

Prediksi dan Identifikasi Struktur Protein EGFR Kanker Paru dengan Mutasi Titik L718Q/T790M Secara Pemodelan Homologi *In Silico*

Dwi Syah Fitra Ramadhan^{1,*}, Daryono H. Tjahjono²

¹Program Studi Farmasi, STIKES Mandala Waluya Kendari, Kendari, Sulawesi Tenggara

²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Jawa Barat

*E-mail: ditrakdi@gmail.com

Abstract

EGFR receptors play an important role in the growth of cancer cells, and these receptors have undergone various types of mutations. At this time, the effect of the L718Q / T790M point mutation on the EGFR receptor is not known, therefore the aim of this study is to predict the EGFR structure with the L718Q / T790M point mutation using in silico homology modeling. The mutant protein was successfully modeled using SWISS-Model expasy webserver and showed good evaluation results after the protein was minimized as indicated by the results of the Ramachandran outlier score of 0%, clashscore 0.98, and MolProbity 1.15. Identification of the active site of the mutant protein shows a conformational change of the active site that causes a steric collision between the inhibitor group and the amino acid side chain of the mutant protein.

Keywords: EGFR, mutation, homology modeling, in silico

Abstrak

Reseptor EGFR memainkan peran penting dalam pertumbuhan sel kanker, dan reseptor tersebut telah mengalami berbagai jenis mutasi. Mutasi titik L718Q/T790M saat ini belum diketahui pengaruhnya secara molekuler terhadap reseptor EGFR, oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk memprediksi struktur EGFR dengan mutasi titik L718Q/T790M secara pemodelan homologi in silico. Protein mutan berhasil di modelkan menggunakan webserver SWISS-Model expasy dan menunjukkan hasil evaluasi yang baik setelah protein di minimisasi yang ditunjukkan oleh hasil skor Ramachandran outlier 0%, clashscore 0,98, dan MolProbity 1,15. Identifikasi terhadap sisi aktif protein mutan menunjukkan perubahan konformasi sisi aktif yang membuat terjadinya tabrakan sterik antara gugus inhibitor dengan rantai samping asam amino dari protein mutan.

Kata Kunci: EGFR, mutasi, Pemodelan homologi, in silico.

■ Pendahuluan

Kanker termasuk penyakit yang tidak menular. Penyakit ini timbul akibat kondisi fisik yang tidak normal dan pola hidup yang tidak sehat [1–3]. Sepertiga dari semua kematian akibat kanker di seluruh dunia masih disebabkan oleh kanker paru-paru. Mayoritas pasien kanker paru-paru menderita kanker sel paru non kecil (NSCLC, 80%). Sedikitnya 15% pasien kanker paru-paru menunjukkan kelangsungan hidup 5 tahun setelah diagnosis penyakit ini [4, 5].

Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosin Kinase (EGFR-TK), memainkan peran penting dalam diferensiasi sel dan proliferasi pada kondisi fisiologis normal dan kanker [6]. Pengobatan dengan penargetan tirosin kinase EGFR (EGFR-TK) saat ini mengalami beberapa kendala yaitu akibat adanya mutasi ganda pada domain kinasenya. Kebanyakan pasien mendapatkan mutasi penonaktifan kedua yaitu mutasi T790M pada ekson 20 [7, 8].

Inhibitor tirosin kinase EGFR generasi keempat yaitu *EGFR Allosterik Inhibitor 001* (EAI001) dan *EGFR Allosterik Inhibitor 045* (EAI045) yang mampu menghambat mutan EGFR yang positif T790M [9]. Mutasi T790M/L718Q juga dilaporkan menjadi salah satu penyebab resistensi dari obat generasi ketiga [10], namun hingga saat ini belum ada data struktur 3D protein mutan tersebut. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian pemodelan homologi terhadap protein mutan T790M/L718Q untuk memprediksi struktur 3D dari protein mutan tersebut.

