

**PENILAIAN JENIS DAN FREKUENSI  
POLIMORFISME GEN RESEPTOR  
ADRENERGIK BETA-2 ( $\beta_2$ AR) DI MALAYSIA**

Oleh

**SITI ROMAINO BINTI MOHD NOR**

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi  
keperluan Ijazah Sarjana Sains

Januari 2009

## PENGHARGAAN

Segala puji dan syukur kepada Allah s.w.t kerana dengan limpah rahmat dan kurnia-Nya, akhirnya saya berjaya menyiapkan tesis ini walaupun dalam seribu keperitan. Penghargaan yang tidak terhingga dan jutaan terima kasih diucapkan kepada penyelia utama, Prof. Madya Dr. Rusli Ismail dan penyelia bersama, Prof. Madya Dr. Teh Lay Kek atas segala tunjuk ajar, bantuan, nasihat dan dorongan serta sokongan yang diberikan kepada saya tidak kira masa dan ketika selama ini.

Seterusnya ucapan penghargaan dan jutaan terima kasih ditujukan kepada rakan-rakan Pharmacogenetic Research Group; Fadhlina, Dr. Wan Nazirah, Yasotha, Fazni, Zuriati, Khairi, Wee Leng, Azahar, Kak Junaidah, Dr. Zil Falil, Dr. Nasir, Dr. Kashfi dan seluruh kakitangan makmal yang turut membantu saya dalam penyelidikan. Kepada kawan-kawan seperjuangan yang lain; Norzie dan Norhafiza, terima kasih atas kerjasama yang diberikan.

Tidak lupa juga penghargaan dan ucapan jutaan terima kasih yang tidak terhingga kepada suami (Zulkarnain Ramli), anak-anak (Nur Alya Batrisyia dan Adib Amirul Merza), bonda (Che Minah Che Cob) dan seluruh ahli keluarga atas sokongan dan dorongan serta doa mereka sepanjang tempoh pengajian saya. Kepada arwah ayah (Mohd Nor Ibrahim), jutaan terima kasih dan seribu keampunan dipohonkan daripada arwah. Semoga rohnyanya dicucuri rahmat.

Kepada seluruh kakitangan dan warga Institut Penyelidikan Perubatan Molekul (INFORMM), En. Wan Zainal dan Kak Siti Norizan terutamanya, jutaan terima

kasih diucapkan atas kerjasama yang telah diberikan. Sebagai makluman, peruntukan penyelidikan ini adalah di bawah tajaan “IRPA Top-Down Grant: Pharmacogenetics and Drug Metabolism”, dari Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI). Akhir sekali penghargaan ini ditujukan kepada Institut Pengajian Siswazah (IPS), Universiti Sains Malaysia (USM) kerana memberi peluang dan tajaan yuran pengajian kepada saya dengan penganugerahan Skim Pembantu Siswazah (Pengajaran) selama dua tahun berturut-turut.

Terima kasih buat terulung kalinya kepada semua pihak yang terlibat dan memberikan kerjasama kepada saya dalam usaha menjayakan penulisan tesis ini.

Sekian.

## SENARAI KANDUNGAN

<b>Kandungan</b>	<b>Muka surat</b>
<b>PENGHARGAAN</b>	<b>ii</b>
<b>SENARAI KANDUNGAN</b>	<b>iv</b>
<b>SENARAI JADUAL</b>	<b>vii</b>
<b>SENARAI RAJAH</b>	<b>ix</b>
<b>SENARAI GAMBAR RAJAH</b>	<b>x</b>
<b>SENARAI SINGKATAN PERKATAAN</b>	<b>xii</b>
<b>SENARAI PERSAMAAN</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRAK</b>	<b>xix</b>
 <b>BAB 1 PENGENALAN DAN TINJAUAN LITERATUR</b>	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Farmakogenetik	2
1.3 Apakah reseptor adrenergik beta?	3
1.4 Mengapa kajian terhadap gen $\beta_2$ AR dilakukan?	7
1.5 Polimorfisme gen $\beta_2$ AR	9
1.5.1 Kaitan klinikal polimorfisme genetik $\beta_2$ AR	16
1.5.1.1 Asma	16
1.5.1.2 Penyakit kardiovaskular	18
1.5.1.3 Kegemukan dan diabetes melitus	18
1.5.1.4 Penyakit paru-paru fibrosis sistik	20
1.6 Analisis gen $\beta_2$ AR melalui kaedah PCR	20
1.7 Objektif kajian	25

## **BAB 2            BAHAN DAN KAEDAH PENYELIDIKAN**

2.1	Analisis polimorfisme genetik menggunakan kaedah PCR	26
2.2	Bahan kimia dan peralatan	26
2.3	Penyediaan reagen untuk pengekstrakan DNA	30
2.3.1	Penyediaan larutan 2 M Tris-HCl (pH 7.8)	30
2.3.2	Penyediaan penampan lisis	30
2.3.3	Penyediaan larutan NaCl-EDTA (pH 8.0)	31
2.3.4	Penyediaan penampan 5 X Tris-EDTA (TE) (pH 8.0)	31
2.3.5	Penyediaan 2 M kalium klorida	32
2.3.6	Penyediaan 20% natrium duodesil sulfat (SDS)	32
2.3.7	Penyediaan RNase A (10 mg/ml)	32
2.3.8	Penyediaan Proteinase-K (20 mg/ml)	33
2.4	Pengekstrakan DNA	33
2.4.1	Prosedur pengekstrakan DNA	33
2.4.2	Pengukuran kepekatan dan ketulenan DNA	35
2.4.3	Pengukuran keutuhan DNA	35
2.5	Pembangunan kaedah PCR	36
2.5.1	Pemilihan primer untuk pembangunan kaedah PCR	36
2.5.2	Penyediaan primer	41
2.5.2.1	Pengiraan amaun air yang diperlukan untuk penyediaan primer	41
2.5.2.2	Penyediaan larutan kerja semasa	43
2.5.3	Profil PCR	44
2.5.4	Penyediaan campuran reagen PCR	44
2.5.5	Optimasasi PCR pertama (PCR 1)	45
2.5.6	Parameter asas protokol amplikasi PCR	46
2.5.7	Langkah optimasasi PCR kedua (PCR 2)	48
2.5.7.1	Protokol PCR 2 satu lokus	49
2.5.7.2	PCR multipleks untuk lima alel	50
2.6	Pengesahan (Validasi) kaedah	55
2.6.1	Saringan awal dan penjujukan DNA	55
2.7	Kawalan mutu PCR	55
2.8	Elektroforesis gel agarosa	56
2.8.1	Penyediaan larutan penampan muatan 6 X	56
2.8.2	Penyediaan penampan 5 X Tris-Borat (TBE) (pH 8.0)	56
2.8.3	Penyediaan gel agarosa 1%	57
2.8.4	Rakaman imej gel	57
2.8.5	Interpretasi produk PCR	58
2.8.6	Pelupusan etidium bromida (EthBr)	60
2.9	Kaedah klinikal	60
2.9.1	Kelulusan etika	60
2.9.2	Pemilihan peserta	60
2.9.3	Kriteria penyertaan	61
2.9.4	Pengumpulan sampel darah	61
2.9.5	Kajian genotip PCR	62
2.9.6	Analisis data	62

<b>BAB 3</b>	<b>KEPUTUSAN</b>	
3.1	Analisis polimorfisme genetik menggunakan kaedah PCR	64
3.1.1	Pengekstrakan DNA	64
3.1.1.1	Pengukuran keutuhan DNA	64
3.1.2	Pembangunan kaedah PCR 1	66
3.1.2.1	Parameter yang diubah dalam pembangunan kaedah PCR 1	68
3.1.2.2	Keputusan akhir ujian optimisasi parameter PCR 1	72
3.1.3	Pembangunan kaedah PCR 2	74
3.1.3.1	PCR 2 satu lokus	74
3.1.3.2	PCR multipleks	79
3.1.3.3	Parameter yang diubah dalam pembangunan kaedah PCR multipleks	81
3.1.3.4	Keputusan akhir PCR multipleks	92
3.1.4	Pengesahan (Validasi) kaedah	94
3.1.4.1	Penyaringan peringkat awal dan penjujukan DNA	94
3.2	Taburan polimorfisme gen $\beta_2AR$ dalam kalangan etnik Melayu, Cina dan India	102
3.2.1	Data demografi	102
3.2.2	Perbandingan frekuensi alel $\beta_2AR$ dalam kalangan peserta Melayu, Cina dan India	104
3.2.3	Perbandingan frekuensi genotip $\beta_2AR$ dalam kalangan peserta Melayu, Cina dan India	110
<b>BAB 4</b>	<b>PERBINCANGAN</b>	<b>117</b>
<b>BAB 5</b>	<b>KESIMPULAN</b>	<b>137</b>
	<b>SENARAI PEMBENTANGAN DAN PENERBITAN</b>	<b>139</b>
	<b>RUJUKAN</b>	
	<b>LAMPIRAN</b>	

