



PENGARUH MUTASI TITIK GEN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2* TERHADAP STRUKTUR PROTEIN

THE EFFECT OF POINT MUTATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 ON PROTEIN STRUCTURE

Karina^{1,2,3,*}, Imam Rosadi¹, Iis Rosliana¹, Komang A. Wahyuningsih^{1,2,4}

¹HayandraLab, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia

²Klinik Hayandra, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia

³Biomedik, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁴Histologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta, Indonesia

*Corresponding author: karina@hayandra.com

Naskah Diterima: 22 Juli 2019; Direvisi: 29 Agustus 2019; Disetujui: 16 September 2019

Abstrak

Protein yang berperan dalam angiogenesis, pertumbuhan dan regenerasi sel adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Protein VEGF akan berinteraksi dengan reseptornya seperti *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR2). Mutasi gen VEGFR2 pada manusia dapat menyebabkan penyakit *strawberry mark* (hemangioma). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang mutasi yang berperan dalam terbentuknya hemangioma. Beberapa tahapan dilakukan untuk menganalisis pengaruh mutasi tersebut adalah penelusuran informasi dasar dan komposisi gen VEGFR2, analisis ortolog dan paralog gen VEGFR2, serta analisis struktur sekunder protein VEGFR2 beserta interaksinya dengan reseptor VEGF manusia. Hasilnya menunjukkan bahwa mutasi VEGFR2 pada basa ke-3.741, yaitu sitosin (C) menjadi timin (T) ditemukan pada jaringan tumor hemangioma. Perubahan basa ke-3.741 sitosin menjadi timin mengakibatkan perubahan asam amino prolin menjadi serin yang berdampak pada regulasi ekspresi VEGF. Ortolog dari gen VEGFR2 manusia adalah gen VEGFR2 simpanse, kelinci dan mencit serta paralognya adalah gen *fms related tyrosine kinase 1* (FLT-1), tyrosine kinase Flt4, *platelet derived growth factor receptor alpha*, dan PDGFRB manusia. Hasil analisis pengaruh mutasi terhadap bentuk dan struktur protein menunjukkan tidak ada perubahan signifikan, namun posisi mutasi terletak di bagian ekstraseluler. Berdasarkan analisis *docking*, ikatan ligan-reseptor VEGF-VEGFR2 termutasi memiliki energi lebih rendah, yaitu -14,58 kkal/mol dibandingkan normal, yaitu -13,29 kkal/mol.

Kata kunci: Angiogenesis; Hemangioma; Mutasi; VEGF; VEGFR2

Abstract

Protein which plays a role for angiogenesis, growth and regeneration is *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF protein interacts to VEGF receptor-2 (VEGFR2). The mutation of human VEGFR2 implicated in *strawberry mark* (hemangioma) disease. Therefore, it is necessary to study the VEGFR2 mutation that plays an important essential role in the formation of hemangioma. There are several steps to analyse the effect of VEGFR2 mutation which searched for general information, ortholog and paralog as well as protein structure and their interaction with VEGF ligand analysis. The results showed that the 3,741 bases of VEGFR2 gene, which is cytosine (C) is mutated to thymine (T) that reported in human tumour tissue hemangioma. Changes of cytosine to thymine resulted in changes proline to serin, which regulates VEGF expression. The ortholog was chimpanzee, rabbit, and mice VEGFR2 gene while the paralog was human *fms related tyrosine kinase 1* (FLT-1), tyrosine kinase Flt4, *platelet platelet-derived growth factor receptor alpha*, and PDGFRB genes. There is no significant effect of mutation towards protein structure, but the mutation was in the extracellular cells. Based on *docking* analysis, ligand-receptors interaction of VEGF and mutated VEGFR2 has the lowest energy compared to normal interaction which were was -14.58 and -13.29 kcal/mol, respectively.

Keywords: Angiogenesis; Hemangioma; Mutation; VEGF; VEGFR2

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v12i2.11804>

PENDAHULUAN

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru untuk mendukung pertumbuhan dan regenerasi sel. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan salah satu protein yang berperan dalam proses angiogenesis (Holmes & Zachary, 2005; Cebe-Suarez, Zehnder-Fjällman, & Ballmer-Hofer, 2006). Protein VEGF banyak diproduksi oleh sel endotel, sel hematopoetik, dan sel stromal dalam merespon kondisi hipoksia. VEGF terdiri dari 3 reseptor, yaitu *vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR1), VEGFR2 dan VEGFR3. Masing-masing reseptor memiliki ligan yang spesifik untuk aktivasi ekspresi protein VEGF. Ligan tersebut terdiri dari ligan VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E dan VEGF-F (Holmes & Zachary, 2005; Cebe-Suarez *et al.*, 2006; Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006; Shibuya 2011).

