



Prediksi Mekanisme Kerja Whey Protein Sebagai Suplemen Anti-Diabetes dan Anti-Obesitas Berdasarkan Analisis *Differentially Genes Expressed* (DEG) Inflamasi

Siti Nurbaya¹, Aryo Tedjo²

Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Email: sitinurbaja01@gmail.com

ABSTRAK

Kata Kunci:

Differentially Genes Expressed; Obesity; Type-2 Diabetes; Inflammation; Whey Protein

Obesitas sering dikaitkan dengan inflamasi, yang memicu pelepasan mediator inflamasi dan menurunkan produksi adiponektin. Beberapa teori menyebutkan bahwa peradangan kronis akibat obesitas merupakan mekanisme dominan diabetes tipe 2 (T2D). Penelitian ini melakukan analisis *Differentially Genes Expressed* (DEG) terkait inflamasi menggunakan basis data Gene Expression Omnibus (GEO) untuk melihat perubahan transkripsi (ekspresi gen) pada hati manusia yang berkontribusi pada akumulasi lipid hati dan resistensi insulin terkait T2D. DEG yang dihasilkan kemudian digunakan untuk melihat apakah *whey protein* (WP) dapat mempengaruhi DEG tersebut. Konsumsi WP dipercaya dapat menurunkan kelebihan berat badan dan kadar gula darah. Hasil analisis DEG menunjukkan terdapat 22 gen terkait inflamasi pada liver yang berbeda ekspresinya antara Lean dengan kelompok pasien obesitas tanpa T2D (*Obese_noT2D*) dan dengan kelompok pasien obesitas dengan T2D yang tidak terkontrol (*Obese_T2D-poorly controlled*). Berdasarkan penelitian ini, tidak satu-pun gen-gen tersebut yang dipengaruhi oleh asupan WP. Namun demikian beberapa gen yang diduga berperan dalam inflamasi, obesitas, dan T2D seperti FOXJ1, NLRP1, LGALS2, LIME1, NOTCH3, ARBB2, SIM2, dan TAT berpotensi dipengaruhi oleh asupan WP.

Keywords:

Differentially Genes Expressed, Obesity; Type-2 Diabetes; Inflammation; Whey Protein

ABSTRACT

Obesity is often associated with inflammation, which triggers the release of inflammatory mediators and decreases adiponectin production. Some theories suggest that chronic inflammation due to obesity is the dominant mechanism of type 2 diabetes (T2D). This study conducted an analysis of inflammation-related *Differentially Expressed Genes* (DEG) using the Gene Expression Omnibus (GEO) database to look at transcriptional changes (gene expression) in the human liver that contribute to liver lipid accumulation and T2D-related insulin resistance. The resulting DEG was then used to see if whey protein (WP) could affect the DEG. WP consumption is believed to reduce excess weight and blood sugar levels. The results of DEG analysis showed that there were 22 genes related to inflammation in the liver that differed in expression between Lean and obese patients without T2D (*Obese_noT2D*) and obesity patients with T2D (*Obese_T2D-poorly controlled*). Based on this study, none of these genes are affected by WP intake. However, several genes that are suspected to play a role in inflammation, obesity, and T2D such as FOXJ1, NLRP1, LGALS2, LIME1, NOTCH3, ARBB2,

Corresponden Author: Siti Nurbaya

Email: sitinurbaja01@gmail.com

Artikel dengan akses terbuka dibawah lisensi



Pendahuluan

Diabetes ditandai dengan beberapa komplikasi patofisiologis termasuk hiperglikemia, resistensi insulin, dan gangguan homeostasis energi karena gangguan metabolisme glukosa dan lipid (D. Das dkk., 2022). Diabetes terutama diabetes tipe 2 (T2D) sering dikaitkan dengan obesitas, dimana 90% orang dengan T2D mengalami kelebihan berat badan atau obesitas (Salehpour dkk., 2021). Diabetes juga dapat dikaitkan dengan inflamasi. Sekitar setengah dari semua orang dewasa dengan diabetes diketahui menderita radang sendi (Piva dkk., 2015). Orang dengan radang sendi memiliki risiko 61% lebih tinggi terkena diabetes daripada mereka yang tidak memiliki penyakit ini (Watson, 2022). Di sisi lain, obesitas juga sering dikaitkan dengan inflamasi. Kelebihan makronutrien dalam jaringan adiposa merangsang melepaskan mediator inflamasi seperti faktor nekrosis tumor α (TNFA) dan interleukin 6 (IL6), serta mengurangi produksi adiponektin, yang merupakan predisposisi ke keadaan pro-inflamasi dan stres oksidatif (Ellulu dkk., 2017).

Salah satu teori menyebutkan peradangan sistemik kronis yang disebabkan oleh obesitas merupakan mekanisme dominan T2D. Teori ini didukung oleh banyak temuan dan bukti klinis bahwa penanda inflamasi seperti CRP, TNFA, dan IL6 meningkat ekspresinya pada subjek obesitas dan subyek dengan resisten insulin (U. N. Das & Rao, 2007; Molina-Ayala dkk., 2022). Adapun studi analisis ekspresi gen pada jaringan adiposa omental dari pasien operasi bariatrik dilakukan oleh Molina-Ayala dkk. (2022) menunjukkan VEGFA, CCND2, IL1R1 dan PTEN mengalami downregulasi dalam kelompok obesitas dengan T2D. Hasil analisis *Gene Ontology (GO) biological process* menunjukkan VEGFA, CCND2 dan PTEN berperan dalam regulasi fosforilasi protein. Fosforilasi adalah reaksi biokimia mendasar yang memodulasi aktivitas protein dalam sel. Fosforilasi diketahui memainkan peran penting dalam pengaturan sistem kekebalan tubuh (Sadreev dkk., 2014). Selain itu fosforilasi diketahui juga memainkan peran penting dalam mengatur kematian sel inflamasi (Xu & Huang, 2022).

