

PENGARUH *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* (EGF) TERHADAP DINAMIK MIKROTUBUL MELALUI *NUCLEAR TRANSLOCATION PATHWAY*

Chomsa Dintasari Umi Baszary¹⁾, Moch. Sasmito Djati²⁾

¹⁾ *Jurusan Biologi FMIPA Univ. Pattimura Ambon
Jln. Ir. M. Putuhena Kampus Poka, Ambon
Email : chomsa_dub@yahoo.com*

²⁾ *Jurusan Biologi FMIPA Univ. Brawijaya Malang*

ABSTRAK

Reorganisasi *cytoskeleton* dengan stimulasi EGF melalui aktivasi EGFR dan menghasilkan pengaruh biologi melalui dua *signal pathway* yaitu *cytoplasmic pathway* menghasilkan regulasi *F-actin* melalui *crossstalk* dengan *mammalian Target of Rapamycin Complex-2* (mTORC2), dan *nuclear translocation pathway* melalui faktor transkripsi seperti *Signal and Transducer Activated Transcription-5* (STAT5) yang berinteraksi dengan EGFR atau *growth hormone*. Pembentukan mikrotubul oleh induksi *growth hormone* dengan penggabungan *ligand* dan reseptor *growth hormone* melalui aktivasi *janus kinase-2* (JAK2) *tyrosine kinase* melalui EGF aktivasi STAT1, STAT3, dan khususnya STAT5B. Mekanisme peranan EGF adalah sebagai mediator stabilisasi penyusunan tubulin sebagai dasar *cytoskeleton*. EGF menginduksi fosforilasi tyrosine dari STAT5B yang berkorelasi dengan aktivitas spesifik DNA-binding, STAT5B berikatan pada dinamik mikrotubul yang tinggi dan tidak terlihat pada asosiasi mikrotubul stabil. Setelah teraktivasi STAT5B selanjutnya lepas dari ikatan atau dapat berpindah segera ke arah ujung (-) mikrotubul dengan melibatkan protein motor *dynein*. Aktivasi pelepasan STAT5B dari mikrotubul melibatkan *dynein* melalui translokasi nukleus.

Kata kunci : dinamik mikrotubul, EGF, STAT

Growth Factor dan reseptornya memainkan peranan yang esensial dalam *signal pathway*. Induksi *growth factor* polypeptida seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF) menyebabkan reorganisasi *cytoskeleton*, pembentukan lamellipodia, dan perubahan morfologi sel (Yang, *et al.*, 2004). Regulasi EGF dalam memicu reorganisasi *cytoskeleton* melalui *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) yang berikatan dengan ligand dan menyebabkan terjadinya dimerisasi EGFR, fosforilasi beberapa residu *tyrosine*, dan stimulasi *signal pathway* seperti Ras/MAPK dan terjadinya Src kinase. Signal EGFR dilaporkan memiliki kemampuan untuk mengaktivasi famili Src seperti c-Src yang merupakan *downstream* molekul signal dari EGFR. Stimulus sinkronisasi endositosis sel terjadi segera setelah *prebinding* EGF dengan reseptornya. Segera setelah itu mikrotubul di bentuk dan EGFR ditemukan sepanjang *peripheral* mikrotubul (Kharchenko, *et al.*, 2007). Maturasi EGFR dan aktivasi EGFR-*dependent signaling* mempunyai peran penting dalam induksi ekspansi sel kumulatif melalui *pathway FSH-dependent* (Procházka, *et al.*, 2003).

Reorganisasi *cytoskeleton* dengan stimulasi EGF melalui mengaktivasi EGFR dan menghasilkan pengaruh biologi melalui dua *signal pathway* yaitu *cytoplasmic pathway* dan *nuclear translocation pathway*. *Cytoplasmic pathway* menghasilkan regulasi *F-actin* melalui *crossstalk* dengan *mammalian Target of Rapamycin Complex-2* (mTORC2) (Hay & Sonenberg, 2004; Wullschleger, 2006; Hung, *et al.*, 2008). Sementara melalui *nuclear translocation pathway* menghasilkan ekspresi gen pada sel hela seperti ketidakaturan penyusunan mikrotubul melalui faktor transkripsi seperti *Signal and Transducer Activated*

Transcription-5 (STAT5) yang berinteraksi dengan EGFR (Hung, *et al.*, 2008) atau *growth hormone* (Phung-Koskas *et al.*, 2005).