■ Metode Penelitian

Pemodelan Protein Mutan

Pemodelan protein diawali dengan penyiapan sekuens. Sekuens dalam penelitian ini diperoleh dari situs bank data protein atau PDB (<https://RCSB.org>) dengan kode PDB: 5D41. Sekuens kemudian dimutasikan pada posisi L718Q/T790M menggunakan perangkat lunak BioEdit. Selanjutnya sekuens tersebut dimodelkan berdasarkan templat protein EGFR dengan kode PDB 5D41. Pemodelan dilakukan menggunakan *webserver* SWISS-MODEL *exspasy* (<https://swissmodel.expasy.org/>) [11].

Evaluasi dan Optimasi Model Protein

Struktur protein mutan yang dihasilkan kemudian di minimisasi menggunakan *Yasara Minimization Webserver* untuk meningkatkan akurasi rantai samping dari pemodelan homologi [12]. Evaluasi protein kemudian dilakukan berdasarkan pada parameter Ramachandran *Outlier*, *Clashscore*, dan MolProbity *Score*. Evaluasi dilakukan menggunakan *webserver* MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) [13].

Evaluasi Sisi Aktif

Sisi aktif dievaluasi menggunakan perangkat lunak PyMol. Sisi aktif dievaluasi setelah protein mutan model dengan hasil evaluasi terbaik di superposisikan dengan protein templat. Evaluasi dilakukan dengan menambahkan ligan alami yang merupakan inhibitor pada sisi allosterik dari EGFR templat dan mutan yang telah di superposisikan dan ditinjau perubahan yang terjadi dari asam amino yang berada di sisi aktif reseptor.

■ Hasil dan Pembahasan

Pemodelan Protein Mutan

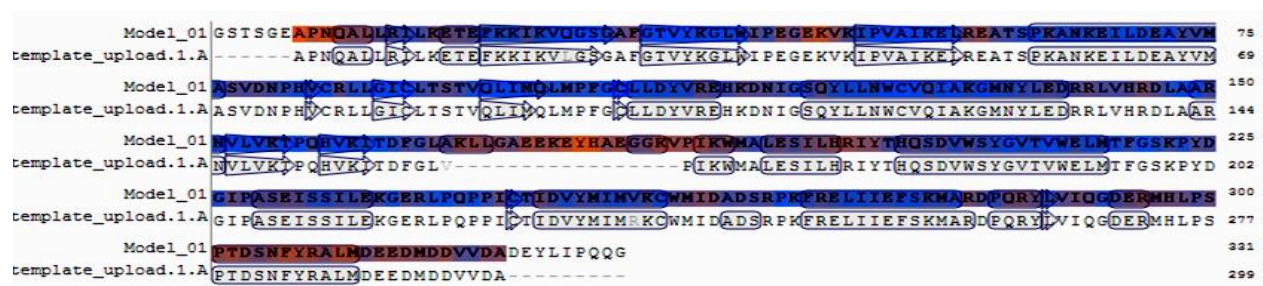
Sekuens mutan dibuat berdasarkan sekuens template dengan menginversi asam amino pada posisi L718Q, urutan sekuens dapat dilihat pada Tabel 1.

Protein dengan kode PDB 5D41 merupakan kristalografi dari kompleks inhibitor allosterik dengan EGFR yang telah memiliki 2 mutasi, yaitu T790M dan V948R. Protein tersebut dipilih menjadi templat untuk pemodelan karena protein tersebut memiliki resolusi yang rendah (2,15 Å) dan tingkat similaritas yang tinggi dengan sekuens