Ekspresi gen diferensial (DEG) penting untuk memahami perbedaan biologis antara keadaan sehat dan sakit. Identifikasi gen yang terlibat dalam penyakit adalah alat penting untuk mengungkapkan mekanisme molekuler perkembangan penyakit. Dalam penelitian farmasi dan klinis, DEG juga berharga untuk menentukan kandidat biomarker, target terapeutik, dan tanda tangan gen untuk diagnostik (Rodriguez-Esteban & Jiang, 2017). Selain analisis DEG gen individu, analisis gen-gen yang diekspresikan secara bersama juga penting untuk melihat korelasi atau hubungan pengaturan yang membedakan keadaan sehat dan sakit. Dengan menggunakan logika yang sama, jejaring antar-penyakit juga dapat dianalisis dengan melihat kesamaan gen-gen yang diekspresikan antar-fenotip atau penyakit-penyakit yang diduga saling berhubungan. Berdasarkan penjelasan di atas, kesamaan perubahan profil gen-gen yang diekspresikan terkait

diabetes, obesitas, dan inflamasi akibat efek terapi tertentu dengan demikian dapat digunakan untuk mengevaluasi suatu kandidat agen anti-diabetes. Pendekatan analisis multi-target ekspresi gen berbasis jejaring hubungan *antar-fenotip* (diabetes-obesitas-inflamasi) diharapkan juga memberikan wawasan atau penjelasan yang luas terkait mekanisme kerja suatu kandidat agen anti-diabetes.

Dalam penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen terkait diabetes-obesitas-inflamasi pada basis-data *Gene Expression Omnibus* (GEO) sebagai efek pemberian whey protein (WP) baik pada model *invivo* maupun human. Penelitian sebelumnya oleh Smith dkk. (2022) pada subyek orang dengan T2D yang diberikan 15gram WP 10 menit sebelum sarapan, makan siang, dan makan malam selama tujuh hari dan tetap menggunakan obat diabetes yang diresepkan memiliki kadar glukosa darah harian 0.6 mmol/L lebih rendah ($P < 0.05$) dibandingkan subyek plasebo. Konsumsi WP juga tampak membantu partisipan berada dalam kondisi euglikemia dua jam lebih lama. Euglikemia merupakan kondisi di mana kadar gula darah berada pada level normal. Adapun meta-analisis dari 9 uji coba kontrol acak (RCT) yang dilakukan oleh Wirunsawanya dkk. (2018) untuk mengevaluasi efek konsumsi WP pada individu yang kelebihan berat badan dan obesitas menunjukkan pengurangan berat badan, massa lemak, dan massa tanpa lemak yang signifikan. Selain itu ada perbaikan dalam beberapa faktor risiko CVD termasuk tingkat tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, glukosa, lipoprotein densitas tinggi, dan kolesterol. Berdasarkan paparan di atas menarik untuk diketahui gen-gen apa saja yang dipengaruhi ekspresinya akibat pemberian WP (terutama yang terkait inflamasi) sehingga diharapkan dapat lebih menjelaskan potensi WP sebagai kandidat suplemen anti-diabetes dari sisi mekanisme kerjanya.

Metode Penelitian

Data gen-gen yang terkait inflamasi diperoleh dari basis data KEGG hsa04062 (*Chemokine signaling pathway - Homo sapiens*), KEGG hsa04932 (*Non-alcoholic fatty liver disease - Homo sapiens*), dan hasil studi oleh Diedisheim dkk. (2020) terkait gen manusia yang paling relevan dan terlibat dalam respons inflamasi yang berhubungan dengan diabetes tipe 2 (T2D). Analisis DEG gen-gen yang berhubungan dengan inflamasi dilakukan pada data GSE15653 yang diperoleh dari basis data GEO. GSE15653 berisi data perubahan transkripsi (ekspresi gen) pada hati manusia yang berkontribusi pada akumulasi lipid hati dan resistensi insulin terkait T2D. Adapun respon perubahan ekspresi gen terkait inflamasi akibat pemberian WP diamati pada data GSE178584 yang diperoleh dari basis data GEO. GSE178584 berisi data perubahan ekspresi gen sel HepG2 yang diberikan serum manusia yang diambil sebelum (fasting, F) dan 60 menit setelah asupan WP.

DEG yang diperoleh digunakan untuk melihat interaksi protein-protein terkait inflamasi yang telah diketahui dan diprediksi menggunakan database STRING (2023) (<https://string-db.org/>). Interaksi tersebut meliputi asosiasi langsung (fisik) dan tidak langsung (fungsional). Database STRING berasal dari prediksi komputasi, transfer pengetahuan antar organisme, dan dari interaksi yang dikumpulkan dari database (primer) lainnya. DEG yang diperoleh kemudian digunakan untuk mengelompokkan sample lean, obesitas, dan T2D dengan *Principal component analysis* (PCA) dan divalidasi dengan *Neural network* menggunakan Orange (<https://orangedatamining.com/>).

Tabel 1 Gen-gen terkait inflamasi berdasarkan 5 (lima) mekanisme kerja atau pathway