Cytoskeleton adalah skeleton seluler yang terdapat dalam sitoplasma pada semua sel, merupakan struktur yang dinamik untuk memelihara bentuk sel (Michie and Löwe, 2006). Selama ekspansi sel kumulatif terjadi penyusunan *cytoskeleton* (Motlik *et al.*, 1998; Marchal *et al.*, 2003). Mikrotubul sebagai salah satu komponen *cytoskeleton* mengambil bagian dalam pergerakan sel seperti transport vesikel dalam sitoplasma. Pergerakan itu merupakan hasil dari dinamik mikrotubul melalui polymerasi dan depolymerasi monomer α - dan β -tubulin untuk membentuk mikrotubul yang stabil (Lodish *et al.*, 2003). Pada sel hepar, pembentukan mikrotubul oleh induksi *growth hormone* dengan penggabungan *ligand* dan reseptor *growth hormone* melalui aktivasi *janus kinase-2* (JAK2) *thyrosine kinase* dalam fosforilasi tiga protein famili STAT seperti STAT1, STAT3, dan STAT5 (Phung-Koskas *et al.*, 2005).

Sistem mikrotubul dalam sel hewan terdiri atas dua komponen yaitu : 1) mikrotubul yang melekat pada sentromer merupakan mikrotubul bidang radial ke arah pinggir; dan 2) mikrotubul bebas yang terdistribusi secara acak dalam sitoplasma yang tidak berasosiasi dengan *microtubule-organizing centers* (MTOC) (Chernobel'skaia *et al.*, 2004). Subunit α -tubulin dan β -tubulin berikatan dengan *guanosine triphosphate* (GTP) dan ketika terbentuk dimer baru menjadi mikrotubul, β -tubulin berikatan dengan GTP dan mengalami hidrolisis menjadi *guanosine diphosphate* (GDP). Jika polymerasi lebih cepat daripada hidrolisis maka GTP akan menempati ujung (+) dan menyebabkan mikrotubul mengalami depolymerasi lebih cepat daripada polymerasi. Aktivitas Rho GTPase merupakan tahap perubahan *GTP-bound* dan *GDP-bound* dari regulasi *guanine nucleotide exchange factors* (GEF). Peningkatan perubahan *GDP-bound* menjadi *GTP-bound* oleh *GTPase-activating protein* (GAPs) dapat meningkatkan laju intrinsik hidrolisis *GTP-bound* (Guasch, *et al.*, 1998).

Dalam sel, dinamika mikrotubul diregulasi oleh *microtubule-associated protein* (MAPs) (Lodish *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 1999). Beberapa MAP merupakan regulator stabilitas mikrotubul seperti MAP4 dimana fosforilasinya diketahui sebagai satu-satunya mekanisme dalam regulasi MAP4-mikrotubul (Kremer *et al.*, 2005), sementara anggota MAP yang lain seperti *katanin* dan *stathmin* melakukan destabilitas mikrotubul. Kemampuan MAP untuk berikatan dengan mikrotubul dapat terjadi karena adanya fosforilasi MAP oleh *mitogen activating protein kinase* (MAPK). Destabilisasi MAP dengan *katanin* dengan merusak ikatan antara subunit tubulin atau *stathmin* menyebabkan peningkatan frekwensi penguraian mikrotubul yang mungkin karena adanya reduksi kelompok heterodimer (Lodish *et al.*, 2003). *Stathmin-1* atau *op-18* atau *STMN1* merupakan protein dengan berat 17 kDa mempunyai fungsi penting dalam regulasi protein dinamik mikrotubul. *Stathmin* berfungsi bila sel merespon kebutuhan regulasi remodeling mikrotubul yang cepat dari sistem *cytoskeleton* (Clement *et al.*, 2005).

Peranan penting mikrotubul pada kebanyakan sel eukariotik adalah menyediakan jalur untuk pergerakan organel intraseluler dan protein. Peran ini dimainkan oleh protein motor yang tergantung pada penggunaan *adenosine triphosphate* (ATP) dan aktivitas ATPase (Hall *et al.*, 1992). Organel yang bergerak dengan motor mikrotubul dapat diidentifikasi dalam dua kelas yaitu 1) yang bergerak ke arah ujung (+) dari mikrotubul seperti *kinesin* dan organel yang berasosiasi dengan *kinesin*, dan 2) motor organel ke arah ujung (-) mikrotubul seperti *dynein* sitoplasmik (Lane & Allan, 1999).