## SENARAI JADUAL

<b>Jadual</b>		<b>Muka surat</b>
Jadual 1.1	Polimorfisme gen $\beta_2$ AR pada manusia	11
Jadual 2.1	Senarai bahan kimia dan reagen yang digunakan dalam kaedah PCR	27
Jadual 2.2	Senarai peralatan yang digunakan dalam kaedah PCR	29
Jadual 2.3	Primer yang digunakan dalam protokol PCR 1 dan PCR 2 untuk mengesan variasi dalam gen $\beta_2$ AR	38
Jadual 2.4	Gabungan primer dan panjang serpihan yang dihasilkan oleh setiap lokus polimorfik	53
Jadual 2.5	Primer yang digunakan dalam tindak balas PCR untuk mengesan kelima-lima alel pada gen $\beta_2$ AR	54
Jadual 2.6	Interpretasi produk PCR 2 untuk gen $\beta_2$ AR	59
Jadual 3.1	Frekuensi genotip dalam kalangan 60 pesakit asma dengan 95% CI	96
Jadual 3.2	Data demografik bagi populasi yang telah dikaji	103
Jadual 3.3	Frekuensi alel $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta Melayu dengan 95% CI	105
Jadual 3.4	Frekuensi alel $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta Cina dengan 95% CI	106
Jadual 3.5	Frekuensi alel $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta India dengan 95% CI	107
Jadual 3.6	Perbandingan frekuensi alel pada $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta Melayu, Cina dan India	109
Jadual 3.7	Frekuensi genotip dalam kalangan peserta Melayu dengan 95% CI	112
Jadual 3.8	Frekuensi genotip dalam kalangan peserta Cina dengan 95% CI	113
Jadual 3.9	Frekuensi genotip dalam kalangan peserta India dengan 95% CI	114

Jadual 3.10 Perbandingan frekuensi genotip  $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta Melayu, Cina dan India

116



## SENARAI RAJAH

<b>Rajah</b>		<b>Muka surat</b>
Rajah 1.1	Diagram menunjukkan gen $\beta_2$ AR pada manusia	6
Rajah 1.2	Skematik penghasilan tindak balas oleh gen $\beta_2$ AR	8
Rajah 2.1	Lakaran kedudukan produk amplifikasi PCR 1 dan produk PCR 2 gen $\beta_2$ AR	40
Rajah 3.1(A)	Keputusan penjujukan yang telah mengenal pasti sampel adalah heterozigos Arg16/Gly16	100
Rajah 3.1(B)	Keputusan penjujukan yang telah mengenal pasti sampel adalah heterozigos C-20/T-20	100
Rajah 3.1(C)	Keputusan penjujukan yang telah mengenal pasti sampel adalah heterozigos Gln27/Glu27	100
Rajah 3.1(D)	Keputusan penjujukan yang telah mengenal pasti sampel adalah homozigos Thr164/Thr164	101
Rajah 3.1(E)	Keputusan penjujukan yang telah mengenal pasti sampel adalah heterozigos Arg-47/Cys-47	101

## SENARAI GAMBAR RAJAH

<b>Gambar rajah</b>		<b>Muka surat</b>
Gambar rajah 3.1	Keputusan ujian keutuhan DNA genom daripada 10 individu yang berbeza	65
Gambar rajah 3.2	Keputusan eksperimen pertama dalam pembangunan kaedah PCR 1	67
Gambar rajah 3.3	Keputusan amplifikasi PCR 1 setelah beberapa parameter diubah suai	69
Gambar rajah 3.4	Keputusan amplifikasi PCR 1 menggunakan mesin kitaran termal bercerun Mastercycler <sup>®</sup> , Eppendorf, (Hamburg, Germany), untuk mendapatkan suhu penyepuhlindungan primer yang berbeza	71
Gambar rajah 3.5	PCR 1 yang telah berjaya diamplifikasi menggunakan kaedah yang dibangunkan	73
Gambar rajah 3.6	Kaedah yang telah dibangunkan untuk mengamplifikasi PCR 2 satu lokus bagi alel Arg16/Gly16, C-20/T-20, Gln27/Glu27, Arg-47/Cys-47 dan Thr164/Ile164	76
Gambar rajah 3.7	Keputusan amplifikasi PCR 2 satu lokus bagi alel Arg16/Gly16, C-20/T-20, Gln27/Glu27, Arg-47/Cys-47 dan Thr164/Ile164	78
Gambar rajah 3.8	Keputusan proses amplifikasi kelima-lima alel secara serentak	80
Gambar rajah 3.9	Gabungan dua set tindak balas tripleks (set A/B: Arg16/Gly16, C-20/T-20 dan Arg-47/Cys-47) dan dupleks (set C/D: Gln27/Glu27 dan Thr164/Ile164)	83
Gambar rajah 3.10	Keputusan pembangunan PCR 2 dengan pencairan 1:50 bagi templat DNA	85
Gambar rajah 3.11	Keputusan pembangunan PCR 2 yang seterusnya dengan mengubahsuai kepekatan primer	87
Gambar rajah 3.12	Keputusan PCR 2 dengan gabungan pasangan alel 16 dan -20 sebagai dupleks (set A/B: Arg16/Gly16 dan C-20/T-20) dan alel -47, 27 dan 164 sebagai tripleks (set C/D:	89

	Gln27/Glu27, Arg-47/Cys-47 dan Thr164/Ile164)	
Gambar rajah 3.13	Kesan kepekatan polimerase <i>Taq</i> DNA dan garam $Mg^{2+}$ yang berbeza-beza dalam amplifikasi dupleks dan tripleks PCR untuk mengenal pasti lima alel yang berbeza dalam $\beta_2AR$	91
Gambar rajah 3.14	Gambar gel PCR multipleks untuk alel Arg16/Gly16, C-20/T-20, Gln27/Glu27, Arg-47/Cys-47 dan Thr164/Ile164 yang di amplifikasi secara serentak	93
Gambar rajah 3.15	Gambar gel PCR multipleks bagi dua sampel pesakit asma	97
Gambar rajah 3.16	Salah satu sampel yang telah dipilih untuk penjujukan	99

## SENARAI SINGKATAN PERKATAAN

%	Peratus
°C	Darjah selsius
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
260 nm ( $A_{260}$ )	Bacaan jarak gelombang pada 260 nm
280 nm ( $A_{280}$ )	Bacaan jarak gelombang pada 280 nm
5' UTR	Kawasan terbalik 5'
AC	Adenil siklase
Arg	Arginina
ASO	Oligonukleotida spesifik alel
AUC	Kawasan di bawah lengkung kepekatan masa
B164c	Primer beta 164 jenis semula jadi
B164t	Primer beta 164 jenis varian
B16a	Primer beta 16 jenis semula jadi
B16g	Primer beta 16 jenis varian
B20c	Primer beta -20 jenis semula jadi
B20t	Primer beta -20 jenis varian
B27c	Primer beta 27 jenis semula jadi
B27g	Primer beta 27 jenis varian
B47c	Primer beta -47 jenis semula jadi
B47t	Primer beta -47 jenis varian
BFw	Primer kedepan
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
bp	Pasangan bes
BRv	Primer berbalik
cAMP	Siklik adenosin mono fosfat
CaCl <sub>2</sub>	Kalsium klorida
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsium klorida dihidrasi
CI	Selang keyakinan
Da	Dalton
DGGE	“Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis”
DNA	Asid dioksiribonukleik
dNTPs	Dioksinukleosida trifosfat
EDTA	Asid etilindiamin-tetreasetik

EthBr	Etidium bromida
g	Gram
Gln	Glutamina
Glu	Asid glutamik
Gly	Glisinina
Gs	Protein G
HUSM	Hospital Universiti Sains Malaysia
IgE	Imunoglobulin E
Ile	Isoleusina
Kb	Kilobes
KCl	Potassium klorida
M	Molar
M <sub>1</sub>	Kepekatan stok asal primer
M <sub>2</sub>	Kepekatan stok pemprosesan primer yang dikehendaki
mg	Miligram
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	Asid ribonukleik pengutus
N	Bilangan sampel
NaCl	Natrium klorida
NaCl-EDTA	Natrium klorida asid etilindiamin-tetreasetik
nx/-	Bilangan individu heterozigos untuk X
nx/x	Bilangan individu homozigos untuk X
OD	Ketumpatan optik
ORF	Rangka bacaan terbuka
<i>p</i>	Jenis semula jadi
PCR	Tindak balas berantai polimerase
PCR 1	PCR pertama
PCR 2	PCR kedua
pmol	Pikomol
<i>q</i>	Jenis varian
RFLP	Polimorfisme kepanjangan serpihan pembatasan
rpm	Rotasi perminit
SDS	Natrium duodesil sulfat
Ser	Serina

sm	Sentimeter
SNPs	Polimorfisme nukleotida tunggal
SP	Sisihan piawai
SSCP	Polimorfisme konformasi bebenang tunggal
TA	Tidak berjaya diamplifikasi
TBE	Penampakan Tris-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGGE	Gel kecerunan suhu elektroforesis
Thr	Threonina
Tm	Suhu penyepuhlindungan primer
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
U	Unit
UMMC	Pusat Perubatan Universiti Malaya
USM	Universiti Sains Malaysia
V	Voltan
V <sub>2</sub>	Isi padu akhir campuran tindak balas yang dikehendaki
V <sub>1</sub>	Jumlah isi padu stok asal yang perlu diambil
$\chi^2$	Chi square
$\alpha$ AR	Reseptor adrenergik alfa
$\beta_2$ AR	Reseptor adrenergik beta-2
$\beta$ AR	Reseptor adrenergik beta