Type 2 diabetes	Source
Cytokine-induced	
IFNGR1, JAZF1, MACROD1, MAPK8IP1, NFE2L3, ST6GAL1	Diedisheim et al (2020) ¹³
TREG/T regulation	
CMIP, KLF14, MAP3K1, NLRC3, PTPRJ	Diedisheim et al (2020) ¹³
M1/M2 polarisation	
IFNGR1, MAEA, PPARG	Diedisheim et al (2020) ¹³
Chemokine signaling pathway	
CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, PPBP, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL16, PF4, PF4V1, CXCL14, XCL1, XCL2, CX3CL1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L2, CCL4L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL23, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCR2, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, XCR1, CX3CR1, CCR8, CCR6, CCR9, CCR4, CCR7, CCR2, CCR5, CCR1, CCR3, CCR10, JAK2, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, GNAI1, GNAI3, GNAI2, ADCY1, ADCY2, ADCY3, ADCY4, ADCY5, ADCY6, ADCY7, ADCY8, ADCY9, PRKACA, PRKACB, PRKACG, LYN, HCK, FGR, SRC, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, GRB2, SOS1, SOS2, HRAS, KRAS, NRAS, RAF1, BRAF, MAP2K1, MAPK1, MAPK3, PIK3CA, PIK3CD, PIK3CB, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3CG, PIK3R5, PIK3R6, PRKCZ, AKT1, AKT2, AKT3, FOXO3, CHUK, IKBKB, IKBKG, NFKBIA, NFKBIB, NFKB1, RELA, BAD, GSK3A, GSK3B, ITK, VAV3, VAV1, VAV2, RAC1, RAC2, RAC3, PAK1, CDC42, WAS, RHOA, ROCK1, ROCK2, GNB1, GNB2, GNB3, GNB4, GNB5, GNG2, GNG3, GNG4, GNG5, GNG7, GNG8, GNG10, GNG11, GNG12, GNG13, GNGT1, GNGT2, PREX1, ELMO1, DOCK2, PTK2, PXN, BCAR1, CRK, CRKL, PTK2B, GNAQ, PLCB1, PLCB2, PLCB3, PLCB4, PLCG1, PLCG2, RASGRP2, RAP1A, RAP1B, PARD3, TIAM1, PRKCB, PRKCD, NCF1, GRK7, GRK1, GRK2, GRK3, GRK4, GRK5, GRK6, ARRB1, ARRB2	KEGG hsa04062
Non-alcoholic fatty liver disease	
IL6, IL6R, SOCS3, TNF, TNFRSF1A, NFKB1, RELA, INS, INSR, IRS1, IRS2, PIK3CA, PIK3CD, PIK3CB, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, AKT1, AKT2, AKT3, GSK3A, GSK3B, NR1H3, RXRA, SREBF1, MLX, MLXIP, MLXIPL, PKLR, LEP, LEPR, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG3, PRKAG2, MAPK11, MAPK12, MAPK13, MAPK14, PPARA, PPARG, CDC42, RAC1, MAP3K11, MAPK8, MAPK10, MAPK9, ITCH, ERN1, TRAF2, MAP3K5, FOS, JUN, IL1A, IL1B, IKBKB, XBP1, CEBPA, CYP2E1, FASLG, CXCL8, TGFB1, EIF2AK3, EIF2S1, ATF4, DDIT3, BCL2L11, BAX, FAS, CASP8, BID, CYCS, CASP3, CASP7, NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA4L2, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA7, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFAB1, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFB10, NDUFB11, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFC1, NDUFC2, NDUFC2-KCTD14, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, UQCRFS1, CYTB, CYC1, UQCRC1, UQCRC2, UQCRH, UQCRHL, UQCRB, UQCRQ, UQCR10, UQCR11, COX3, COX1, COX2, COX4I2, COX4I1, COX5A, COX5B, COX6A1, COX6A2, COX6B1, COX6B2, COX6C, COX7A1, COX7A2, COX7A2L, COX7B, COX7B2, COX7C, COX8C, COX8A	KEGG hsa04932

Hasil Dan Pembahasan

Hasil

Gen-gen terkait inflamasi yang diperoleh dari basis data KEGG dan studi oleh Diedisheim dkk. (2020) dapat dilihat pada Tabel 1. Total terdapat 344 gene terkait inflamasi dengan 5 (lima)

mekanisme kerja: Cytokine-induced, TREG/T regulation, M1/M2 polarisation, Chemokine signaling pathway, dan Non-alcoholic fatty liver disease yang memicu steatohepatitis yang lebih parah dengan peradangan hati dan fibrosis atau nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Ke-344 gene tersebut selanjutnya dilihat perubahan ekspresinya pada pasien obesitas atau pasien obesitas dengan T2D terutama pada kondisi tidak terkontrol yang dibandingkan dengan subyek normal (lean). Untuk itu dilakukan analisis differentially expressed genes (DEG) pada data GSE15653 dengan hasil tertera pada Tabel 2 (Lean vs Obese_noT2D) dan Table 3 (Lean vs Obese_T2D-poorly controlled)

Pada Tabel 2 terlihat bahwa terdapat 39 DEG terkait inflamasi di antara subyek Lean dan pasien obese ($P < 0.05$ atau $-\log_{10}P > 0.301$). Dari 39 DEG tersebut terdapat 16 gen yang mengalami down-regulasi ($-\log_2[\text{foldchange}] < 0$) pada subyek Lean dibandingkan pasien Obese_noT2D, sedangkan 23 gen lainnya mengalami up-regulasi ($-\log_2[\text{foldchange}] > 0$). Tabel 3 berisi daftar 62 DEG terkait inflamasi antara subyek normal (lean) terhadap Obese_T2D-poorly controlled ($P < 0.05$ atau $-\log_{10}P > 0.301$). Di antara 62 gen tersebut 25 gen mengalami down-regulasi ($-\log_2[\text{foldchange}] < 0$), dan 37 gen mengalami up-regulasi ($-\log_2[\text{foldchange}] > 0$). Jika DEG Lean vs Obese_noT2D dibandingkan dengan DEG Lean vs Obese_T2D-poorly controlled, maka didapatkan 22 sharing-DEG yang regulasinya konsisten seperti dapat dilihat pada Tabel 4. Dari 22 DEG tersebut 7 gen adalah gen yang terkait inflamasi jalur Non-alcoholic fatty liver disease dan terdapat 15 gen yang terkait Chemokine signaling pathway.

Tabel 2 DEG terkait inflamasi: Lean vs Obese_noT2D (GSE15653)

No.	Gene symbol	log2(fold change)	-log10(Pvalue)	No.	Gene symbol	log2(fold change)	-log10(Pvalue)
1	BAX	-2.263	2.467	21	GNAI3	0.793	1.897
2	TGFB1	-1.718	2.779	22	GNG10	0.821	1.387
3	RAC2	-1.7	1.8	23	FAS	0.832	1.335
4	ADCY9	-1.673	2.493	24	GNAI1	0.876	1.396
5	GRK2	-1.591	1.326	25	RAP1A	0.952	1.324
6	BAD	-1.564	1.686	26	CCL13	0.954	1.786
7	SRC	-1.414	1.959	27	SOS2	0.968	1.585
8	CRK	-1.257	1.465	28	UQCRB	0.984	1.835
9	GNG7	-1.138	1.403	29	CASP8	1.064	2.008
10	PLCB2	-1.112	1.678	30	CCR4	1.077	1.315
11	PLCB3	-1.091	1.481	31	CCR2	1.143	1.33
12	FGR	-1.025	1.427	32	IRS2	1.145	2.162
13	GNB2	-0.968	2.097	33	ROCK1	1.227	1.867
14	HRAS	-0.921	1.467	34	MAP3K5	1.257	1.697
15	GRK5	-0.672	1.364	35	JUN	1.331	1.471
16	NFE2L3	-0.606	1.343	36	CXCR4	1.685	1.381
17	RAP1B	0.693	1.976	37	PRKAA1	1.801	1.494
18	COX7A2L	0.696	1.982	38	JAK2	2.772	2.438
19	STAT1	0.729	1.363	39	NDUFA2	2.963	3.166
20	NDUFB3	0.792	1.957				