Growth factor dan reseptornya memainkan peranan yang esensial dalam signal pathway seperti EGF yang merupakan elemen yang mempunyai kemampuan sebagai pemicu reorganisasi *cytoskeleton* (Kharchenko, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2004). EGF dapat menginduksi STAT1 untuk translokasi nukleus dalam menghambat depolymerasi mikrotubul karena pengaruh *colchicine* sementara dengan interferon- α dan - γ menginduksi translokasi STAT1 tetapi tidak berhubungan dengan mikrotubul (Phung-Koskas, 2005). Stimulasi EGF

pada *Swiss mouse* memberi pengaruh terhadap sinergis antara *colchicine* dan *colcemid* yang berkorelasi dengan kecepatan penyusunan kembali mikrotubul (Otto *et al.*, 1981).

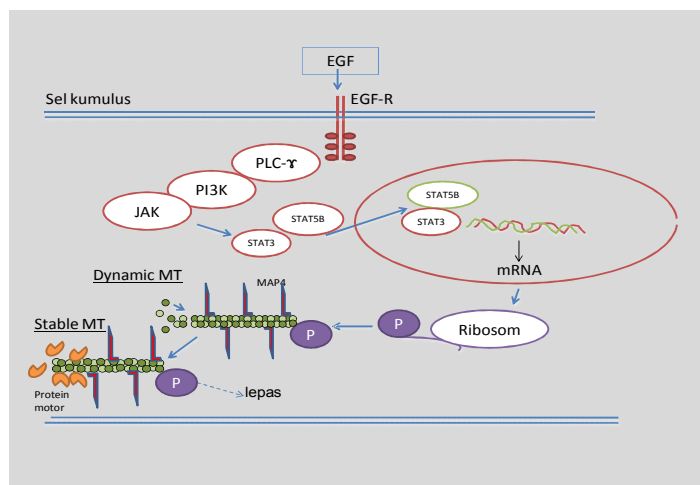
Mekanisme penghambatan oleh pengaruh EGF dibutuhkan untuk penyusunan mikrotubul secara penuh. Mekanisme pengaruh EGF adalah untuk mediasi stabilisasi penyusunan tubulin sebagai dasar *cytoskeleton*, dan induksi EGF menyebabkan PKC memfosforilasi tubulin dan meningkatkan penyusunan tubulin yang berkorelasi secara signifikan dengan perlindungan EGF pada stabilitas mikrotubul dan integritas penghalang (Banan *et al.*, 2002).

Pathway JAK/STAT penting untuk beberapa respon termasuk diferensiasi, proliferasi dan oncogenesis sehingga tidak mengherankan sejumlah regulator tetap ada untuk memodulasi *pathway* signal ini. Pengaruh negatif dan positif regulasi dari proses determinasi tergantung pada signal transduksi dari STAT. Pengaruh positif *pathway* JAK/STAT adalah terjadinya translokasi kedalam nukleus, pengaruh negatif *pathway* JAK/STAT terjadi karena mediasi fosforilasi autoinaktivasi oleh domain FERM dari JAK menyebabkan kehilangan sejumlah reseptor pada permukaan, disosiasi JAK dari reseptor, kompetisi heterodimer dan transport STAT keluar dari nukleus (Murray, 2007).

Dalam nukleus, dimer STAT5 secara langsung berinteraksi dengan elemen DNA yang spesifik melalui *DNA-binding domain*. STAT5 yang merespon gen menunjukkan bahwa STAT5 mengenal dan berikatan dengan sisi GAS dengan urutan umum TTCNNNGA (Pauku, 2003; Hennighausen & Robinson, 2008). Dimer STAT dapat mengalami *tandem* yang dihubungkan melalui domain N-terminal. Stabilitas kompleks STAT-GAS dapat tercapai untuk aktivasi transkripsi. Mekanisme STAT termasuk dalam proteksi dari apoptosis, proliferasi yang tidak tergantung *growth factor*, dan transformasi yang mungkin peran transkripsi gen diregulasi oleh STAT5 (Pauku, 2003).