## SENARAI PERSAMAAN

### Persamaan 2.1

$$\text{Kepekatan DNA (mg/ml)} = \text{Penyerapan pada 260 nm (A}_{260}\text{)} \times \text{faktor pencairan (10)} \\ \times 0.05 \text{ mg/ml}$$

### Persamaan 2.2

$$T_m (\text{°C}) = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

### Persamaan 2.3

$$\text{Jumlah primer (pmol)} = \frac{\text{Jumlah serbuk primer } (\mu\text{g})}{\text{Berat molekul nukleotida}}$$

### Persamaan 2.4

$$\text{Jumlah primer (pmol)} = \frac{\text{Bilangan OD} \times 33 \text{ picogram} \times 10^6}{\text{Bilangan mer primer} \times 330}$$

### Persamaan 2.5

$$\text{Jumlah air yang diperlukan } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Jumlah primer (pmol)}}{\text{Larutan stok primer (pmol/}\mu\text{l)}}$$

**Persamaan 2.6**

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

**Persamaan 2.7**

$$\text{Frekuensi alel} = \frac{2(n_{x/x}) + n_{x/-}}{2N}$$

**Persamaan 2.8**

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$



**AN ASSESSMENT OF THE TYPES AND FREQUENCIES OF BETA-2  
ADRENERGIC RECEPTOR ( $\beta_2$ AR) GENE POLYMORPHISM IN  
MALAYSIA**

**ABSTRACT**

Beta-2 adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) is encoded by an intronless gene on the long arm (q31-q32) of chromosome 5. The gene contains single nucleotide polymorphisms (SNPs), some of which have been associated with clinical effectiveness as well as side effects of drugs and the pathogenesis of diseases. The genetic polymorphism of  $\beta_2$ AR which may have important pharmacogenetics relevance, have not been reported thus far in Malaysia. Our objective was to develop a simple and rapid method based on Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect all the five alleles of interest simultaneously in  $\beta_2$ AR and to investigate the types and frequencies of  $\beta_2$ AR variants among our Malays, Chinese and Indian healthy unrelated in Malaysia. Participants were enrolled into the study if they met the criteria after they signed a written informed consent. Their DNA was extracted using standard methods and was subjected to allele specific multiplex PCR that was developed to detect all the five nucleotide changes in  $\beta_2$ AR gen. We found that among 212 Malays we studied, the frequencies of mutated -47Cys, -20T, Gly16, Glu27, and Ile164 alleles were 93.16%, 72.64%, 43.16%, 6.84% and 0% respectively. Among our 172 Chinese, the respective frequencies were 82.56%, 75.00%, 42.15%, 9.88% and 1.16%. For the 173 Indians, the frequencies were 83.82%, 72.25%, 47.11%, 15.03% and 0.58%. In term of genotype frequency, at codon 16 and at codon 27; the most common genotypes were Arg16Gly and Gln27Gln respectively for all the three ethnic groups. At codon -20, codon -47 and

codon 164, the correspondingly most common genotypes were T-20T, Cys-47Cys and Thr164Thr respectively. As a conclusion, we successfully developed and optimized a method to detect all the five alleles interested of the  $\beta_2$ AR gene simultaneously and this method was used in assessment of the types and frequencies of the  $\beta_2$ AR gene in Malays, Chinese and Indians in Malaysia. This method also suitable for use in a population study of genetic polymorphisms of  $\beta_2$ AR gene.

# **PENILAIAN JENIS DAN FREKUENSI POLIMORFISME GEN RESEPTOR ADRENERGIK BETA-2 ( $\beta_2$ AR) DI MALAYSIA**

## **ABSTRAK**

Gen reseptor adrenergik beta-2 ( $\beta_2$ AR) dikodkan oleh gen tanpa intron pada kedudukan lengan panjang q31-q32 kromosom 5. Gen ini mengandungi polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs), yang sesetengahnya dikaitkan dengan keberkesanan klinikal seperti kesan sampingan terhadap drug dan patogenesis penyakit. Di Malaysia, polimorfisme genetik  $\beta_2$ AR yang mungkin mempunyai hubungan penting dalam farmakogenetik, belum pernah dilaporkan setakat ini. Objektif kajian ini adalah untuk menghasilkan satu ujian yang mudah dan cepat berasaskan kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR) yang sekaligus boleh mengesan kelima-lima alel (-47, -20, 16, 27 dan 164) secara serentak untuk gen  $\beta_2$ AR dan seterusnya menilai jenis dan frekuensi kelima-lima alel untuk gen  $\beta_2$ AR dalam kalangan peserta Melayu, Cina dan India di Malaysia yang tidak ada pertalian. Peserta yang memenuhi kriteria yang ditetapkan dibenarkan menyertai kajian yang seterusnya setelah menandatangani borang keizinan. DNA diekstrak menggunakan kaedah standard dan digunakan untuk PCR multipleks spesifik alel yang telah dibangunkan untuk mengenal pasti perubahan pada lima nukleotida pada gen  $\beta_2$ AR. Kami mendapati bahawa dalam kalangan 212 peserta Melayu, frekuensi alel pada varian -47Cys, -20T, Gly16, Glu27 dan Ile164 masing-masing ialah 93.16%, 72.64%, 43.16%, 6.84% dan 0%. Dalam kalangan 172 peserta Cina pula, frekuensi alel masing-masing ialah 82.56%, 75.00%, 42.15%, 9.88% dan 1.16%. Sementara dalam kalangan 173 peserta India, frekuensi alel masing-masing ialah 83.82%,

72.25%, 47.11%, 15.03% dan 0.58%. Dari segi frekuensi genotip pula, pada kodon 16 dan kodon 27, kebanyakan genotip yang biasa ditemui masing-masing ialah Arg16Gly dan Gln27Gln untuk ketiga-tiga kumpulan etnik. Pada kodon -20, kodon -47 dan kodon 164, kebanyakan genotip yang biasa ditemui masing-masing ialah T-20T, Cys-47Cys dan Thr164Thr. Sebagai kesimpulannya, kami telah berjaya membangunkan dan mengoptimisasi satu kaedah untuk mengenal pasti kesemua lima alel pada gen  $\beta_2$ AR secara serentak, dan kaedah ini telah digunakan dalam kajian menilai jenis dan frekuensi gen  $\beta_2$ AR dalam kalangan etnik Melayu, Cina dan India di Malaysia. Kaedah ini juga sesuai digunakan untuk kajian polimorfisme genetik dalam populasi yang besar.

# **BAB 1**

## **Pengenalan dan Tinjauan**

### **Literatur**

#### **1.1 Pengenalan**

Reseptor adrenergik beta-2 ( $\beta_2$ AR) ditemui dalam laluan udara otot licin dan ia merupakan target untuk agonis  $\beta_2$  yang biasanya digunakan dalam rawatan bronkospasme. Terdapat kajian yang menunjukkan bahawa reseptor ini adalah polimorfik dalam populasi manusia. Seseengah bentuk reseptor ini mempunyai kepentingan farmakologi yang berbeza. Dengan kewujudan reseptor yang polimorfik ini, maka wujudlah perbezaan jenis dan frekuensi polimorfisme gen  $\beta_2$ AR untuk kumpulan etnik berbeza di dunia. Namun kajian secara terperinci masih belum dijalankan lagi.

Di Malaysia, polimorfisme genetik  $\beta_2$ AR dan kepentingannya dalam farmakogenetik belum pernah dikaji. Polimorfisme ini diketahui dapat mempengaruhi kenyahupayaan reseptor serta kepelbagaian farmakodinamik terhadap agonis  $\beta_2$ . Ia juga telah dikaitkan dengan patogenesis beberapa jenis penyakit seperti asma bronkial (Kobilka *et al.*, 1987, Hall *et al.*, 1995, Turki *et al.*, 1995), darah

tinggi (Timmermann *et al.*, 1998, Bray *et al.*, 2000, Tomaszewski *et al.*, 2002), kegemukan (Large *et al.*, 1997, Ishiyama-Shigemoto *et al.*, 1999, Yamada *et al.*, 1999) dan fibrosis sistik (Buscher *et al.*, 2002).