Interaksi protein/gen dari ke-22 DEG pada Tabel 4 dapat dilihat pada Gambar 1. Kluster dihasilkan dari basis data STRING (<https://string-db.org/>), dimana garis (edge) melambangkan interaksi protein secara fisik dan fungsional dengan interaction score high confidence (0.700). Kluster C1 terdiri dari gen CASP8, MAP3K5, dan FAS yang ketiganya adalah gen inflamasi terkait jalur Non-alcoholic fatty liver disease. Kluster C2 terdiri dari JUN yang merupakan gen yang terkait Non-alcoholic fatty liver disease, serta RAC2, ROCK1, GNB2, GNG7, FGR, CRK, JAK2, RAP1A, dan SRC yang merupakan

gen-gen inflamasi terkait Chemokine signaling pathway. Adapun kluster C3 terdiri dari IRS2 (jalur Non-alcoholic fatty liver disease) serta GNAI3, GNAI1, SOS2, dan HRAS (Chemokine signaling pathway). Kluster C2 adalah kluster central dimana SRC (kotak merah) merupakan gen atau protein yang diduga berperan penting sebagai jembatan antar-kluster.

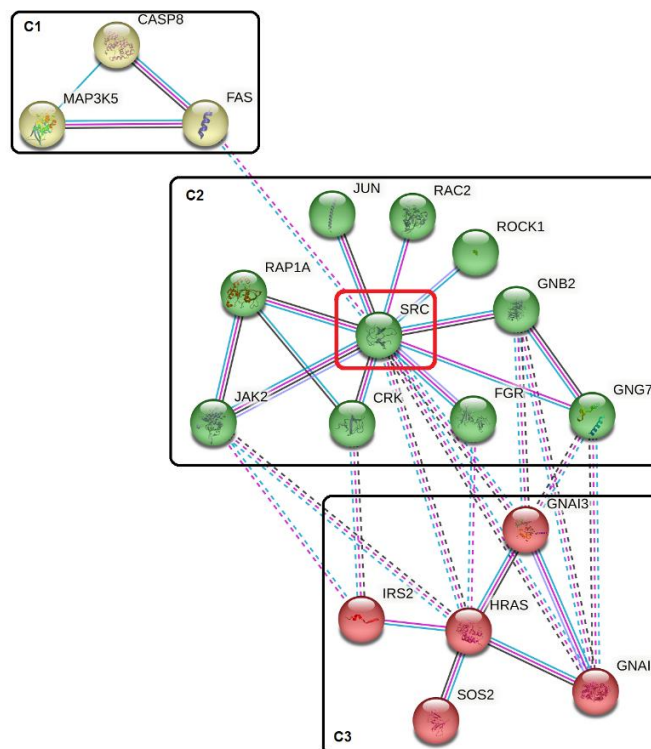
Tabel 3 DEG terkait inflamasi: Lean vs Obese_T2D poorly-controlled

No.	Gene symbol	log2(fold change)	- log10(Pvalue)	No.	Gene symbol	log2(fold change)	- log10(Pvalue)
1	TRAF2	-2.468	2.233	32	IL1B	0.932	1.38
2	GNB5	-2.366	2.578	33	SOS1	0.937	1.841
3	BAX	-2.364	2.612	34	CASP8	1.001	1.851
4	CRK	-1.947	2.629	35	PTPRJ	1.011	1.513
5	BAD	-1.928	2.233	36	GNAI1	1.07	1.833
6	RELA	-1.711	2.935	37	RAP1A	1.09	1.592
7	SRC	-1.695	1.895	38	SOS2	1.108	1.904
8	MAPK3	-1.683	1.539	39	ST6GAL1	1.113	1.646
9	GRK2	-1.657	1.402	40	IRS2	1.134	2.135
10	RAC2	-1.562	1.605	41	ROCK1	1.184	1.78
11	GRK4	-1.543	1.461	42	PTK2B	1.221	1.663
12	GNB2	-1.496	3.643	43	MAP3K5	1.245	1.675
13	STAT3	-1.375	1.565	44	CCR9	1.268	1.652
14	GNG7	-1.278	1.643	45	FASLG	1.269	1.714
15	ARRB2	-1.274	1.46	46	FAS	1.27	1.745
16	VAV2	-1.267	1.416	47	CX3CR1	1.431	1.879
17	CXCR3	-1.146	1.788	48	CXCL2	1.435	2.435
18	PPARA	-1.103	1.35	49	JAK3	1.451	2.881
19	FGR	-1.09	1.552	50	CCL23	1.473	1.383
20	NDUFV1	-0.998	1.851	51	MAPK8	1.505	2.208
21	SHC1	-0.977	1.442	52	MAPK8IP1	1.556	1.442
22	HRAS	-0.903	1.426	53	KRAS	1.63	2.205
23	NDUFV2	-0.8	1.32	54	JUN	1.727	3.806
24	GNB1	-0.799	1.568	55	COX5B	1.831	1.696
25	GNAI2	-0.793	1.346	56	CCR3	2.057	1.797
26	RAC1	0.638	1.383	57	JAK2	2.084	1.665
27	GNAI3	0.829	2.015	58	PLCB4	2.272	2.045
28	PTK2	0.914	1.583	59	NRAS	2.345	2.652
29	TIAM1	0.922	1.588	60	PLCB1	2.38	2.364
30	DDIT3	0.928	1.703	61	NDUFA2	2.43	2.462
31	LEP	0.931	1.553	62	CCL7	2.569	3.035

Tabel 4 Share-DEG terkait Inflamasi

Gene symbol	Lean vs Obese_noT2D	Lean vs Obese_T2D-poorly controlled	Inflammatory mechanism in:
BAX	down	down	Non-alcoholic fatty liver
CRK	down	down	Chemokine signaling
BAD	down	down	Chemokine signaling
SRC	down	down	Chemokine signaling
GRK2	down	down	Chemokine signaling
RAC2	down	down	Chemokine signaling
GNB2	down	down	Chemokine signaling
GNG7	down	down	Chemokine signaling
FGR	down	down	Chemokine signaling
HRAS	down	down	Chemokine signaling
GNAI3	up	up	Chemokine signaling