Protein STAT dapat diaktivasi oleh EGF dengan menginduksi fosforilasi tyrosine dari STAT5B yang berkorelasi dengan aktivitas spesifik DNA-binding, dan juga residu tyrosine yang lain (Guren *et al.*, 2003). Overekspresi EGFR dan asosiasi dengan tyrosine kinase, c-Src, berkorelasi dengan peningkatan proliferasi seluler dan tumorigenesis yang dimediasi oleh fosforilasi tyrosine EGFR (Kloth *et al.*, 2003).

Setelah dinamik mikrotubul menjadi mikrotubul stabil, material seluler akan di transportasikan sepanjang mikrotubul dengan bantuan protein motor seperti *kinesin* dan *dynein*. *Dynein* merupakan protein motor yang pergerakannya ke arah ujung (-) dari mikrotubul. Dalam menjalankan fungsinya, *dynein* tidak dapat mengangkut material tanpa bantuan dari *dynelectin* suatu protein kompleks yang berhubungan di bagian rantai ringan dari *dynein* dan ikut berikatan dengan mikrotubul. Organisasi STAT5B mempunyai derajat yang tinggi pada *cytoskeleton* mikrotubul, tidak hanya terjadinya ikatan spesifik pada mikrotubul tetapi juga ikatan dengan signal yang lain. Setelah teraktivasi, STAT5B langsung lepas dari ikatan atau dapat berpindah segera ke arah ujung (-) mikrotubul yang melibatkan molekuler motor *dynein* dan mengalami traslokasi melalui membran nukleus. Aktivasi STAT5B oleh EGF tidak dapat terlepas dari peran EGFR yang dapat meningkatkan reorganisasi cytoskeleton dan atau memperbaiki regulasi mikrotubul dengan mengaktivasi STAT5B melalui *translokasi nucleus pathway*.



Gambar. Induksi EGF terhadap dinamik mikrotubul. Peningkatan dan/perbaikan dinamik mikrotubul oleh EGF dengan mengaktifkan STAT5B melalui translokasi ke dalam nukleus.

DAFTAR PUSTAKA

- Banan A., Fields J. Z., Talmage D. A., Zhang L., and Keshavarzian A., 2002, PKC- ζ Is Required In EGF Protection Of Microtubules and Intestinal Barrier Integrity Against Oxidant Injury, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G794–G808.
- Chernobel'skaia O.A., Alieva I.B., Vorob'ev I. A., 2004, The Dynamics Of Microtubule Repolymerization In A Cell: Rapid Growth From The Centrosome And Slow Recovery Of Free Microtubules, *Tsitologiya*. 2004 ;46 (6):531-544.
- Clément M.J., Jourdain I., Lachkar S., Savarin P., Gigant B., Knossow M., Toma F., Sobel A., and Curmi P.A., 2005, N-Terminal Stathmin-Like Peptides Bind Tubulin And Impede Microtubule Assembly, *Biochemistry*, 44 (44): 14616–25.
- Guasch R. M., Scambler P., Jones G. E., And Ridley A. J., 1998, Rho Regulates Actin Cytoskeleton Organization And Cell Migration, *Molecular And Cellular Biology*, (18)8:4761–4771
- Guren T.K., Abrahamsen H., Thoresen G.H., Babaie E., Berg T., and Christoffersen T., 1999, EGF-Induced Activation Of Stat1, Stat3, And Stat5b Is Unrelated To The Stimulation Of DNA Synthesis In Cultured Hepatocytes, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 258 (3) : 565-71.
- Guren T.K., Degard J., Abrahamsen H., Thoresen G.H., Susa M., Andersson Y., Stby E., Christoffersen T., 2003, EGF Receptor-Mediated, C-Src-Dependent, Activation Of Stat5b Is Downregulated In Mitogenically Responsive Hepatocytes, *J. Cell. Physiol.* 1(196): 113-23
- Hall E.S., Eveleth J., Jiang C., Redenbach D.M., and Boekelheide K., 1992, Distribution Of The Microtubule-Dependent Motors Cytoplasmic Dynein And Kinesin In Rat Testis, *Biology of Reproduction*, 46, 817-828.
- Hay N. and Sonenberg N., 2004, Upstream and Downstream on mTOR, *Genes & Development* 18; 1926 – 1945.
- Hennighausen L. and Robinson G. W., 2008, Interpretation of Cytokine Signaling Through The Transcription Factors STAT5A And STAT5B, *Genes & Development*, 22:711–721
- Hung L. -Y., Tseng J.T., Lee Y.-C., Xia W., Wang Y.-N., Wu M.-L., Chuang Y. H., Lai C.-H. and Chang W.-C., 2008, Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Interacts With Signal Transducer And Activator Of Transcription 5 (STAT5) In Activating *Aurora-A* Gene Expression, *Molecular Biology*.