## **1.2 Farmakogenetik**

Farmakogenetik ditakrifkan sebagai kajian perwarisan dan tindak balas seseorang individu terhadap drug. Setiap individu akan memberikan tindak balas yang berbeza terhadap terapi drug; kerana sesetengah drug yang efektif dalam sesetengah individu mungkin tidak efektif atau toksik kepada individu lain. Kepelbagaian ini biasanya disebabkan oleh faktor genetik (Koo & Lee, 2006). Tujuan penyelidikan farmakogenetik adalah untuk membantu ahli perubatan memberikan drug pada dos yang lebih tepat kepada seseorang individu dalam usaha mencapai keberkesanan yang maksimum dan kesan toksisiti yang minimum berdasarkan ujian genetik. Diharapkan pada masa akan datang, individu yang mewarisi penyakit seperti kekurangan enzim mungkin mendapat penambahbaikan hasil penggunaan drug dalam dos yang lebih tepat. Di samping itu, dengan adanya kajian farmakogenetik, kita akan lebih memahami tindak balas yang dihasilkan oleh seseorang individu. Oleh itu, rawatan yang diberikan dapat mengelak kesan sampingan dan seterusnya mengurangkan kos terapi (Weiss *et al.*, 2006).

Variasi atau kepelbagaian tindak balas terhadap drug umumnya mempunyai hubung kait dengan beberapa faktor yang dapat dibahagi kepada dua faktor utama, iaitu; faktor fisiologi dan faktor persekitaran. Faktor fisiologi merangkumi umur, jantina, keturunan dan berat badan. Manakala faktor persekitaran pula merangkumi

corak pemakanan, penerimaan terhadap kemasukan drug dan pendedahan pada sesetengah bahan kimia (Koo & Lee, 2006).

Faktor genetik merupakan salah satu faktor penting dalam kepelbagaian tindak balas terhadap drug. Ia boleh disebabkan wujudnya mutasi atau perubahan pada satu nukleotida dalam gen yang mengkodkan enzim yang memetabolismakan drug (DME), bahan pengangkut, rangkaian ion dan reseptor drug. Kepelbagaian genetik dalam gen-gen tertentu memainkan peranan penting dalam mempengaruhi efikasi dan ketoksikan terhadap rawatan.

### **1.3 Apakah reseptor adrenergik beta?**

Reseptor merupakan makromolekul sasaran unik yang terdapat pada permukaan sel atau pun pada bahagian intraselular. Molekul yang spesifik seperti hormon, neurotransmitter atau bahan-bahan lain akan mengikat pada reseptor yang spesifik untuk menghasilkan tindak balas farmakologi. Terdapat beberapa kumpulan utama reseptor seperti adrenergik, kolinergik dan histaminergik. Setiap kumpulan reseptor ini mempunyai beberapa subkumpulan dan dalam setiap subkumpulan terdapat pula beberapa jenis reseptor. Dalam kumpulan adrenergik umpamanya, terdapat dua subkumpulan iaitu reseptor adrenergik alfa ( $\alpha$ AR) dan reseptor adrenergik beta ( $\beta$ AR). Namun, reseptor yang dipilih dalam kajian ini ialah reseptor adrenergik beta jenis beta-2 ( $\beta_2$ AR). Bylund *et al.*, (1994) melaporkan bahawa  $\beta$ AR dibahagikan kepada sekurang-kurangnya tiga jenis iaitu; reseptor  $\beta_1$ , reseptor  $\beta_2$  dan reseptor  $\beta_3$ . Kesemua reseptor ini masing-masing telah dikenal pasti wujud di dalam otot kardiak, otot licin saluran udara dan tisu adipos.

Sehingga kini, kesemua reseptor ini telah berjaya diklonkan buat pertama kalinya pada tahun 1987 (Kobilka *et al.*, 1987). Reseptor  $\beta_1$  diaktifkan oleh noradrenalina dan secara fisiologi aktivitiya dilaraskan oleh saraf simpatetik. Reseptor  $\beta_2$  pula lebih cenderung diaktifkan oleh adrenalina di dalam darah; dan reseptor  $\beta_3$  pula terlibat dalam lipolisis tetapi semakin dikenali terlibat dalam fungsi-fungsi lain seperti regulasi metabolisme lipid. Melalui kajian dalam sel hibrid somatik dan penghibridan secara in-situ, Kobilka *et al.*, (1987) telah melaporkan bahawa gen  $\beta_2$ AR pada manusia terletak pada kedudukan lengan panjang q31-q32 kromosom 5 dan mengkodkan gen tanpa intron bersaiz 1,239 pasangan bes (bp). Ia terdiri daripada 413 residu asid amino yang bersaiz lebih kurang 46,500 Dalton (Da).

Reseptor adrenergik beta-2 ( $\beta_2$ AR) ialah reseptor yang berpasangan dengan protein G ( $G_s$ ), yang diaktifkan oleh katekolamina endogen. Terdapat tujuh bahagian hidrofobik pada asid amino 20 - 25 yang berada dalam bentuk heliks alfa yang merentangi membran sel. Manakala bahagian hidrofilik yang berselang seli pula berada pada kawasan intrasel dan ekstrasel, dengan amino (N)-terminal terdedah pada bahagian luar dan karboksil (C)-terminal berada pada bahagian dalam sitoplasma (McGraw & Liggett, 2005) (Rajah 1.1).

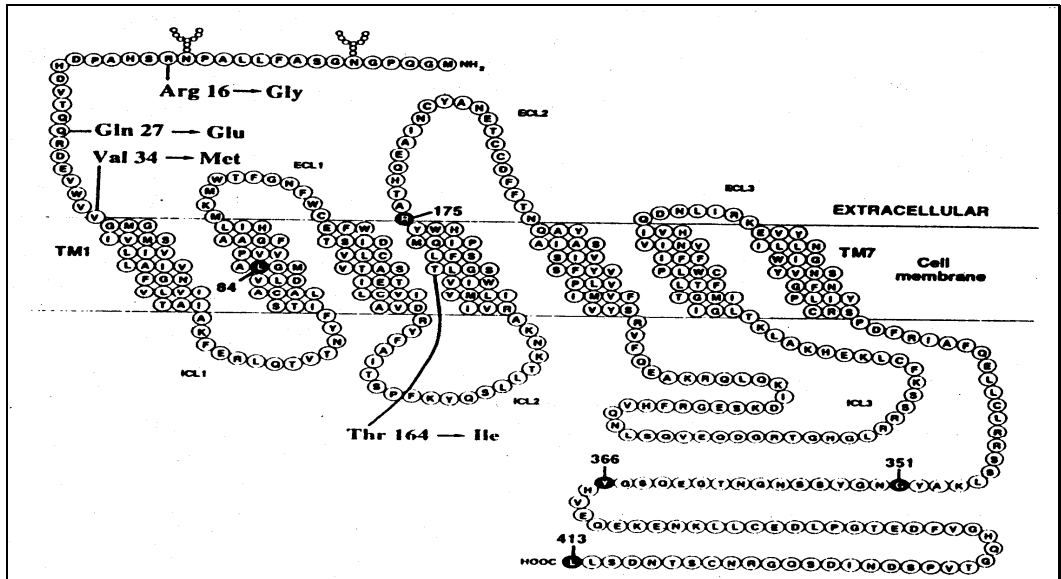
Reseptor adrenergik beta-2 ( $\beta_2$ AR) ialah reseptor yang mempunyai pelbagai fungsi dan tersebar secara meluas. Antara fungsinya ialah berperanan dalam modulasi otot licin seperti tindak balas terhadap agonis  $\beta_2$  dan antagonis  $\beta_2$ , di samping memainkan peranan penting dalam mengawal atur fungsi kardiak, salur darah pulmonari dan fungsi metabolik. Reseptor adrenergik beta-2 ( $\beta_2$ AR) yang pada kebiasaannya sering ditemui dalam paru-paru, berperanan dalam regulasi banyak aspek dalam fungsi paru-paru. Stimulasi oleh gen  $\beta_2$ AR yang terletak dalam otot-otot



licin pada saluran udara akan menyebabkan pengenduran, oleh itu membawa pada bronkodilatasi (Goldie *et al.*, 1984, Nials *et al.*, 1993).

Kajian terhadap fungsi fisiologi gen  $\beta_2$ AR pada manusia telah membongkar beberapa pemerhatian. Pertama, ia telah menunjukkan bahawa terdapat banyak variasi antara individu terhadap saling tindak balas ke atas drug; dan kedua, fungsi reseptor menunjukkan ianya diregulasikan secara dinamik seperti yang ditunjukkan oleh variasi antara individu (Reihnsaus *et al.*, 1993; Liggett, 1995). Hasil daripada kajian pemetaan secara autoradiografik oleh Carstairs *et al.*, (1985), menunjukkan bahawa gen  $\beta_2$ AR pada manusia telah diekspreskan di dalam otot-otot licin laluan udara dan ia ditempatkan di bawah kelenjar-kelenjar sub-mukosal.