CASP8	up	up	Non-alcoholic fatty liver
GNAI1	up	up	Chemokine signaling
RAP1A	up	up	Chemokine signaling
SOS2	up	up	Chemokine signaling
IRS2	up	up	Non-alcoholic fatty liver
ROCK1	up	up	Chemokine signaling
MAP3K5	up	up	Non-alcoholic fatty liver
FAS	up	up	Non-alcoholic fatty liver
JUN	up	up	Non-alcoholic fatty liver
JAK2	up	up	Chemokine signaling
NDUFA2	up	up	Non-alcoholic fatty liver

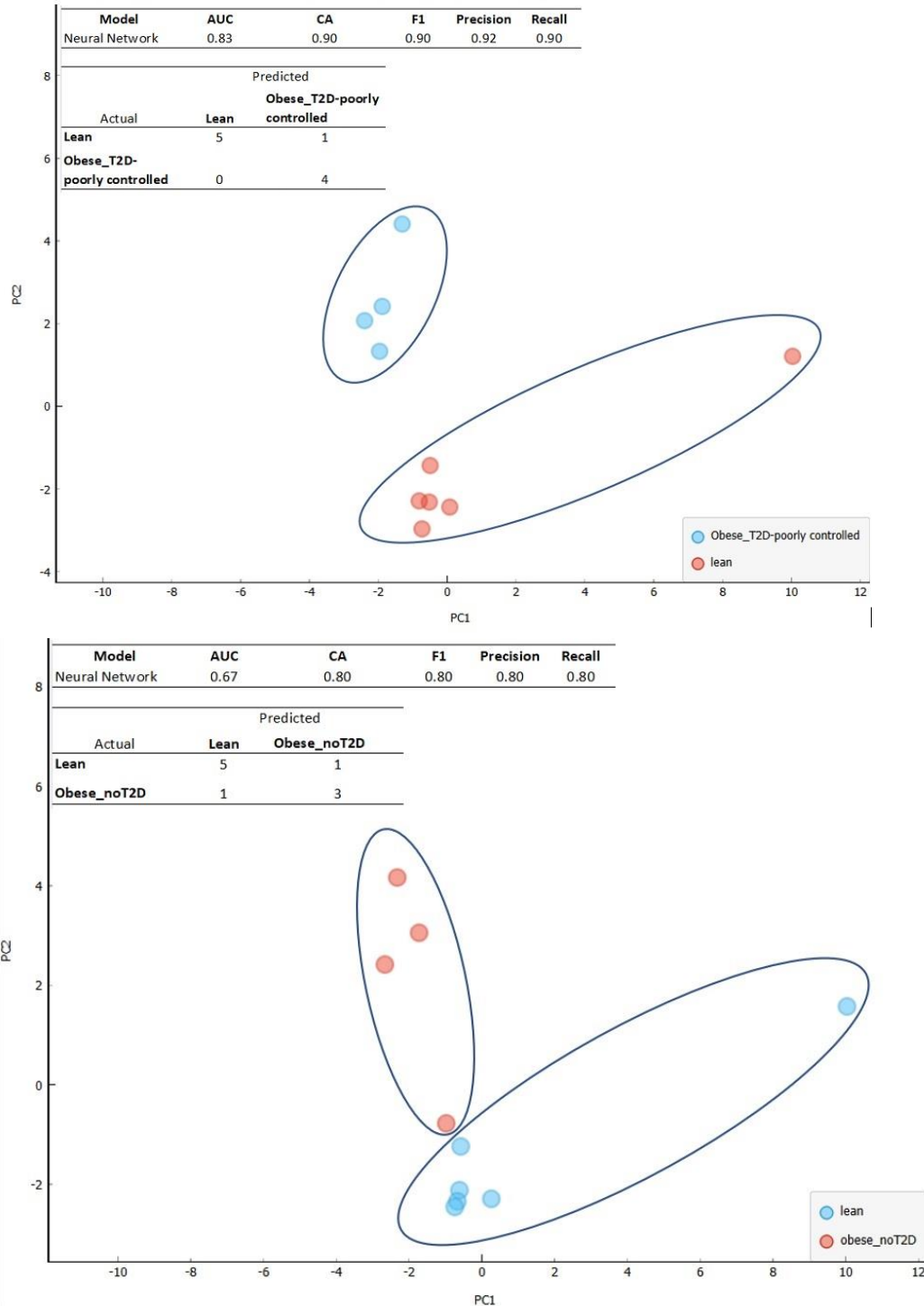


Gambar 1 Interaksi DEG inflamasi terkait obesitas dan T2D

Pengelompokkan sample lean, obesitas, dan T2D berdasarkan ke-22 DEGs yang dilakukan dengan Principal component analysis (PCA) dan divalidasi dengan Neural network menggunakan Orange (<https://orangedatamining.com/>) dapat dilihat pada Gambar 2. Analisis PCA menunjukkan bahwa kelompok Lean vs Obese_noT2D, dan Lean vs Obese_T2D-poorly controlled cukup dapat dipisahkan oleh ke-22 DEG pada Tabel 4. Walaupun terlihat bahwa Lean dapat dipisahkan dengan lebih baik dari Obese_T2D-poorly controlled dibandingkan dengan Obese_noT2D. Hal tersebut sesuai dengan nilai Area Under-Curved (AUC) dimana AUC Lean vs Obese_T2D-poorly controlled lebih besar (0.83) dibandingkan Lean vs Obese_noT2D (0.67).

Untuk menentukan apakah WP berpotensi mempengaruhi ekspresi 22 DEG inflamasi terkait obesitas dan T2D, maka akan dilihat ekspresi gen-gen tersebut pada sel HepG2 yang diberikan serum darah manusia yang diambil sebelum (fasting, WP_F) dan 60 menit (WP_60) setelah asupan WP (GSE178584). Perubahan ekspresi ke-22 gen WP_60 vs WP_F dapat dilihat pada Tabel 5. Pada Tabel 5 terlihat bahwa beberapa gen yaitu CRK, BAD, SRC, GRK2, GNB2, GNG7, HRAS, dan BAX mengalami down-regulasi setelah asupan WP sebagaimana halnya pada subyek Lean jika dibandingkan dengan pasien obese_noT2D maupun pasien obese_T2D-poorly

controlled. Namun demikian, tidak satupun gen yang memiliki perbedaan ekspresi signifikan ($P > 0.05$) pada sel HepG2 yang diberikan serum manusia sebelum (WP_F) dan setelah (WP_60) asupan WP. Selain itu beberapa gen (11 gen) memiliki ekspresi berkebalikan dengan profil Lean vs Obese_noT2D maupun Lean vs ObeseT2D-poorly controlled.



