B2</i>
LILR	: <i>Leucocyte Immunoglobulin-like Receptors</i>
MAMPs	: <i>Microbe-associated molecular pattern</i>
MAF	: <i>Minor Alel Frequency</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	: <i>Matrix Metallo Proteinase</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
mSASSS	: <i>modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spinal Score</i>
mRNA	: <i>Massenger Ribo Nuncleic Acid</i>
NHANES	: <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NF κ B	: <i>Nuclear Factor $\kappa\beta$</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NSAID	: <i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
NRS	: <i>Numerical rating scale</i>
PsA	: <i>Psoriasis Arthritis</i>

PERK	: <i>Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBMC	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
ReA	: <i>Reactive Arthritis</i>
RA	: <i>Rheumatoid Arthritis</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
RASSS	: <i>Radiology AS Spinal Score</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $K\beta$ Ligand</i>
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphisme</i>
SFB	: <i>Segmented Filamentous Bacteri</i>
SCFA	: <i>Short Chain fatty acid</i>
SpA	: <i>Spondyloarthritis</i>
SSP	: <i>Sequence Spesific Primer</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
Th	: <i>T Helper</i>
TNF α .	: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TCR	: <i>T Cell Receptor</i>
TGF β	: <i>Transforming Group Factor</i>
Tr1	: <i>T regulator 1</i>
TRAP	: <i>Tartrate Resistant Acid Phospatase</i>
UPR	: <i>Unfolded Protein Response</i>
VIPR	: <i>Vasoaktif Intestinal Peptida Receptor</i>
VAS	: <i>Visual Analog Scale</i>
WTCCC/TASC	: <i>Wellcome Trust Case-Control Consortium Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium</i>