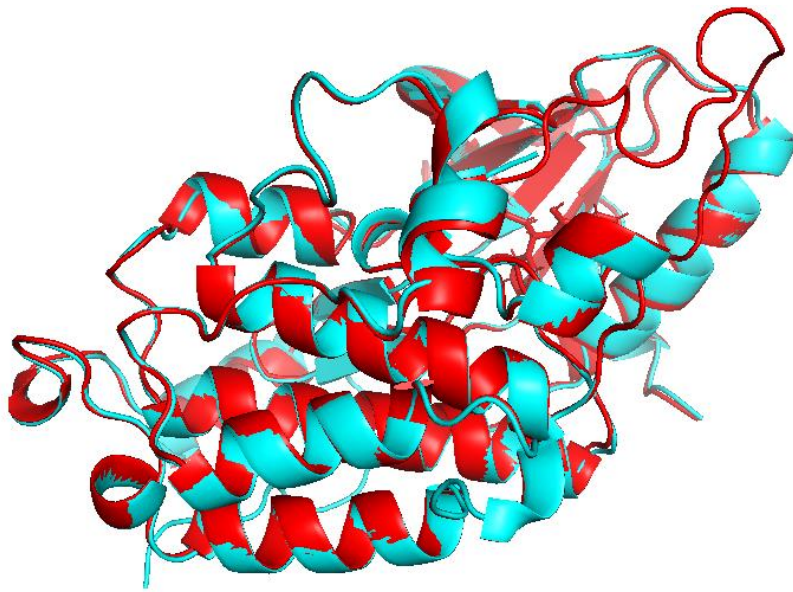
mutan (di atas 90%). Sekuens protein mutan kemudian di unggah ke *webservice* SWISS-MODEL expasy untuk dilakukan penjajaran (*alignment*) dan pembangunan model. Penjajaran dilakukan untuk mengetahui similaritas antara sekuens asam amino *template* dengan sekuens asam amino target. Selain sekuens protein target. Protein *template* pun juga diunggah karena pemodelan yang dilakukan adalah pemodelan berdasarkan *template* yang telah ada. Struktur 3D protein mutan dibangun setelah dilakukan penjajaran. Tampilan penjajaran sekuens target dan *template* dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Sekuens Mutan dan sekuens *template*

Nama dan jenis mutasi protein	Urutan sekuens
Protein Template 5D41 (T790M/V948R)	GSTSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIK ELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLIMQLMPFGCLL DYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKI TDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL MTFGSKPYDGIPIASEISSILEKGERLPQPPICITIDVYMIMRKCWMIDADSRPKF RELIIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADE YLIPQQG
Mutan EGFR (L718Q/T790M)	GSTSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVQSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIK ELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLIMQLMPFGCLL DYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKI TDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL MTFGSKPYDGIPIASEISSILEKGERLPQPPICITIDVYMIMRKCWMIDADSRPKF RELIIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADE YLIPQQG



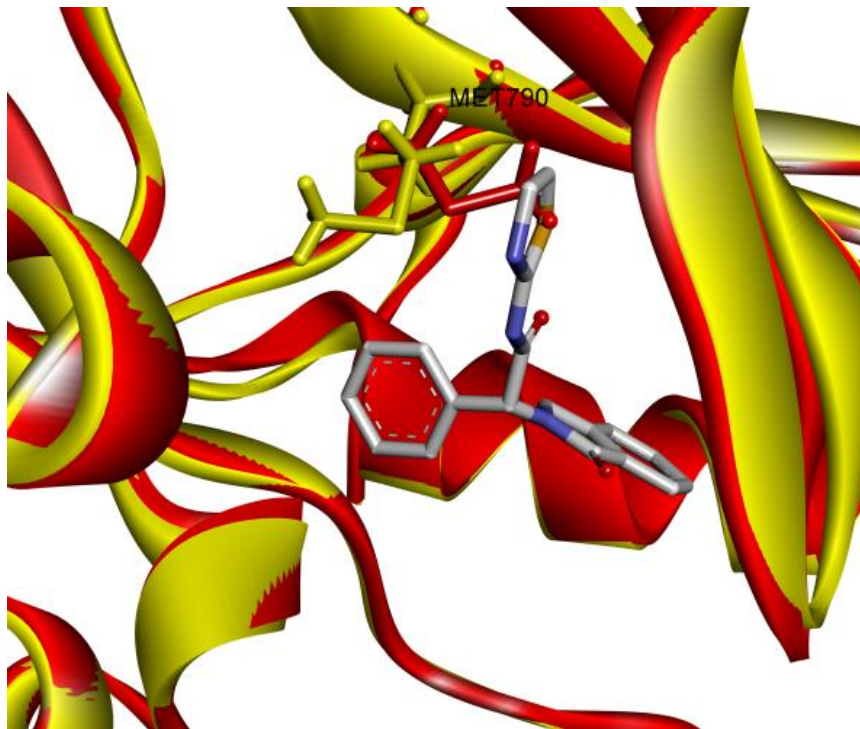
Gambar 1. Penjajaran sekuens oleh *webservice* Swiss-Model Expasy antara protein *template* dengan Mutan.