Gambar 2 Analisis PCA dan validasi (A) Lean vs Obese_noT2D dan (B) Lean vs Obese_T2D-poorly controlled

Tabel 5 Perubahan ekspresi gen terkait inflamasi pada sel HepG2 (WP_F vs WP_60) dibandingkan Lean vs Obese_noT2D dan Lean vs Obese_T2D-poorly controlled

Gene symbol	WP_60 vs WP_F	P value (WP_60 vs WP_F)	Lean vs Obese_noT2D/T2D-poorly controlled
CRK	down	0.124	down
BAD	down	0.299	down
SRC	down	0.153	down
GRK2	down	0.147	down
GNB2	down	0.159	down
GNG7	down	0.071	down
HRAS	down	0.163	down
GNAI3	down	0.259	up
GNAI1	down	0.214	up
RAP1A	down	0.062	up
SOS2	down	0.238	up
ROCK1	down	0.260	up
JAK2	down	0.278	up
BAX	down	0.105	down
CASP8	down	0.086	up
IRS2	down	0.224	up
FAS	down	0.238	up
JUN	down	0.142	up
NDUFA2	down	0.224	up

Dikarenakan asupan WP tidak signifikan mempengaruhi DEG terkait inflamasi, maka akan dilihat gen-gen apa saja di luar 22 gen tersebut (baik yang terkait inflamasi maupun yang tidak) yang berpotensi diubah signifikan karena asupan WP. Hasil pencarian tersebut tersaji pada Tabel 6. Pada Tabel 6 terlihat bahwa 5 DEG WP_60 vs WP_F yaitu FOXJ1, NLRP1, LGALS2, LIME1, NOTCH3 memiliki kemiripan profile ekspresi gen dengan Lean vs Obese_noT2D, sedangkan 4 DEG yaitu FOXJ1, ARRB2, SIM2, dan TAT memiliki kemiripan profile ekspresi gen dengan Lean vs ObeseT2D-poorly controlled. Peran DEG terkait asupan WP dengan inflamasi, obesitas, dan T2D tersaji pada Tabel 7.

Tabel 6 DEG sel HepG2 (WP_F vs WP_60) dibandingkan Lean vs Obese_noT2D dan Lean vs Obese_T2D-poorly controlled

Gene		WP_60 vs WP_F			
		log2(fold change)	log10(Pvalue)	log2(fold change)	log10(Pvalue)
FOXJ1	Lean vs Obese_noT2D	-1.806 (down)	3.113	-0.814 (down)	1.284
NLRP1		-1.254 (down)	1.622	-1.029 (down)	1.377
LGALS2		-1.165 (down)	1.503	-0.427 (down)	1.481
LIME1		-0.847 (down)	1.386	-0.677 (down)	1.469
NOTCH3		1.524 (up)	2.379	0.920 (up)	1.886
FOXJ1	Lean vs Obese_T2D-poorly controlled	-1.568 (down)	2.604	-0.814 (down)	1.284
ARRB2		-1.274 (down)	1.46	-0.362 (down)	1.357
SIM2		1.595 (up)	1.508	0.384 (up)	1.770
TAT		2.154 (up)	2.066	0.161 (up)	1.770

Tabel 7 Peran DEG terkait Asupan WP dengan Inflamasi, Obesitas, dan T2D

Gene (regulation)	Peran dalam inflamasi, obesitas, dan T2D
FOXJ1 (down)	FOXJ1 menghambat jalur persinyalan NFκB (proinflammatory signalling pathway) (Jonsson & Peng, 2005)
NLRP1 (down)	Hati mengekspresikan NLRP1 pada tingkat Mrna (Szabo & Csak, 2012). NLRP1 adalah protein pertama yang terbukti membentuk inflammasome (Chavarría-Smith dkk., 2016).
LGALS2 (down)	Ekspresi Galektin 2 (gen LGALS2) liver meningkat 4,7 kali pada kelompok <i>New Zealand White rabbits</i> aterosklerotik yang menerima diet hiperkolesterolemik (Ivan dkk., 2022).
LIME1 (down)	Situs awal transkripsi gen LIME1 memiliki peran kunci dalam jalur inflamasi seperti pensinyalan MAPK (Li dkk., 2021). Obesitas dan diabetes sendiri telah dikaitkan dengan peningkatan sinyal intraseluler p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), yang dapat meningkatkan peradangan jaringan dan cedera (Lim dkk., 2009).
NOTCH3 (up)	Pada wanita dengan obesitas berat dan NAFLD terjadi downregulasi ekspresi NOTCH3 hati dan terdapat korelasi positif antara ekspresi NOTCH3 dan beberapa gen yang terkait dengan metabolisme lipid hati (Auguet dkk., 2020).
ARRB2 (down)	β-Arrestin2 (ARRB2 gene) is increased in liver fibrosis in humans (Schierwagen dkk., 2020). Diabetes mellitus tipe 2 meningkatkan risiko fibrosis hati pada individu dengan obesitas dan penyakit hati berlemak nonalkohol (NAFLD) (Barb dkk., 2021).
SIM2 (down)	SIM2 menurunkan aktivasi NFκB pada sel MCF7 (Wyatt dkk., 2019). NFκB diaktifkan di hampir setiap penyakit hati kronis, termasuk penyakit hati alkoholik, penyakit hati berlemak nonalkohol (NAFLD) (Jonsson & Peng, 2005).
TAT (up)	TAT diekspresi di hati dan ekspresinya diketahui abnormal pada tikus diabetes (Shen & Zhu, 2018).

Pembahasan

Dalam kondisi normal, inflamasi akan mereda setelah rangsangan diatasi. Namun inflamasi jangka panjang dapat menyebabkan kerusakan pada organ dan jaringan, termasuk pada jaringan yang berhubungan dengan metabolisme. Kerusakan ini dapat menyebabkan beberapa kondisi kronis seperti obesitas, diabetes, dan sindrom metabolik. Paparan inflamasi jangka panjang pada penyandang obesitas, selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel pankreas yang mengontrol produksi insulin, meningkatkan resistensi insulin, dan menyebabkan kondisi diabetes. Inflamasi juga dapat mempengaruhi metabolisme lemak dan glukosa di hati, serta memicu pembentukan lemak visceral yang dapat meningkatkan risiko aterosklerosis.