Studi pendahuluan melaporkan bahwa VEGFR2 berperan dalam angiogenesis dengan membentuk kompleks reseptor-ligan terhadap protein VEGF-E (Shibuya 2011; Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Studi *in vitro* lain secara terpisah melaporkan, bahwa VEGFR1 juga berperan dalam angiogenesis dengan ligan VEGF-D yang dibantu oleh VEGFR2 (Shibuya 2011). Kasus hemangioma (*strawberry mark*) dilaporkan dapat terjadi akibat mutasi gen VEGFR2 (Walter *et al.*, 2002). Hemangioma merupakan tumor yang menyebabkan penumpukan pembuluh darah berlebih, beberapa kasus dilaporkan pada bayi yang berusia kurang dari satu tahun. Tanda-tanda hemangioma dapat dideteksi sejak bayi dilahirkan atau beberapa bulan setelah bayi dilahirkan (Callahan & Yoon, 2012; Bauland, Van Steensel, Steijlen, Rieu, & Spauwen, 2006). Bioinformatika merupakan cabang ilmu biologi yang dapat digunakan untuk menganalisis dan memprediksi mutasi suatu gen.

Peran bioinformatika sendiri dalam ilmu biomedis dan kedokteran selain membantu identifikasi mutasi gen penyebab penyakit, juga dapat digunakan sebagai penunjang terapi gen, informasi klinis hingga mengetahui profil genetik dalam satu individu. Adapun mutasi VEGFR2 yang dilaporkan dapat menyebabkan hemangioma, juga dapat

dipelajari menggunakan ilmu bioinformatika. Oleh karena itu, bioinformatika sering digunakan sebagai studi pendahuluan yang dikenal sebagai studi *in silico* sebelum memasuki tahapan *in vitro* dan *in vivo*, sehingga dapat mengefisiensikan waktu dan biaya.

Pada studi ini dilakukan beberapa tahapan analisis terhadap gen VEGFR2, yang meliputi informasi lokasi mutasi yaitu urutannya dalam basa nukleotida. Selanjutnya dilakukan pendekatan analisis paralog dan ortolog VEGFR2, struktur sekunder protein serta posisi mutasi protein VEGFR2. Prediksi pengaruh mutasi terhadap struktur protein dianalisis menggunakan perangkat lunak PyMol. Adapun tahapan terakhir adalah *docking*, yaitu melihat potensi interaksi antara ligan VEGF dengan reseptor VEGFR2 baik yang normal maupun termutasi. Energi yang dibutuhkan terhadap interaksi VEGF-VEGFR2 dapat memberikan gambaran secara *in silico* terhadap kemungkinan reaksi yang terjadi pada studi *in vitro* maupun *in vivo*. Visualisasi interaksi ligan VEGF dan reseptor VEGFR2 diinterpretasikan menggunakan perangkat lunak PyMol. Pada studi ini, untuk mengetahui pengaruh mutasi VEGFR2 terhadap struktur protein dan interaksinya dengan ligan VEGF maka dilakukan studi secara *in silico* terhadap VEGFR2 termutasi yang dibandingkan dengan VEGFR2 normal. Adapun tujuan dari studi ini adalah untuk memberikan informasi dari dampak mutasi VEGFR2 berdasarkan hasil prediksi secara *in silico* terhadap hemangioma yang terjadi pada manusia.

MATERIAL DAN METODE

Pemilihan Sekuen DNA dan Protein VEGFR2 Manusia

Sekuen dikumpulkan dari data gen bank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kata kunci "*Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (VEGFR2)", kemudian diseleksi berdasarkan kelengkapan nomor akses protein, nomor akses nukleotida, inang (*host*), jumlah asam amino (AA), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), dan urutan sekuen asam amino. Data SNP dipilih berdasarkan informasi manifestasi klinis menggunakan analisis struktur protein pada *Online Mendelian Inheritance in Man*

(OMIM). Urutan sekuen nukleotida dan asam amino disimpan dalam format FASTA pada notepad “txt” untuk analisis selanjutnya.

Analisis Paralog dan Ortolog

Analisis paralog untuk gen VEGFR2 manusia diakses melalui situs Genecards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KDR>). Analisis ortolog diakses melalui situs NCBI. Masing-masing gen yang diperoleh kemudian dianalisis berdasarkan panjang basa, peta kromosom hingga takson. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan melakukan penjajaran (*alignment*). Analisis pohon kekerabatan menggunakan perangkat lunak CLC Main Workbench versi 3.0 metode *Neighbor Joining* (NJ). Metode *Neighbour joining* (NJ) adalah metode komputasi yang cepat dan akurat pada sampel yang tidak terlalu besar (Kumar & Gadagar, 2000).