Agonis  $\beta_2$  ialah rawatan yang biasa digunakan untuk membuka laluan udara yang sempit pada saluran pernafasan pesakit. Ia juga mempengaruhi salur darah di dalam saluran pernafasan dengan menyebabkan vasodilatasi dan seterusnya meningkatkan edaran pengaliran darah dalam sirkulasi bronkial (Barker *et al.*, 1988). Di samping itu, agonis  $\beta_2$  juga merangsang sel-sel berlendir di bawah kelenjar sub-mukosal dan seterusnya menghasilkan perembesan lendir (Ueuki *et al.*, 1980). Agonis  $\beta_2$  juga dapat bertindak ke atas gen  $\beta_2$ AR dalam sel-sel epitelium saluran udara yang menyebabkan peningkatan dalam perembesan lendir (Mortensen *et al.*, 1991). Ia mampu menghalang pembebasan histamina daripada bahagian paru-paru manusia dan mengurai penyebaran sel mas pada paru-paru melalui gen  $\beta_2$ AR seperti yang telah ditunjukkan oleh pelbagai kajian (Butchers *et al.*, 1980; Church & Hiroi, 1987).



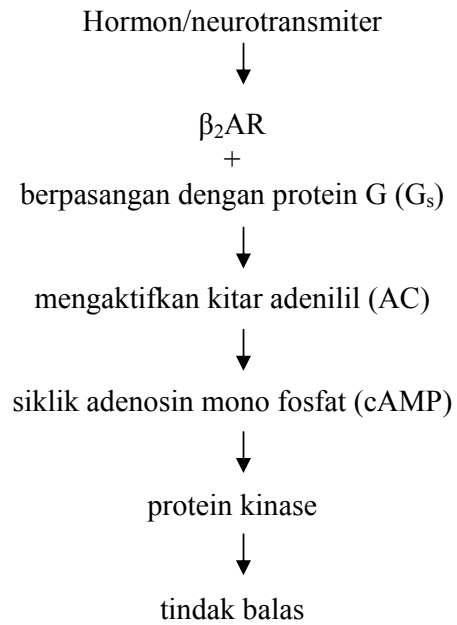
Rajah 1.1 Diagram menunjukkan gen  $\beta_2$ AR pada manusia

Rajah di atas menunjukkan jujukan asid amino dan kawasan polimorfik pada gen  $\beta_2$ AR (Liggett, 1997).

#### 1.4 Mengapa kajian terhadap gen $\beta_2$ AR dilakukan?

Reseptor beta dipilih dalam kajian ini adalah atas kepentingannya. Katekolamina seperti adrenalina dan noradrenalina memodulasi banyak proses-proses fisiologi badan dengan menambat pada reseptor beta pada pelbagai organ badan seperti jantung, salur darah, bronkus, hepar, pankreas dan lain-lain. Halangan dan rangsangan reseptor ini mempunyai implikasi klinikal yang penting dan relevan dalam pelbagai penyakit. Antara contohnya ialah kesan halangan reseptor beta kepada penyakit-penyakit vaskular seperti hipertensi dan aritmia, kesan rangsangan reseptor beta ke atas penyakit asma dan lain-lain.

Reseptor beta dipercayai berada pada permukaan luar membran sel efektor. Secara fisiologinya, penambatan agonis pada reseptor beta menyebabkan interaksi reseptor dengan protein G ( $G_s$ ) yang terletak pada permukaan sitoplasma di membran plasma. Ini merangsang enzim adenil siklase (AC) yang memangkinkan pertukaran adenosina trifosfat (ATP) dalam sel kepada adenosina mono fosfat siklik (cAMP). Kenaikan paras cAMP dalam sel merangsang protein kinase yang kereaktifannya bergantung pada cAMP lalu memangkinkan fosforilasi beberapa enzim lain dan ini mengatur kadar pelbagai proses-proses dalam sel yang akhirnya memberi kesan rangsangan reseptor beta (Katzung, 1995).



**Rajah 1.2** Skematik penghasilan tindak balas oleh gen  $\beta_2$ AR

## 1.5 Polimorfisme gen $\beta_2$ AR

Polimorfisme genetik adalah salah satu faktor penting yang mempengaruhi perbezaan etnik dalam tindak balas terhadap suatu drug. Polimorfisme genetik ditafsirkan sebagai keadaan yang mana lebih dari satu alel bersaing pada satu lokus gen, biasanya akibat satu atau lebih proses mutasi yang berlaku pada alel (Lee, 1991). Alel yang mengalami mutasi tadi, secara dominan, ko-dominan atau resesif, mengekod satu protein yang tiada aktiviti atau mempunyai aktiviti yang berubah. Keadaan ini menyebabkan ada sekurang-kurangnya dua fenotip dalam suatu populasi yang mana fenotip yang paling kecil berlaku pada kekerapan sekurang-kurangnya 1% dalam populasi itu (Lee, 1991).

Gen  $\beta_2$ AR pula mengandungi polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs), yang sesetengahnya telah dikaitkan dengan keberkesanan klinikal, kesan sampingan terhadap drug dan diimplikasikan dalam patogenesis penyakit. Kajian terhadap polimorfisme gen  $\beta_2$ AR pada manusia dilakukan kerana ia menyumbang kepada perbezaan fungsi reseptor (Green *et al.*, 1993) yang sering berlaku dalam populasi. Kajian terhadap gen  $\beta_2$ AR yang telah dilakukan melalui pemeriksaan pada rangka bacaan terbuka (ORF) dengan menggunakan teknik gel kecerunan suhu elektroforesis (TGGE), telah mengenal pasti sejumlah sembilan lokasi polimorfik yang berbeza iaitu pada asid amino 46, 79, 100, 252, 491, 523, 1053, 1098 dan 1239 (Reihnsaus *et al.*, 1993).

Walau bagaimanapun, hanya empat polimorfisme sahaja yang telah dikenal pasti menyebabkan perubahan asid amino iaitu pada posisi 46, 79, 100, dan 491, manakala lima polimorfisme yang selebihnya tidak menyebabkan perubahan pada

asid amino (Reihsaus *et al.*, 1993)(Jadual 1.1). Tiga daripadanya iaitu pada kodon 16, 27 dan 164, telah dikaji secara terperinci. Ketiga-tiga jujukan asid amino ini dapat mengubah fungsi reseptor yang terdapat pada saluran udara. Hal ini berlaku kerana perbezaan bentuk reseptor yang mungkin disebabkan oleh mutasi yang mengubah asid amino dan seterusnya menghasilkan aktiviti reseptor yang berbeza sama ada terhadap katekolamina atau kemasukan agonis  $\beta_2$  seperti salbutamol (Hall *et al.*, 1995). Mekanisme variasi gen  $\beta_2$ AR yang mengubah fungsi reseptor telah dikaji secara *in-vitro* oleh Green *et al.*, (1993).

Perbezaan pada semua polimorfisme ini adalah melalui pertukaran bes tunggal pada posisi yang berbeza dalam jujukan pengekodan gen tersebut. Namun, sebilangan pertukaran bes ini adalah dengan secara klinikalnya boleh diabaikan disebabkan pertindihan kod asid amino yang sama.

Kajian yang dilakukan pada peringkat permulaan telah tertumpu pada jujukan asid amino ke-16 yang terdiri sama ada dalam bentuk arginina (Arg) atau glisina (Gly), bergantung sama ada bes 46nya ialah A atau G. Polimorfisme yang kedua pula ialah pada asid amino ke-27 yang mungkin wujud sebagai glutamina (Gln) atau asid glutamik (Glu), bergantung sama ada bes 79 ialah C atau G. Manakala polimorfisme yang ketiga pula adalah pada asid amino ke-164, yang mungkin wujud sebagai Threonina (Thr) atau Isoleusina (Ile), bergantung sama ada bes 491 ialah C atau T.

Keupayaan reseptor untuk menyahpeka pada jujukan asid amino ke-16, adalah lebih tinggi dengan kehadiran varian Gly16 berbanding dengan kehadiran Arg16 terutamanya apabila ia terdedah pada agonis (Reihsaus *et al.*, 1993).