Hasil analisis DEG dari perubahan transkripsi (ekspresi gen) pada hati manusia yang berkontribusi pada akumulasi lipid hati dan resistensi insulin terkait T2D hati manusia menunjukkan bahwa terdapat 22 gene sharing terkait inflamasi dengan regulasi yang konsisten (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara proses terjadinya kondisi obesitas dengan T2D jika dilihat dari mekanisme inflamasinya. Pada Tabel 4 terlihat bahwa secara umum mekanisme inflamasi yang terjadi adalah melalui *Chemokine signaling pathway* dan *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Dalam ulasannya, Chan et al (2021) menunjukkan pentingnya kemokin dan reseptor kemokin dalam peradangan jaringan adiposa terkait obesitas dan perkembangan resistensi insulin (Chan & Hsieh, 2021). Adapun Diabetes melitus tipe 2 (T2D) dan penyakit hati berlemak nonalkohol (NAFLD) umumnya ada bersamaan dan telah dianggap sebagai manifestasi dari sindrom metabolik. NAFLD diketahui memiliki prevalensi 70% di antara pasien T2D (Dharmalingam & Yamasandhi, 2018). Obesitas dikaitkan dengan

peningkatan lipolisis jaringan adiposa, sekresi mediator inflamasi, serta fibrotik pada liver. Akumulasi sel-sel inflamasi dalam jaringan adiposa kemudian menyebabkan inflamasi yang berkelanjutan/kronis, memediasi resistensi insulin, serta berkontribusi terhadap perkembangan NAFLD (Luci dkk., 2020).

Interaksi protein dari ke-22 DEG menunjukkan terdapat 3 klaster yang saling terhubung dan diduga saling mempengaruhi. Klaster C2 yang merupakan klaster sentral, dan terdapat gen SRC yang terlihat menjadi protein penghubung antar klaster. Berdasarkan hasil analisis DEG dalam penelitian ini, SRC mengalami down-regulasi pada sel hati pasien obesitas dan pasien obesitas dengan T2D. SRC (proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) merupakan salah satu kinase utama yang diaktifkan setelah keterlibatan reseptor dan memainkan peran dalam aktivasi keluarga protein tirosin kinase (PTK) lainnya (SRC, 2023). Hal ini menjelaskan posisi SRC sebagai protein sentral dari interaksi protein yang terbentuk dimana fungsi protein memerlukan aktivasi diantaranya oleh protein kinase. (Feng dkk., 2021) menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi SRC dan gen-gen Src family kinases (SFKs) lain dalam preadiposit manusia dan inhibitor SFKs menekan diferensiasi adiposit dengan menurunkan ekspresi gen adipogenik pada diferensiasi awal dan akhir.

Hasil analisis PCA dan machine learning yang dilakukan menggunakan Orange³¹ menunjukkan 22 DEG sel hati terkait inflamasi lebih mampu membedakan Lean dengan Obesitas_T2D-poorly controlled dibandingkan dengan Obesitas_noT2D. Hal ini sepertinya dapat menggambarkan progresivitas kerusakan hati yang diinduksi inflamasi akibat obesitas yang mengarah pada terjadinya resistensi insulin atau T2D seperti yang diulas oleh Luci dkk. (2020). Dengan demikian ke-22 DEG terkait inflamasi tersebut dapat dijadikan target terapi antiinflamasi untuk obesitas dan T2D. Dalam penelitian ini, whey protein (WP) dievaluasi perannya dalam mempengaruhi perubahan ke-22 DEG tersebut. Tidak terdapat perubahan ekspresi gen yang signifikan pada 22 DEG terkait inflamasi (Tabel 5) akibat penambahan serum darah manusia pada sel HEP2 sebelum (WP_F) dan 60 menit (WP_60) setelah asupan whey protein (WP). Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan whey protein dalam memperbaiki parameter obesitas dan penurunan kadar glukosa darah seperti temuan Wirunsawanya dkk. (2018) nampaknya mengambil jalur mekanisme yang berbeda.

Hasil analisis DEG di luar ke-22 gen terkait inflamasi antara kelompok WP_F terhadap WP_60 diperoleh 8 (delapan) DEG yaitu FOXJ1, NLRP1, LGALS2, LIME1, NOTCH3, ARBB2, SIM2, dan TAT memiliki pola ekspresi gen yang sama dengan pasien Obese_noT2D atau Obese_T2D-poorly controlled. Adapun keterkaitan 8 DEG tersebut dengan inflamasi, obesitas, atau T2D dapat dilihat pada Tabel 7. Analisis interaksi protein menggunakan database STRING menunjukkan tidak ditemukan keterhubungan diantara ke-8 DEG tersebut. Dengan demikian belum ditemukan jalur dan mekanisme inflamasi yang dipengaruhi oleh WP berdasarkan data ekspresi gennya. Untuk itu, perlu dilakukan eksplorasi dan riset lebih lanjut untuk menentukan jalur dan mekanisme kerja WP dalam mempengaruhi ekspresi gen-gen yang terkait obesitas dan T2D baik yang terkait inflamasi maupun yang tidak terkait inflamasi

Kesimpulan

Penelitian ini mengidentifikasi 22 gen yang berbeda (DEG) terkait jalur inflamasi yang dapat digunakan sebagai target untuk terapi anti-inflamasi pada obesitas dan diabetes tipe 2 (T2D). Dalam penelitian ini, ditemukan bahwa potensi anti-diabetes dari whey protein (WP) nampaknya menggunakan jalur yang berbeda yaitu melalui perubahan ekspresi gen FOXJ1, NLRP1, LGALS2, LIME1, NOTCH3, ARBB2, SIM2, dan TAT. Secara keseluruhan, penelitian

ini memberikan wawasan berharga tentang peran ekspresi gen terkait inflamasi dalam obesitas dan T2D, serta target potensialnya untuk terapi di masa depan.