Gambar 2. Struktur protein templat (biru) di tumpang tindihkan dengan protein mutan (merah)

Tabel 2. Hasil evaluasi model protein mutan sebelum dan setelah minimisasi

Protein	Ramachandran Outlier	Clashscore	MolProbity Score
Mutan (L718Q/T790M)	0,32%	4,72	1,63
Setelah Minimisasi			
Mutan (L718Q/T790M)	0%	0,98	1,15



Gambar 3. Tinjauan inhibitor allosterik terhadap sisi aktif allosterik EGFR; Superposisi protein mutan (merah) dengan template (kuning).

Model mutan yang dibangun kemudian strukturnya diperbaiki menggunakan 3Drefine. Perbaikan struktur melalui 3Drefine melibatkan implementasi iteratif dua langkah, yaitu dengan mengoptimalkan jaringan ikatan hidrogen dan meminimalkan energi tingkat atom menggunakan kombinasi secara fisik. Perbaikan menggunakan 3Drefine akan menghasilkan 5 model, yang kemudian satu model terbaik yang memiliki skor terendah dipilih untuk dilakukan optimasi terhadap struktur protein yang dimodelkan. Struktur protein hasil pemodelan yang di tumpang tindihkan dengan protein templat dapat di lihat pada Gambar 2.

Optimasi dan Evaluasi Protein Model

Minimisasi atau optimasi dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan *realism physical*, dan akurasi dari rantai samping dari pemodelan homologi [14]. Setelah dilakukan minimisasi terhadap struktur protein model, struktur dari kedua protein model maupun templat kemudian di evaluasi. Struktur yang di evaluasi adalah struktur sebelum dilakukan minimisasi dengan setelah dilakukan minimisasi. Hasil evaluasi model dapat dilihat dalam Table 2. Skor Ramachandran *outlier*, *clashscore*, dan skor Molprobitiy menunjukkan hasil yang baik, dan setelah minimisasi skor tersebut menunjukkan hasil model protein yang lebih baik.

Nilai Ramachandran *outlier* menunjukkan berapa banyak residu yang berada pada daerah yang tidak disukai, sehingga semakin rendah nilainya maka model yang dibuat semakin baik [15]. Model mutan setelah di minimisasi menunjukkan hasil yang sangat baik dengan nilai Ramachandran *outlier* 0%, artinya tidak ada satupun residu yang berada pada daerah yang tidak disukai. Nilai *clashscore* menunjukkan jumlah dari *overlap steric* per 1000 atom [16]. Semakin rendah nilai *clashscore* maka model dianggap semakin baik, dan hasil minimisasi menunjukkan nilai *clashscore* yang sangat baik yaitu 0,98, lebih rendah dibandingkan sebelum di minimisasi.