**Jadual 1.1 Polimorfisme gen  $\beta_2$ AR pada manusia**

<b>No. asid nukleik</b>	<b>Asid nukleik</b>	<b>No. asid amino</b>	<b>Asid amino</b>	<b>Fenotip reseptor</b>
-47	C T	19	Arg Cys	Rujukan (jenis semula jadi) Meningkatkan pengekspresan
46	A G	16	Arg Gly	Rujukan (jenis semula jadi) Meningkatkan kenyahupayaan
79	C G	27	Gln Glu	Rujukan (jenis semula jadi) Kenyahupayaan tidak hadir, bentuk belum matang
491	C T	164	Thr Ile	Rujukan (jenis semula jadi) Mengubah afiniti pengikatan, perpasangan, pemencilan

Green *et al.*, (1994) telah menunjukkan mutagenesis tapak terarah dan kombinasi rekombinan diekspreskan dalam bentuk homozigos pada asam amino 16 dan 27 dalam fibroblas hamster Cina, yang kebiasaannya tidak diekspreskan di dalam mana-mana reseptor adrenergik. Mereka membuktikan bahawa tidak terdapat perbezaan dalam pengikatan agonis antara genotip, tetapi varian Gly16 menunjukkan tanda-tanda peningkatan kenyahupayaan pada kawasan agonis ketika pengekspressan reseptor apabila dibandingkan dengan Arg16. Ia menunjukkan varian Gly16 adalah tidak bergantung pada varian 27 pada gen  $\beta_2$ AR apabila ia diekspreskan bersama. Kombinasi Arg16/Glu27 menunjukkan ketidakhadiran sepenuhnya kenyahupayaan pada kawasan reseptor agonis, sebaliknya Gly16/Glu27 menunjukkan peningkatan kenyahupayaan pada peringkat yang sama dengan Gly16/Gln27. Keputusan ini mencadangkan bahawa peningkatan kenyahupayaan ini mempunyai kaitan dengan kehadiran varian Gly16 berbanding dengan Glu27 apabila kedua-dua varian ini diekspreskan bersama dalam bentuk homozigos.

Green *et al.*, (1995), dalam kajiannya yang lain juga mengkaji fungsi reseptor di dalam kultur utama otot licin saluran udara pada manusia. Mereka telah mengesahkan bahawa Gly16 mempunyai kaitan yang sangat jelas dengan peningkatan kenyahupayaan agonis pada gen  $\beta_2$ AR.

Kajian lain yang telah dilakukan oleh Martinez *et al.* (1997) dan Kotani *et al.*, (1999) juga menunjukkan bahawa kehadiran varian Gly16 telah mengurangkan tindak balas gen  $\beta_2$ AR apabila dibandingkan dengan kehadiran Arg16, tetapi sebaliknya polimorfisme 27 adalah tidak bersangkutan paut dengan tindak balas gen  $\beta_2$ AR.



Tambahan pula, untuk menunjukkan peningkatan kenyahupayaan, Gly16 juga didapati mempunyai hubung kait dengan nokturnal asma. Pemerhatian ini dibuat berdasarkan satu kajian yang telah dilakukan oleh Turki *et al.*, (1995). Daripada sejumlah 23 pesakit nokturnal asma, 16 (69.6%) ialah homozigos Gly16, sementara 8 (36.4%) dari 22 pesakit bukan nokturnal ialah homozigos Gly16 ( $p = 0.038$  dan nisbah 4.0). Penemuan ini seterusnya disokong oleh kajian lain iaitu oleh Cooper *et al.*, (1996) yang mendapati bahawa genotip Gly16 adalah lebih menyerupai tindak balas yang ditunjukkan oleh kortikosteroid pada nokturnal asma (nisbah 25.5).

Sementara itu Turki *et al.*, (1995) pula gagal menunjukkan hubungan pada polimorfisme ini (Gly16) dalam penyakit asma yang teruk, tetapi Reihsaus *et al.*, (1993) mendapati perkaitan yang signifikan antara polimorfisme Gly16 dengan fenotip penyakit asma yang teruk. Berlawanan dengan genotip Gly16, Arg16 pula didapati bertindak balas dengan baik terhadap saluran pernafasan. Pembawaan genotip ini (Arg16) didapati mempunyai kesan yang lebih baik terhadap penyedutan agonis  $\beta_2$  jika dibandingkan dengan kehadiran Gly16 (homozigos dan heterozigos) (Martinez *et al.*, 1997).

Tan *et al.*, (1997) dalam kajiannya terhadap 22 orang pesakit asma sederhana yang stabil mencadangkan bahawa di dalam homozigos Gly16, kadar penyahpekaan bronkodilatasi berlaku hanya apabila rawatan jangka panjang dengan agonis  $\beta_2$  (formoterol) digunakan. Tambahan pula, terdapat kajian seterusnya yang dilakukan oleh Lima *et al.*, (1999) terhadap satu kumpulan pesakit yang terdiri daripada 16 orang pesakit asma sederhana, mereka mendapati bahawa kehadiran homozigos Arg16 menunjukkan kesan yang lebih cepat pada kepekatan plasma yang sama jika dibandingkan dengan kehadiran Gly16 (homozigos dan heterozigos).

Walau bagaimanapun, kajian yang melibatkan saiz sampel yang lebih besar telah dilakukan oleh Israel *et al.*, (2000), mereka mendapati bahawa pada pesakit yang homozigos Arg16, pengurangan yang signifikan dalam fungsi pulmonari berlaku sekiranya mereka terdedah pada penggunaan albuterol untuk jangka masa yang panjang. Pemerhatian lain telah dibuat oleh Taylor *et al.*, (2000), yang mendapati bahawa terdapat insiden yang lebih tinggi pada pesakit asma dalam individu yang mempunyai homozigos Arg16 daripada mereka yang heterozigos atau homozigos Gly16, semasa rawatan sedutan agonis  $\beta_2$  diberikan untuk jangka masa yang panjang.

Nasir (2005) juga telah melaporkan bahawa terdapat hubung kait yang menunjukkan prevalen homozigos Gly16 adalah tinggi dalam kumpulan pesakit asma semasa serangan akut berbanding kumpulan peserta sihat ( $p = 0.029$ ). Walau bagaimanapun, tiada hubung kait antara prevalen genotip pada kodon 27 dengan pesakit asma semasa serangan akut ( $p = 0.113$ ). Oleh itu, penulis telah membuat kesimpulan bahawa polimorfisme gen  $\beta_2AR$  pada kodon 16 adalah lebih kerap dalam golongan pesakit asma yang mendapat serangan akut.

Bertentangan dengan fungsi Gly16, Glu27 pula bertindak melindungi kenyahupayaan dalam kedua-dua sistem sel yang telah dijangkiti dan yang tidak dijangkiti (Green *et al.*, 1994). Dengan menggunakan kultur sel-sel otot licin dalam saluran udara pada manusia, Green *et al.*, (1994) mendapati bilangan reseptor jenis Glu27 berkurangan pada kadar yang lebih perlahan berbanding dengan Gln27 apabila kedua-dua jenis reseptor ini didedahkan pada agonis  $\beta_2$  untuk jangka masa yang panjang.

Hall *et al.*, (1995) telah mengkaji kereaktifan saluran udara dalam sekumpulan 65 orang pesakit asma ringan kepada pesakit asma sederhana, mereka mendapati bahawa individu dengan bentuk reseptor Glu27 adalah lebih tahan terhadap penyahupayaan. Tan *et al.*, (1997) juga dalam kajiannya terhadap 22 orang pesakit asma yang menerima rawatan agonis  $\beta_2$  untuk jangka masa yang panjang, mendapati bahawa kadar penyahpekaan adalah lebih baik dalam kumpulan pesakit yang mempunyai alel Gln27 berbanding dengan kumpulan Glu27. Penemuan ini adalah berbeza daripada penemuan terdahulunya yang melaporkan bahawa Glu27 adalah lebih berkesan untuk melindungi bronkus yang disebabkan induksi agonis. Oleh sebab kesemua enam pesakit yang mempunyai homozigos Glu27 menyerupai homozigos Gly16, penulis mencadangkan bahawa dominan Gly16, adalah lebih berkesan untuk melindungi bronkus dan kesan yang ditunjukkan oleh Glu27 pula diabaikan.

Dalam kajian lain oleh Weir *et al.*, (1998), mereka menemui bahawa prevalen alel Gln27 dan genotip Gly16/Gln27 adalah lebih tinggi dalam subkumpulan pesakit asma bukan fatal. Perkaitan yang positif antara alel Gln27 dengan asma sederhana menyokong cadangan bahawa ia dikaitkan dengan peningkatan kadar tindak balas bronkial (Hall *et al.*, 1995) dan peningkatan kepekatan IgE (Dewar *et al.*, 1997) dalam kalangan pesakit asma.

Manakala polimorfisme pada jujukan asid amino 164 adalah sangat jarang berlaku jika dibandingkan dengan polimorfisme pada asid amino 16 atau 27, yang frekuensi alelnya adalah lebih kurang 1% sahaja (Reihnsaus *et al.*, 1993). Walau bagaimanapun, kajian terhadap polimorfisme ini sangat menarik kerana asid aminonya berada pada kedudukan ke-4 dalam transmembran yang merentangi

domain reseptor adalah bersebelahan dengan serina (Ser) pada posisi 165. Ia dijangkakan mempunyai hubung kait dengan kumpulan beta karbon hidroksil pada tapak adrenergik.