- Kharchenko M. V, Aksyonov A.A., Melikova M.M., and Kornilova E.S., 2007, Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Endocytosis Is Accompanied By Reorganization Of Microtubule System In Hela Cells, *Cell Bioloy International*, 3 (4); 349-359.
- Kloth M.T., Laughlin K.K., Biscardi J.S., Boerner J.L., Parsons S.J., and Silva C.M., 2003, STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor, *The Journal of biological chemistry* 278(3):1671-9.
- Lane J.D. and Allan V. J., 1999, Microtubule-based Endoplasmic Reticulum Motility in *Xenopus laevis*: Activation of Membrane-associated Kinesin during Development, *Molecular Biology of the Cell*, 10 ; 1909–1922
- Lodish H., A.Berk, P.Matsudaira, C.A.Kaiser, M.Krieger, M.P.Scott, S.L.Zipursky, and J.Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*. W.H.Freeman, New York.
- Marchal R., Caillaud M., Martoriati A., Gérard N., Mermillod P., and Gouder G., 2003, Effect of Growth Hormone (GH) on In Vitro Nuclear and Cytoplasmic Oocyte Maturation, Cumulus Expansion, Hyaluronan Synthase, and Connexin 32 and 43 Expression, and GH Receptor Messenger RNA Expression in Equine and Poecine Species, *Biology of Reproduction*, 69, 1013 – 1022
- Michie and Löwe, 2006, Dynamic Filaments Of The Bacterial Cytoskeleton, *Annu. Rev. Biochem.* 75: 467–92.
- Motlik J., Procházka R., Nagyová E., Schellander K., and Brem G., 1998, Paracrine and Autocrine Regulation of Cumulus Expansion in Porcine Follicles, *Reprod. Dom. Anim.* 33
- Murray P. J. , 2007, The JAK-STAT Signaling Pathway: Input And Output Integration, *Brief Reviews, The Jurnal of Immunology*.
- Nguyen H.L., Gruber D., and Bulinski J.C., 1999, Microtubule-Associated Protein 4 (MAP4) Regulates Assembly, Protomerpolymer Partitioning And Synthesis Of Tubulin In Cultured Cells, *Journal of Cell Science* 112, 1813-1824
- Otto A.M., Ulrich M., Zumbt A., and De Asua L.J., 1981, Microtubule-Disrupting Agents Affect Two Different Events Regulating The Initiation Of Dna Synthesis In Swiss 3t3 Cells, *Cell Biology*, 78 (5) ; 3063-3067.
- Paukku K, 2003, Regulation Of Stat5 Activation, Academic Dissertation, Department Of Virology Haartman Institute And Division Of Biochemistry Department Of Biosciences University Of Helsinki Finland.
- Phung-Kokas T., Pilon A., Pou's C., Betzina C., Sturm M., Bourguet-Kondracki M., Durand G., and Drechou A., 2005, STAT5B-Mediated Growth Hormone Signaling Is Organized By Highly Dynamic Microtubules In Hepatic Cells, *The Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2) ; 1123–1131.
- Procházka R., Kalab P., and Nagyová E., 2003, Epidermal Growth Factor-Receptor Tyrosine Kinase Activity Regulates Expansion of Porcine Oocyte-Cumulus Cell Complexes In Vitro, *Biology of Reproduction* 68, 797 – 803
- Wullschleger S., Loewith R., and Hall M., 2006, mTOR Signaling in Growth and Metabolism, *Cell* 124 (3): 471-84.
- Yang Z., Bagheri-Yarmand R., Wang R-A., Adam L., Papadimitrakopoulou V.V., Clayman G. L., El-Naggar A., Lotan R., Barnes C.J., Hong W. K., and Kumar R., 2004 ,The Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) Suppresses c-Src and Pak1 Pathways and Invasiveness of Human Cancer Cells, *Clinical Cancer Research* (10) 658–667.