Analisis Struktur Sekunder Protein VEGFR2 Manusia

SNP dianalisis untuk mengetahui manifestasi klinis menggunakan OMIM. Keberadaan lokasi SNP dianalisis melalui situs *Transmembrane Helices Based on a Hidden Markov Model* (TMHMM). Pemodelan struktur sekunder dilakukan untuk memprediksi pengaruh mutasi terhadap struktur protein. Sekuens nukleotida VEGFR2 *wildtype* dengan kode NM_002253.2 diinput ke dalam CLC MainWorkbench dan dilakukan perubahan basa ke-3.741 dan ditranslasi menjadi sekuen protein VEGFR2 termutasi. Kedua sekuen normal dan termutasi tersebut kemudian disimpan dalam format “txt”. Perubahan tersebut dianalisis pengaruhnya menggunakan beberapa perangkat lunak dalam jaringan

“psipred” (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) dan “protparam” (<https://web.expasy.org/protparam/>). Sekuens protein kemudian disimpan dalam format pdb. menggunakan situs SWISS-MODEL dan divisualisasi menggunakan program PyMol.

Analisis Docking VEGF-VEGFR2 Manusia

Analisis *docking* dibantu dengan perangkat lunak dalam jaringan PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>). Struktur sekunder dari protein VEGF dan VEGFR2 dalam format .pdb diinput pada situs PatchDock. Hasil *docking* akan dikirimkan ke alamat surat elektronik yang dicantumkan pada situs PatchDock. Luaran hasil yang dilaporkan terdiri dari energi yang dibutuhkan untuk interaksi ligan-reseptor. Analisis interaksi ligan-reseptor divisualisasi-kan menggunakan perangkat lunak PyMol.

HASIL

Gen VEGFR2 manusia dengan nomor akses NM_002253.2 terletak pada kromosom 4q11-q12 dengan jumlah ekson sebanyak 30 ekson. Panjang basa gen VEGFR2 manusia adalah 6.055 pasang basa (pb) atau 1.356 asam amino. Analisis SNP menunjukkan bahwa terdapat mutasi titik pada gen VEGFR2, yaitu merupakan mutasi *missense*. Implikasi klinis reseptor VEGFR2 terletak pada mutasi basa ke-3.741, yaitu perubahan basa “C” menjadi basa “T”. Perubahan pada basa ini menyebabkan perubahan asam amino prolin menjadi serin (Tabel 1). Mutasi ini terletak pada ekson ke-26 yang dapat dideteksi menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

Tabel 1. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada gen VEGFR2 manusia yaitu perubahan basa ke 3741 dari C menjadi T (sumber: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Function	mRNA				Protein		
	SNP to Mrna	Accession	Position	Allele change	Accession	Position	Residue change
Missense	Fwd	NM_002253.2	3741	CCC ⇒ TCC	NP_002244.1	1147	P [Pro] ⇒ S [Ser]

Paralog dan Ortolog Gen VEGFR2 Manusia

Gen VEGFR2 tikus (NM_010612.2), simpanse (XM_517284.7), dan kelinci (NM_001195670.1) merupakan gen ortolog,

sedangkan gen) *fms related tyrosine kinase 1* (FLT-1) manusia (NM_002019.4), *tyrosine kinase Flt4* (U43143.1) manusia, *platelet derived growth factor receptor alpha* (PDGFRA) (NM_001347827.2) manusia, dan

PDGFRB (NM_002609.4) manusia merupakan gen paralog dari gen VEGFR2 manusia. Ortolog gen VEGFR2 akan muncul dari nenek moyang bersama saat spesiasi dan dapat memiliki fungsi yang serupa, sedangkan sekuen paralog muncul akibat duplikasi gen. Panjang basa VEGFR2 manusia, tikus, simpanse dan kelinci berturut-turut sebesar 6.055 pb, 5.464 pb, 5.834 pb, dan 4.071 pb, yang terletak pada kromosom 4, 5, 4 dan 15. Gen paralog secara berturut-turut FLT-1, FLT-4, PDGFRA, dan PDGFRB memiliki panjang basa 7.123 pb, 4.425 pb, 2.856 pb, dan 5.700 pb yang terletak pada kromosom 13, 5, 4 dan 5 (Tabel 2).

Analisis pohon kekerabatan dari ortolog dan paralog gen VEGFR2 manusia dibuat berdasarkan perbandingan sifat spesifik dari spesies. Sifat tersebut dapat berupa DNA atau protein pada penjabaran multideret. Hubungan evolusioner di antara deret digambarkan menggunakan grafik yang disebut pohon. Pohon kekerabatan memiliki percabangan yang muncul dari titik cabang (nodus) sehingga membentuk ranting dan pada akhirnya di ujung ranting terdapat daun yang merefleksikan deret. Deret yang mirip secara genetik akan mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Berdasarkan analisis pohon kekerabatan, ortolog antar gen yang sama dari spesies berbeda akan membentuk percabangan utama, sedangkan paralog akan membentuk percabangan kedua bersama gen VEGFR2 manusia (Gambar 1).