Evaluasi Sisi Aktif Protein Mutan

Interaksi langsung antara gugus aminothiazole dari inhibitor allosterik dengan Metionin 790 dalam penelitian sebelumnya disebut sebagai penyebab utama dari selektivitasnya inhibitor allosterik terhadap resisten mutasi T790M. Protein yang di superposisikan dengan protein *template* untuk meninjau sisi aktif diantara keduanya dapat di lihat pada Gambar 3. Hasil visualisasi sisi aktif alosterik menunjukkan terjadinya perubahan rantain samping asam amino dari protein mutan. Apabila di tinjau lebih spesifik ke sisi aktif dari protein mutan tersebut, terjadi tabrakan sterik antara rantai samping dari Metionin 790 dengan ligan alami (inhibitor allosterik EGFR EAI001) pada protein mutan. Tabrakan sterik dapat menyebabkan menurunnya selektivitas dari inhibitor allosterik EGFR. Interaksi dari ligan atau senyawa pada sisi allosterik mutan tersebut dapat membuat terjadinya perubahan konformasi yang cukup signifikan, meskipun disini hanya dapat ditunjukkan perubahan yang terjadi dari rantai samping asam amino pada sisi aktif tersebut.

■ Kesimpulan

Pemodelan homologi terhadap protein mutan EGFR L718Q/T790M berhasil dilakukan dan memberikan hasil evaluasi struktur 3D yang baik, dari segi Ramachandran *outlier* *clashscore*, dan skor MolProbitiy. Ditinjau dari sisi aktif, protein mutan menunjukkan perubahan pada sisi aktif allosterik yang menyebabkan terjadinya tabrakan sterik dengan inhibitor dibandingkan dengan protein templat, yang dapat menyebabkan perubahan konformasi dari inhibitor allosterik.

■ Daftar Pustaka

- [1] J. Jeon *et al.*, "Smoking and Lung Cancer Mortality in the United States From 2015 to 2065: A Comparative Modeling Approach.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 169, no. 10, pp. 684–693, Nov. 2018.

- [2] Y. Tomonaga *et al.*, “Cost-effectiveness of low-dose CT screening for lung cancer in a European country with high prevalence of smoking-A modelling study.,” *Lung Cancer*, vol. 121, pp. 61–69, Jul. 2018.
- [3] J. C. Martín-Sánchez *et al.*, “Modelling lung cancer mortality rates from smoking prevalence: Fill in the gap.,” *Cancer Epidemiol.*, vol. 49, pp. 19–23, Aug. 2017.
- [4] H. Wao, R. Mhaskar, A. Kumar, B. Miladinovic, and B. Djulbegovic, “Survival of patients with non-small cell lung cancer without treatment: a systematic review and meta-analysis.,” *Syst. Rev.*, vol. 2, p. 10, Feb. 2013.
- [5] A. L. Visbal *et al.*, “Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: An analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 78, no. 1, pp. 209–215, 2004.
- [6] S. Bircan, H. Baloglu, Z. Kucukodaci, and A. Bircan, “EGFR and KRAS mutations in Turkish non-small cell lung cancer patients: a pilot study.,” *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 8, p. 87, Aug. 2014.
- [7] S. V Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, and D. A. Haber, “Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 169–181, Mar. 2007.
- [8] M. E. Arcila *et al.*, “Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay.,” *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 17, no. 5, pp. 1169–1180, Mar. 2011.
- [9] S. Wang, Y. Song, and D. Liu, “EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance.,” *Cancer Lett.*, vol. 385, pp. 51–54, Jan. 2017.
- [10] M. Bersanelli *et al.*, “L718Q Mutation as New Mechanism of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR-Mutated NSCLC.,” *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. e121-3, Oct. 2016.
- [11] N. Guex, M. C. Peitsch, and T. Schwede, “Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. SUPPL. 1, pp. 162–173, 2009.
- [12] H. Land and M. S. Humble, “YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1685, pp. 43–67, 2018.
- [13] V. B. Chen *et al.*, “MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.,” *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [14] K. Joo, J. Lee, and J. Lee, “Methods for accurate homology modeling by global optimization.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 857, pp. 175–188, 2012.
- [15] H. Wang, D. Avnir, and I. Tuvi-Arad, “Chiral Ramachandran Plots II: General Trends and Protein Chirality Spectra.,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 45, pp. 6395–6403, Nov. 2018.
- [16] J. M. Word *et al.*, “Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 285, no. 4, pp. 1711–1733, Jan. 1999.