

PREDICTION OF ANTICANCER ACTIVITY OF RICIN-A THROUGH AUTOPHAGY PATHWAY USING MOLECULAR DOCKING ON BECLIN-1, LC3, AND p62

Irma Erika Herawati^{1,2*}, Ronny Lesmana^{3,4}, Jutti Levita², Anas Subarnas²

¹Jurusan Farmasi, Universitas Al Ghifari, Bandung-40293, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang-45363, Jawa Barat, Indonesia

³Laboratorium Fisiologi Molekuler, Universitas Padjadjaran, Sumedang-45363, Jawa Barat, Indonesia

⁴Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Sumedang-45363, Jawa Barat, Indonesia

*Corresponding author: irma.erika.h@gmail.com

ARTICLE HISTORY

Received: 2 November 2021

Revised: 24 December 2021

Accepted: 10 January 2022

Abstract

Autophagy is an adaptation process carried out as a defense in cellular responses, such as nutritional deficiencies or other metabolic stresses. The mechanism of autophagy is regulated by proteins called Autophagy Related Genes (ATG). Autophagy has also been widely associated with various diseases in humans, such as cancer and other degenerative diseases. Ricin is a toxic protein derived from the castor bean, *Ricinus communis* L., that has been explored for its potential as an anticancer via the activation of the caspases signaling pathway (apoptosis). This study was conducted to determine the binding mode that occurs between ricin-A and proteins that play a role in each step of the autophagy process (Beclin-1, LC3 or Light Chain 3, and p62/Sequestosome1). The protein-protein docking simulation was employed by using the ClusPro online server (<https://cluspro.org>). The results showed that ricin-A could bind to Beclin-1, LC3, and p62 by building hydrogen bonds with good affinity. We conclude that ricin-A plays an important role to modulate the autophagy process, thus, could be further developed as an anticancer phytopharmaceutical.

Key words: autophagy, autophagy-related genes, Beclin-1, ricin-A, *Ricinus communis* L.

INTERAKSI MOLEKULAR DARI RICIN-A DENGAN Beclin-1, LC3, DAN p62 PADA PROSES AUTOFAGI

Abstrak

Autofagi merupakan proses adaptasi yang dilakukan sebagai pertahanan dalam respon seluler, seperti kekurangan nutrisi atau stress metabolik lain. Mekanisme autofagi diregulasi oleh protein yang dinamakan *Autophagy-Related Genes* (ATG). Autofagi juga telah banyak dikaitkan dengan berbagai penyakit pada manusia, misalnya kanker atau penyakit degeneratif lainnya. Ricin merupakan protein toksik yang berasal dari biji jarak *Ricinus communis* L. dan banyak dieksplorasi untuk aktivitas antikanker melalui jalur pensinyalan caspase (apoptosis), namun belum ada penelitian pada jalur autofagi. Penelitian ini dilakukan untuk menelaah mode ikatan yang terjadi antara ricin-A dan protein-protein yang berperan pada setiap tahap proses autofagi (Beclin-1, LC3 atau *Light Chain 3*, dan p62/*Sequistosome1*). Metode yang digunakan adalah simulasi penambatan protein-protein menggunakan *server online* ClusPro (<https://cluspro.org>). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ricin-A dapat berinteraksi dengan Beclin-1, LC3, dan p62 melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan afinitas baik. Dapat disimpulkan bahwa ricin-A berperan penting dalam proses autofagi dan dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka terapi kanker.

Kata kunci: autofagi, *autophagy-related genes*, Beclin-1, ricin-A, *Ricinus communis* L.

Pendahuluan

Autofagi merupakan mekanisme katabolik yang berguna dalam mempertahankan homeostatis seluler dan respon terhadap stress metabolik. Autofagi terjadi di lisosom, di mana bagian-bagian dari sel akan mengalami degradasi. Terdapat tiga jenis autofagi, yaitu makroautofagi, mikroautofagi, dan autofagi yang dimediasi *chaperone*, di mana ketiganya dibedakan dari mekanisme pengiriman isi kargo ke lisosom.¹

Mekanisme dari autofagi diatur oleh protein terkait autofagi yang dinamakan ATG (*Autophagy Related Genes*), lebih dari 40 ATG telah teridentifikasi pada sel ragi, 15 diantaranya disebut protein inti ATG. Dengan mengidentifikasi protein ATG dan faktor lain yang berhubungan dengan autofagi, tidak hanya menambah pemahaman mengenai mekanisme dari autofagi, tetapi juga dapat menghasilkan penelitian yang baik untuk mengetahui protein penanda molekular dari proses autofagi.²