Analisis Protein Sekunder

Mutasi gen dapat mengubah struktur protein, sehingga memengaruhi fungsi biologis dan interaksi antar protein yang ditranslasikan. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi terkait prediksi pengaruh mutasi VEGFR2 basa ke-3.741 yang diawali dengan prediksi struktur transmembran. Prediksi struktur transmembran VEGFR2 manusia menggunakan program TMHMM menunjukkan bahwa sebagian asam amino berada di dalam sel, sebagian berada di luar sel dan sebagian lainnya membentuk heliks transmembran (Tmhelix) (Gambar 2). Asam amino yang terletak di luar membran terdiri dari asam amino urutan ke 1–733 dan 786–1.356. Sementara asam amino yang

berada dalam membran sel memiliki urutan asam amino ke-757–762 (Tabel 3).

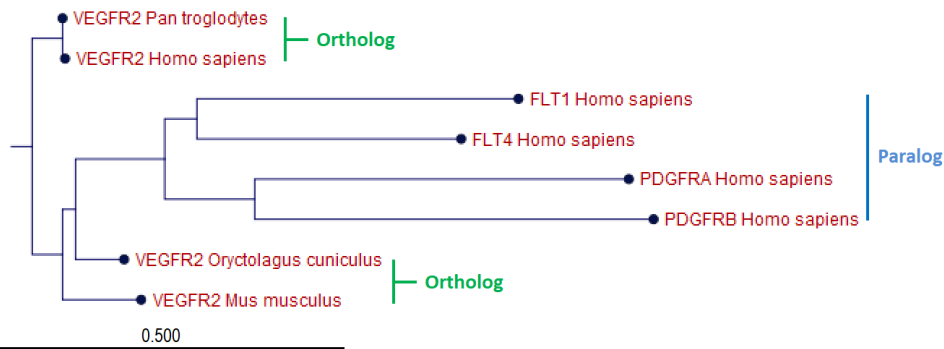
Mutasi yang terletak pada basa ke-3.741 atau asam amino ke-1.147 berada pada sisi luar membran sel (ekstraseluler). Posisi ini berpotensi berperan dalam ikatan antara reseptor dan ligan sehingga dapat memengaruhi ekspresi VEGF. Perbedaan struktur helix yang terbentuk antara normal dan mutasi terletak pada asam amino ke-1.002–1.004, yaitu L-E-H dan L-E. Asam amino H tidak membentuk helix pada struktur sekunder mutasi. Hal serupa juga ditunjukkan pada asam amino ke-1.012–1.014 sekuen normal V-A-K dan asam amino ke-1.018–1.019, yaitu F-L (data tidak ditampilkan). Kode huruf asam amino L, E, V, A, K, F dan H berturut-turut adalah kode asam amino leusin, asam glutamat, valin, alanin, lisin, *phenil alanine* dan histidin.

Analisis komposisi protein pada mutasi ke-1.147 prolin menjadi serin menunjukkan perbedaan presentase serin. Selain itu berat molekul protein (g/mol), terdapat perbedaan komposisi atom pada atom C, H dan O. Jumlah atom protein normal secara keseluruhan adalah 21.277 dengan formula $C_{6729}H_{10634}N_{1798}O_{2057}S_{59}$, sedangkan jumlah atom protein termutasi adalah 21.274 dengan formula $C_{6727}H_{10632}N_{1798}O_{2058}S_{59}$ (Tabel 4).

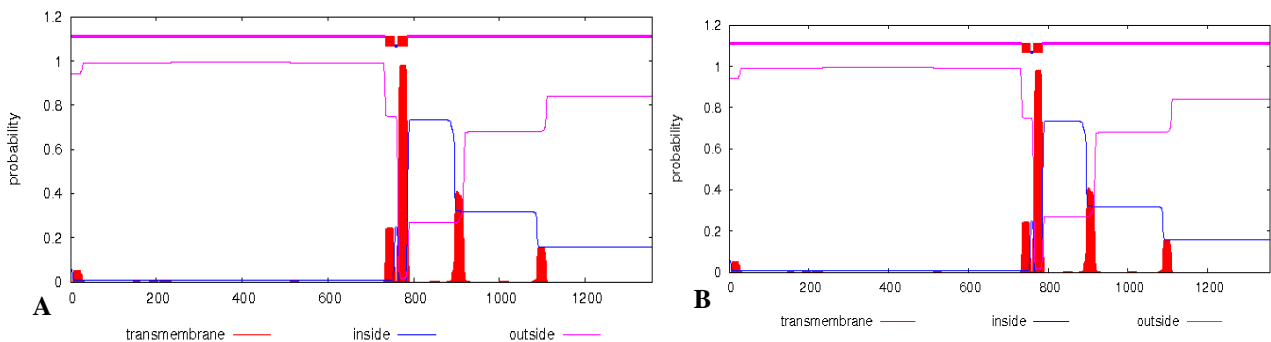
Mutasi *missense* dapat memiliki pengaruh yang berbeda pada fungsi protein. Perbedaan pengaruh tersebut dapat disebabkan oleh sifat konservatif atau non-konservatif suatu protein atau perannya dalam fungsi biologis. Analisis struktur 3D protein termutasi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar peran mutasi yang dapat memengaruhi struktur dan ikatan protein dibandingkan protein normal. Berdasarkan hasil prediksi struktur sekunder protein, perubahan asam amino ke-1.147 dari prolin menjadi serin pada VEGFR2 tidak menyebabkan perubahan struktur 3D yang signifikan. Hal tersebut dikonfirmasi dengan adanya tumpang tindih (*overlap*) antara struktur 3D VEGFR2 normal dengan VEGFR2 termutasi pada pemodelan PyMol (Gambar 3). Interaksi asam amino prolin menjadi serin juga tidak mengubah susunan ikatannya dengan asam glutamat (E) urutan ke-1.146 dan asam amino serin (S) urutan ke-1.148 (Gambar 3 D-F).