Walau bagaimanapun, kajian terhadap polimorfisme ini telah dilakukan dalam sistem sel yang telah dijangkiti dan menunjukkan terdapat perubahan pengikatan agonis pada reseptor. Sel yang mengekspreskan Ile164 didapati mempunyai kira-kira empat kali kurang afiniti terhadap tapak yang mengandungi kumpulan hidroksil ini, kerana pengikatan pada tapak yang ketiadaan kumpulan hidroksil ini adalah tidak berubah (Strader *et al.*, 1989). Pengubahsuaian dalam pengikatan ini membayangkan pengurangan dalam keupayaan bagi reseptor untuk mengaktifkan AC berbanding dengan bentuk jenis semula jadi (Thr164) pada reseptor (Green *et al.*, 1993).

### **1.5.1 Kaitan klinikal polimorfisme genetik $\beta_2$ AR**

#### **1.5.1.1 Asma**

Gen  $\beta_2$ AR merupakan salah satu gen yang menarik dalam kajian terhadap penyakit asma, yang diberikan perhatian utama sebagai penanda genotip dalam penyakit ini. Bentuk polimorfik yang berbeza pada gen  $\beta_2$ AR ini menyebabkan fungsi pengikatan reseptor, pengekspressan dan kenyahupayaan reseptor berubah (Liggett, 1997; Taylor *et al.*, 2000; Erickson & Graves, 2001).

Walau bagaimanapun, hanya terdapat dua kajian sahaja yang telah berjaya menunjukkan perkaitan yang signifikan antara polimorfisme gen  $\beta_2$ AR dengan

penyakit asma. Kajian pertama telah dilakukan oleh Ohe *et al.*, (1995) yang menunjukkan bahawa *Ban1* RFLP pada gen  $\beta_2$ AR mempunyai hubungan yang signifikan dengan asma dalam subjek bangsa Jepun, sementara Hopes *et al.*, (1998) pula menemui perkaitan yang signifikan pada alel Gln27 dengan penyakit asma dalam kalangan kanak-kanak.

Penyelidik lain (Martinez *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 1998; Summerhill *et al.*, 2000) telah melaporkan bahawa tidak terdapat perbezaan dalam prevalen genotip untuk subjek pesakit asma berbanding dengan subjek bukan pesakit asma. Manakala Dewar *et al.*, (1997) pula menemui perkaitan yang signifikan antara alel Gln27 dengan tahap serum IgE yang tinggi dalam kalangan 324 ahli keluarga daripada 60 orang subjek pesakit asma. Tetapi keputusan yang sama tidak tercapai apabila kajian ini diulangi dalam populasi Itali (D'Amato *et al.*, 1998).

Dalam kajian yang dilakukan oleh Hall *et al.*, (1995), subjek yang mempunyai homozigos Glu27, dengan nyata sekali saluran udaranya adalah kurang reaktif. Dalam satu kajian yang dijalankan dalam kalangan pesakit asma di Negara China, Dai *et al.*, (2002) melaporkan bahawa polimorfisme Gly16 pada  $\beta_2$ AR lebih banyak dijumpai dalam kumpulan pesakit asma nokturnal dan ia merupakan salah satu faktor genetik yang penting dalam pengekspressan fenotip asma.

Sementara itu, Syamsu *et al.*, (2007) dalam kajiannya mendapati bahawa polimorfisme pada Gln 27 dan -20C atau -20T, mempunyai kesan terhadap tindak balas agonis  $\beta_2$ . Sekiranya kedua-dua polimorfisme ini mempunyai kombinasi dengan Arg16, ia akan mempunyai kesan yang lebih baik terhadap tindak balas agonis  $\beta_2$ .

### 1.5.1.2 Penyakit kardiovaskular

Apabila gen  $\beta_2$ AR yang mengandung alel Ile164 dan Thr164 diekspreskan dalam hati tikus transgenik, terdapat kerusakan pada pengaktifan reseptor dan tindak balas isoproterenol inotropik dan kronotropik pada jantung ditunjukkan telah berkurangan (Turki *et al.*, 1996). Dalam kajian yang berikutnya oleh Liggett, (1998) dan Wagoner *et al.*, (2000), polimorfisme pada asid amino 164 adalah jarang dijumpai untuk dikaitkan dengan keputusan yang kurang memuaskan dalam pesakit jantung dan yang mengalami kerusakan yang lebih besar dalam keupayaan masing-masing.

Beberapa kajian telah dilakukan terhadap populasi Afrika Caribbeans (Kotanko *et al.*, 1997), Caucasians (Gratze *et al.*, 1999) dan orang Eropah Utara (Timmermann *et al.*, 1998), mendapati alel Arg16Gly pada gen  $\beta_2$ AR berkait rapat dengan tekanan darah tinggi. Berlainan pula dengan satu kajian yang ditunjukkan oleh Kato *et al.*, (2001) yang membuat kesimpulan bahawa 3 polimorfisme gen  $\beta_2$ AR yang telah diuji, iaitu Arg16Gly, Gln27Glu dan Cys-47Arg, adalah tidak berkaitan dengan pesakit darah tinggi dalam populasi Jepun.

### 1.5.1.3 Kegemukan dan diabetes melitus

Reseptor beta adrenergik ( $\beta$ AR) mempunyai peranan dalam regulasi keseimbangan tenaga pada manusia. Aktiviti sistem saraf simpatetik menunjukkan bahawa ia mempunyai perkaitan dengan kegemukan dan dipercayai mempunyai relevan dengan patogenetik. Terdapat beberapa SNP dalam manusia yang dapat mengubah fungsi reseptor dan kepelbagaian ini adalah berkaitan dengan kegemukan (Liu *et al.*, 2007).

Berikutan dengan anggapan bahawa polimorfisme pada gen  $\beta_2$ AR mungkin mempunyai peranan dalam masalah kegemukan, Large *et al.*, (1997) telah melakukan genotip ke atas 140 orang wanita yang mempunyai kepelbagaian jisim lemak badan. Mereka mendapati bahawa genotip Gln27Glu mempunyai kaitan dengan kegemukan (nisbah 10.4). Polimorfisme pada Arg16Gly pula menunjukkan bahawa ia juga mempunyai kaitan dengan kegemukan. Dalam kajian lain oleh Ishiyama-Shigemoto *et al.*, (1999) terhadap 400 subjek yang tidak mengalami kegemukan dan 108 subjek yang mengalami kegemukan, didapati bahawa alel Gly16 mempunyai hubungan negatif dengan kegemukan dalam subjek wanita, manakala alel Glu27 menunjukkan bahawa ia memainkan peranan penting dalam subjek lelaki dan wanita.

Pada alel Glu27, frekuensi yang tinggi telah dijumpai dalam pesakit diabetes jenis II jika dibandingkan dengan subjek bukan diabetes (Ishiyama-Shigemoto *et al.*, 1999). Bertentangan dengan kajian-kajian di atas, Echwald *et al.*, (1998) pula melaporkan bahawa polimorfisme Glu27 tidak mempunyai kaitan dengan kegemukan dalam populasi. Kajian tersebut dijalankan berdasarkan subjek yang terdiri daripada lelaki Denmark. Kajian yang dilakukan oleh Pinelli *et al.*, (2006) pula mendapati bahawa homozigos Glu27 mempunyai frekuensi yang rendah apabila dibandingkan dengan pembawa Gln27 pada pesakit diabetes. Walau bagaimanapun, berdasarkan data yang telah diperolehi, kajian selanjutnya masih perlu dilakukan kerana berkemungkinan faktor genetik dapat mempengaruhi penyakit ini.

#### **1.5.1.4 Penyakit paru-paru fibrosis sistik**

Dalam kajian yang dijalankan oleh Buscher *et al.*, (2002), mereka mendapati pesakit fibrosis sistik yang genotipnya sama ada alel Gly16 atau Thr164Ile, pembentukan cAMP yang kebiasaannya dirangsangkan oleh isoproterenol direncat dengan ketara berbanding dengan pesakit fibrosis sistik yang homozigos pada kedua-dua alel Arg16. Data ini merupakan bukti pertama yang mencadangkan bahawa polimorfisme pada gen  $\beta_2AR$  menyumbangkan pada tahap keseriusan klinikal dan perkembangan penyakit dalam fibrosis sistik.

#### **1.6 Analisis gen $\beta_2AR$ melalui kaedah PCR**

Sehingga kini, pelbagai kaedah yang berbeza telah dihasilkan untuk mengkaji genotip gen  $\beta_2AR$ . Antara kaedah yang telah digunakan untuk menganalisis variasi genetik dalam kajian polimorfisme genetik pada gen  $\beta_2AR$  termasuklah: Polimorfisme Kepanjangkan Serpihan Pembatasan (RFLP), Oligonukleotida Spesifik Alel (ASO), Tindak balas Berantai Polimerase (PCR), Polimorfisme Konformasi Bebenang Tunggal (SSCP), “Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis” (DGGE), Analisis Pedapan Southern dan Analisis Heterodupleks. Tetapi tidak ada satu pun antara kaedah ini adalah ringkas dan dapat mengesan lima lokasi nukleotida yang polimorfik (SNPs) secara serentak dalam satu masa yang sama.