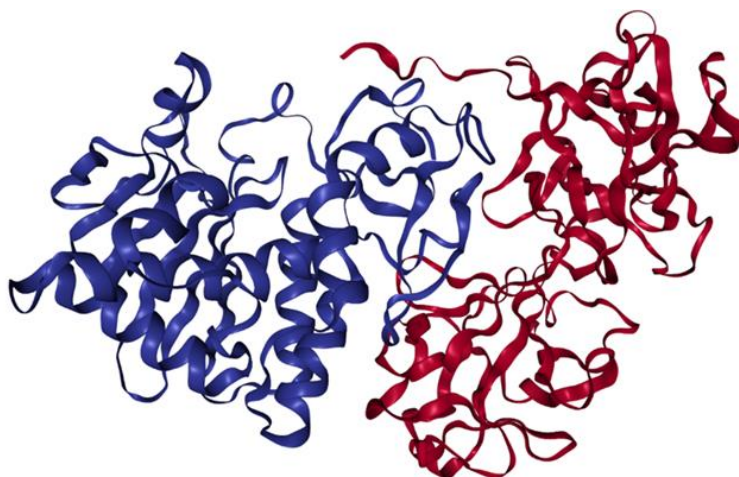
Fungsi autofagi yang paling utama adalah untuk beradaptasi terhadap kebutuhan metabolisme. Sebagai contoh autofagi diregulasi pada saat sel kekurangan nutrisi dan oksigen dengan mendegradasi makromolekul untuk menghasilkan nutrisi yang dibutuhkan sebagai sumber energi. Autofagi juga telah lama diketahui terkait erat dengan berbagai penyakit pada manusia, tetapi karena aktivitas autofagi pada manusia tidak dapat diukur dengan tepat, beberapa penelitian menunjukkan bahwa autofagi meningkat dan menurun pada beberapa kondisi tertentu.²

Protein target yang biasa digunakan untuk mengetahui proses autofagi diantaranya adalah Beclin-1, LC3 (*Light Chain*)3, dan p62/*Sequistosome1* (SQSTM1). Masing-masing protein tersebut berperan dalam tahapan proses autofagi, seperti inisiasi, elongasi, dan autolisosom.³ Hubungan antara kanker dan autofagi sangatlah kompleks. Autofagi memiliki peranan dalam melindungi terjadinya metastasis pada sel kanker, memberikan efek antitumorigenik pada sel normal. Autofagi juga dapat memasok nutrisi

ke sel tumor sehingga dapat mempromosikan kelangsungan hidup sel kanker. Peran autofagi yang saling bertolak belakang ini juga kemungkinan tergantung pada faktor selain protein ATG.⁴

Kebanyakan terapi penyakit kanker menggunakan agen kemoterapi yang menyebabkan kematian sel kanker melalui jalur apoptosis. Dampak penggunaan agen kemoterapi jalur ini adalah terjadinya resistensi sel kanker, sehingga diperlukan strategi terapi yang inovatif. Secara teoritis induksi kematian yang disebabkan autofagi, kemungkinan dapat berguna untuk sel kanker yang resisten terhadap apoptosis.⁴

Biji *Ricinus communis* mengandung protein ricin yang terdiri dari dua rantai, yaitu rantai A (bersifat toksik) dan rantai B (lektin yang kurang toksik).⁵ Ricin merupakan famili *ribosome-inactivating protein* (RIP) tipe II.⁶ *R. communis* telah dilaporkan memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker SKMEL28 34,1 mg/mL⁷, dan HaCaT 5,2 mg/mL.⁸ RIP mampu menginduksi kematian sel dengan jalur apoptosis.⁹ Ricin terlibat dalam inisiasi apoptosis melalui jalur intrinsik atau mitokondria, dimana caspase-9 sebagai inisiator dan caspase-3 sebagai eksekutor.⁷



Gambar 1. Struktur 3D ricin (kode PDB: 2AAI DOI: 10.2210/pdb2AAI/pdb dikristalkan oleh Rutenber et al., 1994 dengan resolusi 2,5 Å). Rantai A ditunjukkan dengan warna biru dan rantai B ditunjukkan dengan warna merah. diunduh dari <https://www.rcsb.org/structure/2AAI>.

Penelitian ini merupakan studi awal untuk menelaah potensi ricin-A pada jalur autofagi, dengan mengidentifikasi dan memprediksi mode ikatan antara ricin-A pada protein-protein yang berperan dalam setiap tahap proses autofagi tersebut.