Tabel 2. Ortologi dan paralogi gen VEGFR2 manusia

Gen	Sinonim gen	Nomor akses	Panjang basa (pb)	Sumber	Letak gen	Ket.
EGFR-2	KDR, FLK1, VEGFR, CD309	NM_002253	6055	<i>Homo sapiens</i> (manusia)	4q11-q12	
EGFR-2	KDR, FLK1, VEGFR, CD309	NM_010612.2	5464	<i>Mus musculus</i> (tikus)	5 40.23 cM	Ortholog
EGFR-2	KDR, FLK1, VEGFR, CD309	XM_517284.7	5834	<i>Pan troglodytes</i> (Simpanse)	chr4	Ortholog
EGFR-2	KDR, FLK1, VEGFR, CD309	NM_001195670.1	4071	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (kelinci)	chr15	Ortholog
LT-1	VEGFR-1, FLT, FRT	NM_002019.4	7123	<i>Homo sapiens</i> (manusia)	13q12.3	Paralog
LT-4	LMPH1A, FLT41, PCL	U43143.1	4425	<i>Homo sapiens</i> (manusia)	5q35.3	Paralog
DGFRA	PDGFR2, CD140A	NM_001347827.2	2856	<i>Homo sapiens</i> (manusia)	4q12	Paralog
DGFRB	CD140B, JTK12, IMF1	NM_002609.4	5700	<i>Homo sapiens</i> (manusia)	5q32	Paralog



Gambar 1. Pohon kekerabatan sekuen VEGFR2 dan FGFR1 manusia serta sekuen VEGFR2 tikus (CLC MainWorkbenh versi 3.0)



Gambar 2. Prediksi posisi urutan asam amino gen VEGFR2 normal (A) dan termutasi (B) pada manusia

Tabel 3. Topologi transmembran protein VEGFR2 manusia (TMHMM)

Sekuen protein (AA)		Orientasi
Dari	Ke-	
1	733	Luar sel
734	756	Tmhelix
757	762	Dalam sel
763	785	Tmhelix
786	1356	Luar sel

Tabel 4. Perbandingan komposisi protein VEGFR2 Pro-1147 (normal) dan Ser-1147 (mutasi)