Daftar Pustaka

- Auguet, T., Bertran, L., Binetti, J., Aguilar, C., Martínez, S., Guiu-Jurado, E., Sabench, F., Adalid, L., Porrás, J. A., Riesco, D., Del Castillo, D., & Richart, C. (2020). Hepatocyte Notch Signaling Deregulation Related to Lipid Metabolism in Women with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver. *Obesity*, 28(8), 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/oby.22873>
- Barb, D., Repetto, E. M., Stokes, M. E., Shankar, S. S., & Cusi, K. (2021). Type 2 diabetes mellitus increases the risk of hepatic fibrosis in individuals with obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity*, 29(11), 1950–1960. <https://doi.org/10.1002/oby.23263>
- Chan, P.-C., & Hsieh, P.-S. (2021). The Chemokine Systems at the Crossroads of Inflammation and Energy Metabolism in the Development of Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13528. <https://doi.org/10.3390/ijms222413528>
- Chavarría-Smith, J., Mitchell, P. S., Ho, A. M., Daugherty, M. D., & Vance, R. E. (2016). Functional and Evolutionary Analyses Identify Proteolysis as a General Mechanism for NLRP1 Inflammasome Activation. *PLOS Pathogens*, 12(12), e1006052. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006052>
- Das, D., Kabir, M. E., Sarkar, S., Wann, S. B., Kalita, J., & Manna, P. (2022). Antidiabetic potential of soy protein/peptide: A therapeutic insight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.131>
- Das, U. N., & Rao, A. A. (2007). Gene expression profile in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-35>
- Dharmalingam, M., & Yamasandhi, Pg. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease and Type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 22(3), 421. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_585_17
- Diedisheim, M., Carcarino, E., Vandiedonck, C., Roussel, R., Gautier, J.-F., & Venteclef, N. (2020). Regulation of inflammation in diabetes: From genetics to epigenomics evidence. *Molecular Metabolism*, 41, 101041. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101041>
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*, 4, 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- Feng, J., Zhang, X., Shan, C., Xia, J., Zhang, Z., Shi, H., Leng, K., Wu, Y., Ji, C., & Zhong, T. (2021). Src family kinases involved in the differentiation of human preadipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 533, 111323. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111323>
- Ivan, L., Uyy, E., Suica, V. I., Boteanu, R. M., Cerveanu-Hogas, A., Hansen, R., & Antohe, F. (2022). Hepatic Alarmins and Mitochondrial Dysfunction under Residual Hyperlipidemic Stress Lead to Irreversible NAFLD. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 000(000), 000–000. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00128>

- Jonsson, H., & Peng, S. L. (2005). Forkhead transcription factors in immunology. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(4), 397–409. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4365-8>
- Li, S.-C., Kuo, H.-C., Huang, L.-H., Chou, W.-J., Lee, S.-Y., Chan, W.-C., & Wang, L.-J. (2021). DNA Methylation in LIME1 and SPTBN2 Genes Is Associated with Attention Deficit in Children. *Children*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/children8020092>
- Lim, A. K. H., Nikolic-Paterson, D. J., Ma, F. Y., Ozols, E., Thomas, M. C., Flavell, R. A., Davis, R. J., & Tesch, G. H. (2009). Role of MKK3–p38 MAPK signalling in the development of type 2 diabetes and renal injury in obese db/db mice. *Diabetologia*, 52(2), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1215-5>
- Luci, C., Bourinet, M., Leclère, P. S., Anty, R., & Gual, P. (2020). Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.597648>
- Molina-Ayala, M. A., Rodríguez-Amador, V., Suárez-Sánchez, R., León-Solís, L., Gómez-Zamudio, J., Mendoza-Zubieta, V., Cruz, M., & Suárez-Sánchez, F. (2022). Expression of obesity- and type-2 diabetes-associated genes in omental adipose tissue of individuals with obesity. *Gene*, 815, 146181. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146181>
- Piva, S. R., Susko, A. M., Khoja, S. S., Josbeno, D. A., Fitzgerald, G. K., & Toledo, F. G. S. (2015). Links Between Osteoarthritis and Diabetes. *Clinics in Geriatric Medicine*, 31(1), 67–87. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2014.08.019>
- Rodríguez-Esteban, R., & Jiang, X. (2017). Differential gene expression in disease: a comparison between high-throughput studies and the literature. *BMC Medical Genomics*, 10(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0293-y>
- Sadreev, I. I., Chen, M. Z. Q., Welsh, G. I., Umezawa, Y., Kotov, N. V., & Valev, N. V. (2014). A Systems Model of Phosphorylation for Inflammatory Signaling Events. *PLoS ONE*, 9(10), e110913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110913>
- Salehpour, A., Rezaei, M., Khoradmehr, A., Tahamtani, Y., & Tamadon, A. (2021). Which Hyperglycemic Model of Zebrafish (Danio rerio) Suites My Type 2 Diabetes Mellitus Research? A Scoring System for Available Methods. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.652061>
- Schierwagen, R., Dietrich, P., Klein, S., Uschner, F. E., Ortiz, C., Tyc, O., Torres, S., Hellerbrand, C., Sauerbruch, T., & Trebicka, J. (2020). β -Arrestin2 is increased in liver fibrosis in humans and rodents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(44), 27082–27084. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014337117>
- Shen, J., & Zhu, B. (2018). Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8804>
- Smith, K., Taylor, G. S., Brunsgaard, L. H., Walker, M., Bowden Davies, K. A., Stevenson, E. J., & West, D. J. (2022). Thrice daily consumption of a novel, premeal shot containing a low dose of whey protein increases time in euglycemia during 7 days of free-living in individuals with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 10(3), e002820. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2022-002820>
- SRC. (2023, Januari 1). *SRC protein expression summary - The human protein atlas*. SRC: The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000197122-SRC>

- String. (2023). *STRING functional protein association networks*. STRING. <https://string-db.org/cgi/about>
- Szabo, G., & Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 57(3), 642–654. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.035>
- Watson, S. (2022). *The Link Between Arthritis and Diabetes*. Arthritis Foundation. <https://www.arthritis.org/health-wellness/about-arthritis/related-conditions/other-diseases/the-link-between-arthritis-and-diabetes>
- Wirunsawanya, K., Upala, S., Jaruvongvanich, V., & Sanguankeo, A. (2018). Whey Protein Supplementation Improves Body Composition and Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(1), 60–70. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1344591>
- Wyatt, G. L., Crump, L. S., Young, C. M., Wessells, V. M., McQueen, C. M., Wall, S. W., Gustafson, T. L., Fan, Y.-Y., Chapkin, R. S., Porter, W. W., & Lyons, T. R. (2019). Cross-talk between SIM2s and NFκB regulates cyclooxygenase 2 expression in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 21(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1224-y>
- Xu, W., & Huang, Y. (2022). Regulation of Inflammatory Cell Death by Phosphorylation. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.851169>