Metode

Alat

Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah komputer dengan spesifikasi *processor intel* (R) *core i5-6200* CPU @12 GB *NVidia gforce* 920m.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur kristal makromolekul protein ricin-A yang diperoleh dari web Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org.pdb>) dengan kode PDB: 2AAI (DOI: 10.2210/pdb2AAI/pdb) (Gambar 1 dan 2), protein Beclin1

dengan kode PDB: 4DDP (DOI: 10.2210/pdb4DDP/pdb), protein LC3 dengan kode PDB: 5NUV (DOI: 10.1002/pdb5NUV/pdb), protein p62 dengan kode PDB: 6MIU (DOI: 10.2210/pdb6MIU/pdb).

Prosedur

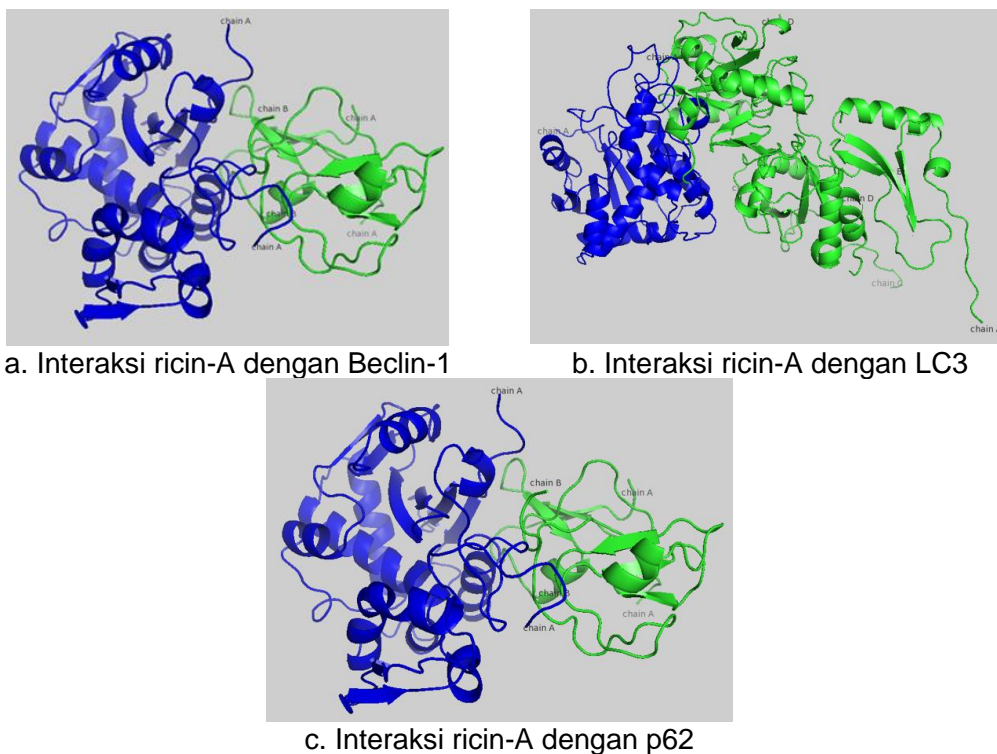
Penambatan molekul protein-protein dilakukan menggunakan server online ClusPro (<https://cluspro.org>), yang membutuhkan dua file protein dalam format PDB.¹¹ ClusPro akan memilih salah satu dari 10 model yang paling dekat dengan struktur asli, yang masing-masing diwakili oleh pusat kluster dengan populasi tertinggi yang memiliki konformasi energi yang rendah. Sistem perangkat lunak tersebut selanjutnya akan memilih kompleks protein-protein dengan koefisien energi yang paling setimbang atau stabil.¹²

Hasil

Struktur molekular 3D protein ricin-A ditampilkan di dalam Gambar 2. Ricin A merupakan protein hidrolase dengan dua rantai disulfida, masing-masing 30.000 dalton.¹⁰ Pada Gambar 2, struktur *alfa-heliks* digambarkan dengan gulungan pita berwarna merah, sedangkan *beta-sheet* berwarna biru muda.



Gambar 2. Struktur molekular 3D dari ricin-A, protein hidrolase yang diisolasi dari *Ricinus communis* (DOI: <http://doi.org/10.2210/pdb2AAI/pdb>).