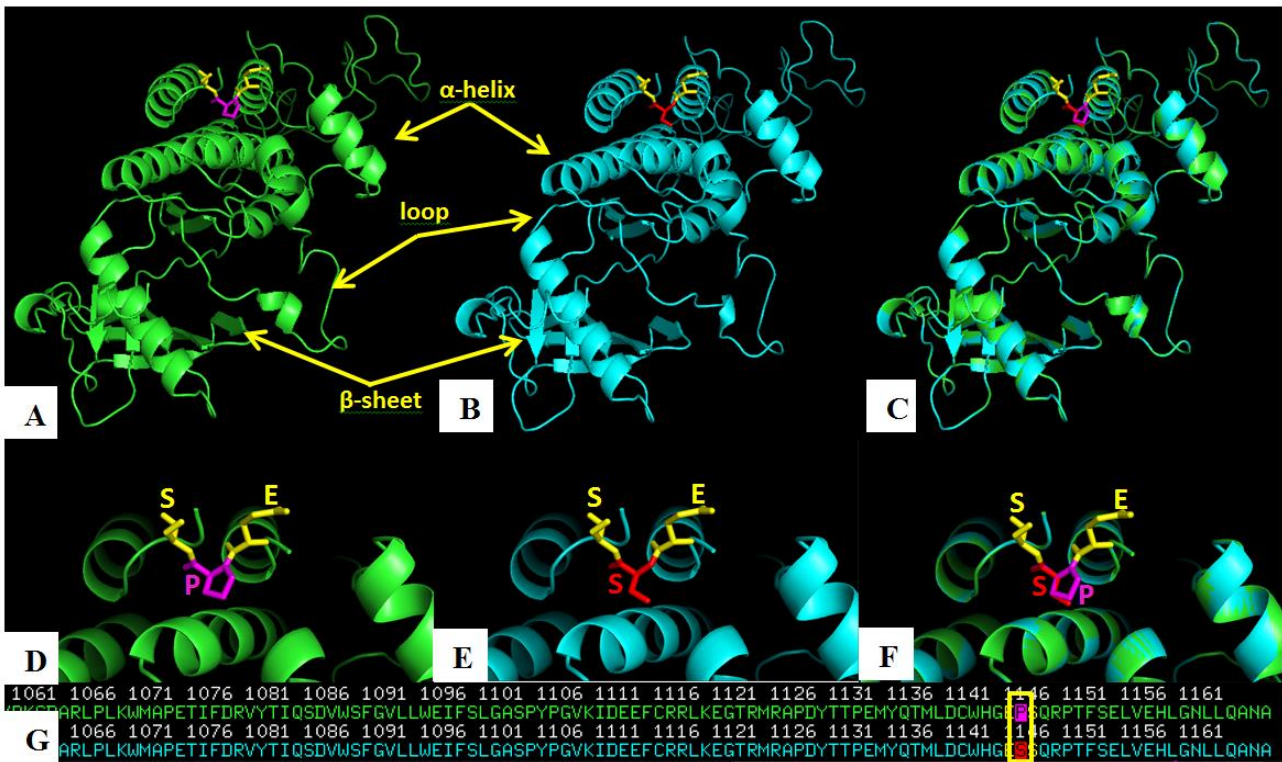
Keterangan	VEGFR-2		
	Pro-1147	Ser-1147	
Asam amino (AA)	1356	1356	
Berat molekul (g/mol)	151526,8	151516,7	
Theoretical pI	5,6	5,6	
Komposisi asam amino	Ala (A)	5,00%	5,00%
	Arg (R)	4,50%	4,50%
	Asn (N)	3,90%	3,90%
	Asp (D)	5,10%	5,10%
	Cys (C)	2,40%	2,40%
	Gln (Q)	3,80%	3,80%
	Glu (E)	7,60%	7,60%
	Gly (G)	6,30%	6,30%
	His (H)	1,90%	1,90%
	Ile (I)	5,90%	5,90%
	Leu (L)	9,10%	9,10%
	Lys (K)	6,20%	6,20%
	Met (M)	1,90%	1,90%
	Phe (F)	3,00%	3,00%
	Pro (P)	5,20%	5,20%
	Ser (S)	8,30%	8,40%
	Thr (T)	6,70%	6,70%
	Trp (W)	1,40%	1,40%
	Tyr (Y)	3,50%	3,50%
	Val (V)	8,10%	8,10%
Komposisi Atom :	Pyl (O)	0,00%	0,00%
	Sec (U)	0,00%	0,00%
	Karbon (C)	6.729	6.727
	Hidrogen (H)	10.634	10.632
	Nitrogen (N)	1.798	1.798
Komposisi Atom :	Oksigen (O)	2.057	2.058
	Sulfur (S)	59	59
Formula	C ₆₇₂₉ H ₁₀₆₃₄ N ₁₇₉₈ O ₂₀₅₇ S ₅₉	C ₆₇₂₇ H ₁₀₆₃₂ N ₁₇₉₈ O ₂₀₅₈ S ₅₉	
Jumlah atom	21.277	21.274	
Residu	Negatif (asp + glu)	172	172
	Positif (arg + lys)	145	145

Keterangan: Perbedaan komposisi ditunjukkan dengan warna abu-abu; sumber: <http://web.expasy.org/protparam/>