Oleh sebab itu, salah satu objektif kajian kami ialah untuk membangunkan satu kaedah yang boleh digunakan untuk mengesan lima alel pada gen  $\beta_2AR$  dalam satu masa yang sama. Justeru itu, kami telah memilih kaedah yang berasaskan PCR untuk dibangunkan. PCR ialah suatu kaedah penghasilan satu kuantiti besar serpihan



DNA daripada kuantiti kecil templat DNA secara *in-vitro* yang telah dibangunkan oleh Karry Mullis pada tahun 1986. Kaedah ini dapat mengamplifikasi satu serpihan asid nukleik sehingga berjuta-juta serpihan dalam masa beberapa jam sahaja. Ia menjadi platform penting bagi penyelesaian masalah dalam bidang-bidang tertentu seperti genetik molekul, genetik manusia, sains forensik dan biologi.

Tindak balas berantai polimerase (PCR), merupakan satu tindak balas enzim dan bahan-bahan kimia untuk membuat salinan DNA dengan menggunakan rantai DNA bebenang dua yang hendak dikaji yang diasingkan menjadi rantaian tunggal sebagai acuan. Satu rantai DNA bebenang dua yang dibuka menjadi dua acuan akan menghasilkan dua rantai DNA selepas tindak balas. Apabila proses ini diulangi beberapa kali, ia akan memberi salinan DNA sebanyak 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 dan seterusnya menjadi berjuta-juta salinan yang mencukupi untuk kajian seterusnya. Penyalinan rantai DNA adalah sangat spesifik kerana tindak balas PCR perlu dibekalkan dengan primer yang spesifik, iaitu rantai DNA pendek (lebih kurang 20 bes) yang disintesis berdasarkan jujukan DNA yang diingini, sebagai pemulaan penyalinan DNA secara PCR. Kaedah ini juga dapat mengamplifikasi suatu jujukan sasaran daripada campuran RNA atau DNA. Saiz serpihan yang dihasilkan oleh PCR boleh mencapai sehingga 10 kb panjang. Oleh itu, ia dikatakan mempunyai kelebihan yang tersendiri berbanding dengan kaedah-kaedah lain sepertimana yang telah dinyatakan sebelumnya.

Tindak balas berantai polimerase (PCR) ialah tindak balas yang kompleks tetapi hanya melibatkan sedikit sahaja reagen. Pada amnya, ia melibatkan sejumlah kecil jujukan DNA (nmol). Campuran tindak balas ini juga mengandungi dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), primer, penampan PCR dan garam  $Mg^{2+}$ , serta

polimerase *Taq* DNA dalam volum akhir 25 – 100  $\mu$ l. Kemudian amplifikasi PCR dilakukan dan tindak balas terdiri daripada beberapa peringkat. Hal ini merangkumi peringkat penyahaslian templat DNA pada suhu 94°C untuk 30 saat, penyepuhlindungan primer pada 55°C selama 30 saat dan pemanjangan pada 72°C selama 60 saat. Amplifikasi ini adalah sesuai untuk sasaran yang kurang daripada 500 bp. Jumlah kitaran yang digunakan ialah 30 kitaran. Kecekapan purata suatu kitaran PCR dapat diterangkan dengan formula seperti di bawah;

$$N = n (1+E)^c$$

yang mana N = kuantiti akhir hasil

n = kuantiti sasaran

E = kecekapan amplifikasi

<sup>c</sup> = jumlah kitaran PCR

Campuran reagen yang kebiasaannya mengandungi dNTP, primer, penampakan PCR, garam  $Mg^{2+}$  dan polimerase *Taq* DNA akan dicampurkan dalam satu tiub dan kitaran akan berulang termasuklah proses penyahaslian, penyepuhlindungan primer dan pemanjangan primer oleh enzim.

Polimerase *Taq* DNA merupakan enzim yang lazim digunakan dalam sistem PCR pada masa ini. Ia bersifat termo stabil iaitu tahan terhadap suhu yang tinggi (94 - 95°C). Penggunaan sistem yang melibatkan enzim ini akan menjamin penghasilan produk amplifikasi yang lebih tinggi, jitu dan spesifik. Kepekatan piawai bagi enzim polimerase *Taq* DNA ialah 1 – 5 U. Namun bagi kebanyakan ujian PCR, unit optimum bagi enzim adalah 0.5 – 2.5 U untuk volum akhir 50  $\mu$ l (Rolf's *et al.*, 1992).

Peningkatan dalam kepekatan enzim dalam ujian PCR kadang-kala boleh menyebabkan penghasilan produk PCR yang tidak spesifik dan merendahkan produk DNA sasaran (penurunan darjah spesifisiti).

Manakala kepekatan garam  $Mg^{2+}$  dalam ujian PCR pula mempunyai kesan yang jelas ke atas spesifisiti dan hasil amplifikasi yang akan diperolehi. Garam  $Mg^{2+}$  boleh mempengaruhi aktiviti enzim dengan meningkatkan suhu ( $T_m$ ) bebenang ganda dua DNA. Ia membentuk kompleks larut dengan dNTP untuk membentuk substrat sebenar yang akan dikenal pasti oleh enzim polimerase. Beberapa kajian penyelidikan telah melaporkan tentang kesan kepekatan garam  $Mg^{2+}$  yang berbeza ke atas PCR (McPherson *et al.*, 1991). Secara amnya, jumlah garam  $Mg^{2+}$  yang berlebihan akan menyebabkan akumulasi produk PCR yang tidak spesifik manakala kekurangannya akan menyebabkan jumlah produk yang rendah terhasil. Jumlah kepekatan optimum bagi garam  $Mg^{2+}$  boleh berbeza dari 0.5 - 5.0 mM. Biasanya kepekatan garam  $Mg^{2+}$  adalah 1.5 mM tetapi dalam sesetengah keadaan, kepekatan garam  $Mg^{2+}$  yang berbeza diperlukan. Walau bagaimanapun, kepekatan garam  $Mg^{2+}$  yang tepat perlu ditentukan secara empirikal kerana kepekatan optimum adalah berbeza bagi setiap jenis tindak balas PCR.

Tindak balas berantai polimerase (PCR) akan menghasilkan saiz serpihan yang tertentu. Serpihan ini dapat dikesan dengan menjalankan elektroforesis gel agarosa. Dengan membuat analisis gel ini, kita dapat melihat sama ada tindak balas PCR berjaya atau sebaliknya dengan melihat saiz serpihan yang hadir pada gel dan menentukan sama ada keseluruhan eksperimen dapat diinterpretasi atau sebaliknya (Rolfs *et al.*, 1992).

Elektroforesis melalui gel agarosa dengan arus elektrik merupakan satu teknik yang digunakan untuk memisahkan campuran rantai DNA. Molekul DNA adalah bercas negatif dan akan bergerak ke elektrod positif di medan elektrik semasa elektroforesis. DNA yang lebih kecil saiznya adalah lebih mudah melalui gel agarosa dan akan bergerak lebih cepat. Dengan itu corak jalur DNA yang berdasarkan saiz atau panjang rantai DNA akan terbentuk.

Elektroforesis gel agarosa adalah suatu kaedah yang biasanya digunakan untuk menganalisis serpihan DNA yang mempunyai saiz antara 0.1 - 2.5 kb. Etidium bromida (EthBr) akan ditambahkan ke dalam gel bagi membenarkan gel dapat diperhatikan di bawah cahaya ultra ungu. Dalam kajian ini, TBE telah dipilih sebagai penampan elektroforesis berbanding dengan TAE, kerana penampan TAE mempunyai kapasiti yang rendah dan lebih senang meruap semasa elektroforesis. Penanda DNA yang saiznya telah diketahui digunakan untuk mengenal pasti saiz DNA yang tidak diketahui.

Kepekatan gel agarosa yang digunakan bergantung pada saiz serpihan DNA yang ingin dianalisis. Kepekatan gel agarosa yang rendah digunakan untuk pengasingan serpihan DNA yang besar, manakala kepekatan gel agarosa yang tinggi digunakan untuk pengasingan serpihan DNA yang kecil (Sambrook *et al.*, 2001).

Ujian yang telah dihasilkan dikenali sebagai ujian PCR multipleks spesifik alel. Diharapkan ujian ini dapat digunakan dalam kajian-kajian mengenal pasti kesan variasi gen  $\beta_2AR$  dalam farmakoterapi untuk asma dan juga penyakit-penyakit lain pada masa akan datang, di samping meningkatkan lagi kefahaman tentang satu-satu penyakit dan cara-cara pengendalian rawatannya.