Gambar 3. Interaksi ricin-A dengan (a) Beclin-1; (b) LC3; dan (c) p62

Tabel 1. Mode Ikatan dan Nilai Afinitas dari Ricin A- dengan Beclin-1, LC3, dan p62

Protein Target	Nilai Afinitas (kcal/mol)	Ikatan Hidrogen
Beclin-1	-895,8	Cys131A Lys157A Ser170B Pro171B
LC3	-856,6	Pro28A Leu53A Gln72B
p62	-789,5	Cys131A Lys157A Ser170B Pro171B

Pembahasan

Pada penelitian ini ditelaah mode ikatan antara ricin-A dengan Beclin-1, LC3, dan p62, yaitu protein-protein yang berperan pada proses autofagi. *Server* yang digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi adalah ClusPro, yang merupakan *server online*. Cluspro dipilih karena dapat melakukan penambatan protein dengan protein, yang tidak bisa dikerjakan oleh perangkat lunak AutoDock Vina ataupun Pyrx. Keuntungan menggunakan perangkat lunak ClusPro adalah 1) tidak memerlukan konformasi awal untuk senyawa yang akan ditambatkan; 2) tidak memerlukan daftar residu asam amino yang akan berinteraksi; 3) tidak berbayar; dan 4) telah menghasilkan lebih dari 400 publikasi artikel hasil penambatan molekul dengan ClusPro.¹²

ClusPro melakukan 3 langkah komputasi dalam menghasilkan konformasi molekul, yaitu.¹² :

1. *Rigid body docking* dengan menggunakan korelasi FFT (*Fast Fourier Transform*). FFT merupakan algoritma yang menghitung *discrete Fourier transform* (DFT) setiap sekuensi atau kebalikannya (IDFT). Analisis Fourier mengubah sinyal yang berasal dari domain orisinalnya untuk ditampilkan dalam domain frekuensi. DFT diperoleh dengan cara menguraikan nilai sekuensi tertentu menjadi komponen-komponen frekuensi yang berbeda-beda.¹³
2. Pengelompokan berbasis RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dari konformasi yang dihasilkan untuk menemukan kelompok terbesar yang akan mewakili model yang paling memungkinkan.
3. Penyempurnaan struktur yang terpilih.

Proses autofagi pada mamalia terbagi menjadi enam tahap utama (dengan protein-protein terkaitnya), yaitu inisiasi (aktivasi ULK1/ULK2), nukleasi (Beclin-1), elongasi (komplek ATG16L, pemrosesan LC3, dan fosfatidylethanolamine), *closure*, maturasi (LC3, Beclin-1, LAMP-1 dan LAMP-2, GTP-binding protein RAB7, ATPase SKD1), dan degradasi atau ekstrusi.¹⁴ Peningkatan Beclin-1 dan LC3 menunjukkan bahwa proses autofagi tahap nukleasi dan maturasi sedang terjadi.

Autofagi diawali dengan aktivasi kompleks protein kinase ULK1 dan ULK2, ATG13, FIP200, ATG101 dan komponen-komponen lainnya. Fosforilasi ATG13 oleh ULK1/2 memicu penggabungan atau asosiasi protein-protein tersebut untuk memulai proses autofagi. ULK1 terikat pada membran melalui domain C-terminal. *Downstream* kompleks ULK1/2 selanjutnya adalah lipid kinase, PIK3C3, yang menghasilkan PI(3)P, dan merupakan bagian dari kompleks protein lainnya, yaitu PIK3R4, Beclin-1, ATG14. Pada kompleks Beclin1-PIK3C3, Beclin-1 dapat berinteraksi juga dengan AMBRA1, UVRAG, dan VMP1 untuk mengontrol pembentukan dan/atau maturasi autofagosom. ULK1 memfosforilasi AMBRA1 dan Beclin-1 untuk memulai pembentukan autofagosom.¹⁵

Beclin-1 terdistribusi di dalam membran sel, sitoplasma, dan inti sel. Protein ini terdiri dari tiga struktur domain, yaitu domain BH3 (residu asam amino 114–123) pada N-terminus, *domain central coiled-coil* (CCD, dengan residu asam amino 144–269), serta *evolutionarily conserved domain* (ECD, dengan residu asam amino 244–337). Domain ECD berperan penting pada fungsi Beclin-1 dalam memediasi autofagi dan menghambat tumorigenesis.¹⁴

p62 merupakan substrat autofagi yang berperan sebagai penanda aktivitas autofagi. Ketika terjadi penghambatan *ubiquitin-proteasome system* (UPS), maka p62 akan meningkat levelnya dan mengalami fosforilasi, selanjutnya dapat memfasilitasi degradasi produk ubikuitinasi melalui proses autofagi. Ekspresi berlebih p62 meningkatkan agregasi protein ubikuitinasi dan memiliki efek protektif terhadap pertumbuhan sel, sedangkan menurunnya level p62 dapat memperburuk keadaan kerusakan sel, tergantung pada tipe selnya.¹⁶ Terhambatnya p62 pada sel kanker membuktikan terjadinya kerusakan parah pada sel kanker tersebut, karena p62 berfungsi melindungi pertumbuhan sel.