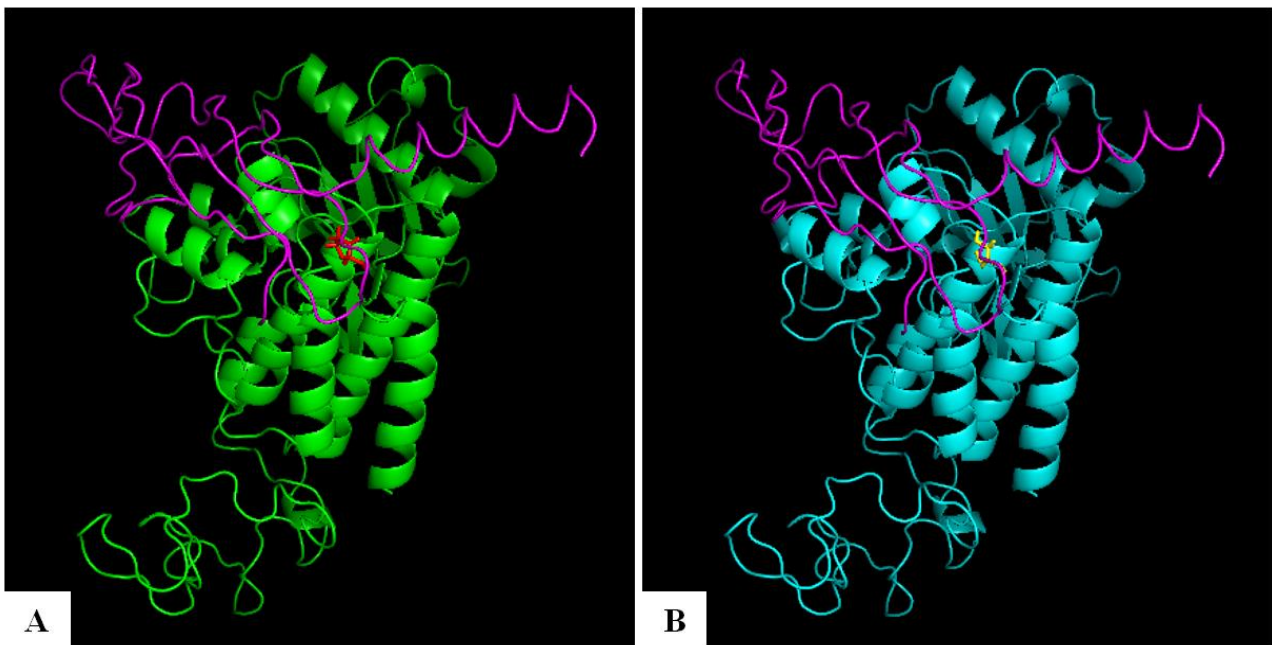
Analisis Docking VEGF-VEGFR2 Manusia

Struktur 3D protein VEGFR2 normal dan termutasi yang berinteraksi langsung dengan protein VEGF-D sebagai ligan disajikan pada Gambar 4. Berdasarkan nilai energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu interaksi ligan dan reseptor, adanya mutasi pada asam amino ke-1.147 membuat

interaksi menjadi semakin mudah dibandingkan pada interaksi VEGF-VEGFR normal. Nilai energi yang dibutuhkan oleh VEGFR2 normal berinteraksi dengan VEGF adalah 13,29 kkal/mol sedangkan energi yang dibutuhkan untuk VEGFR2 membentuk kompleks dengan VEGF adalah 14,58 kkal/mol.



Gambar 3. Prediksi struktur sekunder protein VEGFR2 manusia. (A) normal secara menyeluruh, (B) termutasi, (C) tumpang tindih keduanya, (D) interaksi asam amino normal yaitu prolin, (E) termutasi yaitu serin, (F) tumpang tindih keduanya, (G) urutan asam amino protein VEGFR2 normal dan mutasi (PyMol). Huruf *P* adalah asam amino prolin, *S* adalah asam amino serin, dan *E* adalah asam amino asam glutamat



Gambar 4. (A) Interaksi ligan VEGF (ungu) dan protein VEGFR2 normal (hijau) yaitu prolin ditandai dengan struktur berwarna merah, (B) interaksi ligan VEGF dan protein VEGFR2 termutasi (biru) yaitu serin ditandai dengan struktur berwarna kuning (PyMol). Rerata energi yang dibutuhkan untuk terjadinya interaksi VEGF-VEGFR2 pada reseptor normal dan termutasi berturut-turut adalah -13,29 kkal/mol dan -14,58 kkal/mol (PATCH DOCK)

PEMBAHASAN

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2, FLK1, VEGFR, CD309) selain berperan dalam angiogenesis juga mendukung pertumbuhan sel (Olsson *et al.*, 2006). Gen VEGFR2 manusia diprediksi memiliki fungsi yang serupa dengan gen VEGFR2 simpanse, kelinci, dan mencit, sehingga studi pendahuluan terkait pengaruh mutasi VEGFR2 terhadap mekanisme hemangioma dapat dipelajari menggunakan beberapa hewan model tersebut. Sekuen paralog memberikan informasi bahwa dalam prosesnya VEGFR2 mengalami duplikasi yang membentuk FLT-1, FLT4, PDGFRA dan PDGFRB.

Pada prinsipnya, hemangioma menyebabkan peningkatan produksi VEGF (Walter *et al.*, 2002). Mutasi pada gen VEGFR2 di basa ke-3.741 dari basa sitosin menjadi timin yang mengubah translasi asam amino dari prolin menjadi serin ditemukan pada 2 dari 15 kasus hemangioma anak. Mutasi ini diduga menyebabkan meningkatnya ekspresi VEGFR2 pada pasien hemangioma dan berkontribusi pada proses pembentukan dan metastasis tumor vaskular (Kleinman *et al.*, 2003; Tabata *et al.*, 2013). Selain itu, hemangioma juga menyebabkan peningkatan ekspresi VEGFR2, namun tidak ditemukan peningkatan ekspresi tersebut pada jaringan normal di sekitarnya (Walter *et al.*, 2002). Bukti bahwa jalur sinyal termediasi VEGFR2 berperan dalam tumorogenesis hemangioma diperkuat dengan hasil penelitian lain, yang melaporkan bahwa pemberian antibodi anti-VEGFR2 dapat menekan aktivitas VEGF dengan cara menutup jalur sinyal termediasi VEGFR2 (Nicolae & Olsen, 2010).

Jalur sinyal VEGF termediasi VEGFR2 yang terganggu menyebabkan jalur sinyal Akt dan *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) melemah sehingga proliferasi sel tumor menurun dan apoptosis meningkat (Nicolae & Olsen, 2010; Ou *et al.*, 2014). Keterbatasan informasi dan studi pada penelitian *genotyping* gen VEGFR2 menyebabkan peran mutasi VEGFR2 terhadap perubahan regulasi sinyal VEGF kasus hemangioma belum sepenuhnya dikonfirmasi. Berdasarkan studi ini, posisi mutasi gen VEGFR2 basa ke-3.741, yaitu prolin yang ditranslasikan menjadi serin berada

pada bagian ekstraseluler sel. Hal tersebut diduga memegang peranan penting dalam interaksi antara protein VEGF dan VEGFR2 sehingga meningkatkan ekspresi VEGF. Hasil uji *docking* yaitu interaksi antara ligan dan reseptor VEGF-VEGFR2 termutasi membutuhkan energi yang lebih rendah dibandingkan interaksi normal. Meskipun hasil *in silico* menunjukkan adanya kecenderungan interaksi VEGF-VEGFR2 termutasi lebih mudah terjadi, perlu dilakukan pengujian lanjutan pada level *in vitro* dan *in vivo* untuk analisis pengaruh mutasi VEGFR2 terhadap ekspresi dan interaksi VEGF dan VEGFR2.

SIMPULAN

Mutasi VEGFR2 pada basa ke-3.741 antara sitosin menjadi timin telah merubah jenis asam amino yang ditranslasikan, yaitu prolin menjadi serin. Ortolog dan paralog dari gen VEGFR2 manusia adalah gen VEGFR2 simpanse, kelinci, tikus serta gen FLT-1, FLT-4, PDGFRA dan PDGFRB manusia. Perubahan asam amino prolin menjadi serin pada VEGFR2 tidak mengubah bentuk dan struktur protein secara signifikan, namun posisi mutasi di bagian ekstraseluler sel memengaruhi nilai energi yang dibutuhkan sel untuk lebih mudah berinteraksi dengan VEGF dibandingkan pada VEGFR2 normal.

REFERENSI

- Bauland, C. G., Van Steensel, M. A., Steijlen, P. M., Rieu, P. N., & Spauwen, P. H. (2006). The pathogenesis of hemangiomas: a review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(2), 29-35e. doi: 10.1097/01.prs.0000197134.72984.cb.
- Callahan, A. B., & Yoon, M. K. (2012). Infantile hemangiomas: a review. *Saudi Journal of Ophthalmology*, 26(3), 283-291. doi: 10.1016/j.sjopt.2012.05.004.
- Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., & Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(5), 601-615. doi: 10.1007/s00018-005-5426-3.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676. doi: 10.1038/nm0603-669.

- Holmes, D. I., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*, 6(2), 209-218.
- Kleinman, M. E., Tepper, O. M., Capla, J. M., Bhatt, K. A., Ceradini, D. J., Galiano, R. D. (2003). Increased circulating AC133+/CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphatic Resource and Biology*, 1, 301-307. doi: 10.1089/153968503322758102.
- Kumar, S., & Gadagkar, S. R. (2000). Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51(6), 544-553.
- Nicolae, C., & Olsen, B. R. (2010). Unexpected matrix diseases and novel therapeutic strategies. *Cell Tissue Research*, 339(1), 155-165. doi: 10.1007/s00441-009-0874-y.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359-371. doi: 10.1038/nrm1911.
- Ou, J. M., Yu, Z. Y., Qiu, M. K., Dai, Y. X., Dong, Q., Shen, J. (2014). Knockdown of VEGFR2 inhibits proliferation and induces apoptosis in hemangioma-derived endothelial cells. *European Journal of Histochemistry*, 58(2263), 65-72. doi: 10.4081/ejh.2014.2263.
- Shibuya, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes & Cancer*, 2(12), 1097-1105. doi: <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>.
- Tabata, S., Goi, T., Nakazawa, T., Kimura, Y., Katayama, K., Yamaguchi, A. (2013). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor strengthens cell invasion ability via prokineticin receptor 2 in colon cancer cell lines. *Oncology Reports*, 29(2), 459-463. doi: 10.3892/or.2012.2124.
- Walter, J. W., North, P. E., Waner, M., Mizeracki, A., Blei, F., Walker, J. W. (2002). Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 33(3), 295-303. doi: 10.1002/gcc.10028.