Dari simulasi penambatan protein-protein ini dibuktikan bahwa ricin-A membentuk ikatan hidrogen dengan Beclin-1 pada residu asam amino Cys131A, Lys157A, Ser170B, Pro171B dengan afinitas ikatan sebesar -895,8 kkal/mol (Gambar 3). Sementara ikatan hidrogen yang terjadi antara ricin-A dengan LC3 terjadi pada residu asam amino Pro28A, Leu53A, dan Gln72B dengan afinitas ikatan sebesar -856,6 kkal/mol. Ikatan hidrogen

antara ricin-A dan p62 terjadi pada residu asam amino Cys131A, Lys157A, Ser170B, Pro171B dengan afinitas ikatan sebesar $-789,5$ kcal/mol (Gambar 3).

Pembentukan ikatan hidrogen antara ricin-A dengan residu asam amino semua protein target (Beclin-1, LC3, dan p62) tersebut membuktikan bahwa ricin-A mampu mempengaruhi proses autofagi. Afinitas terkuat (energi ikatan $-895,8$ kkal/mol) adalah dengan Beclin-1 (protein autofagi tahap nukleasi dan maturasi). Ricin-A berinteraksi dengan Beclin-1 melalui ikatan hidrogen dengan residu asam amino di dalam domain CCD Beclin-1 (residu asam amino 144–269). Interaksi spontan dengan domain CCD Beclin-1 membuktikan bahwa ricin-A berperan menghambat proses autofagi pada tahap nukleasi dan maturasi dengan kekuatan afinitas tinggi. Lebih lanjut lagi, hasil simulasi penambatan protein-protein ini juga memvisualisasikan interaksi antara ricin-A dengan residu asam amino protein LC3 (berperan pada autofagi tahap maturasi) dan p62 (penanda aktivitas autofagi).

Namun demikian dari data penambatan protein-protein secara *in silico* ini belum dapat dipastikan, apakah ricin-A bekerja menginduksi atau menghambat autofagi, sehingga kelanjutan studi secara *in vitro* pada sel kanker masih perlu dilakukan. Selain itu, untuk mengetahui kestabilan kompleks protein-protein yang terbentuk dan jenis pola mode ikatannya apakah menyerupai inhibitor atau agonis, juga dapat ditelaah menggunakan simulasi dinamika molekul.

Penelitian penambatan molekul pada protein-protein yang berperan dalam proses autofagi masih sangat terbatas, namun demikian, sebuah artikel melaporkan interaksi antara senyawa aktif dari *Rhadiola crenulata* dengan Beclin-1, terjadi melalui ikatan hidrogen pada residu asam amino Lys214A, Val215D, Glu218A, Arg221A, Leu 222D, Leu223A, dan Glu225A.¹⁷ Interaksi protein-protein pada autofagi juga dilaporkan oleh Erbil-Bilir dan koleganya, yaitu antara protein endogen RACK1 dengan LC3.¹⁸

Lebih menarik lagi, sebuah penelitian terkini dari Putyrski dan koleganya yang diterbitkan tahun 2020 menyatakan bahwa LC3 memiliki area interaksi (dinamakan sebagai LC3 *interaction region* atau LIR), yang berisi kantung ikatan yaitu *hydrophobic binding pocket 1* atau HP1, yang terdiri dari residu asam amino Trp, Phe, atau Tyr, serta HP2 dengan residu Leu, Val, atau Ile.¹⁹

Kesimpulan

Dapat disimpulkan bahwa ricin-A berinteraksi dengan protein-protein yang berperan dalam proses autofagi, diantaranya yaitu Beclin-1 (protein tahap nukleasi dan maturasi), LC3 (protein tahap maturasi), dan p62 (penanda aktivitas autofagi). Mode ikatan yang terjadi adalah melalui pembentukan ikatan hidrogen. Di antara ketiga protein target tersebut, ricin-A berikatan paling kuat dengan Beclin-1 dengan menempati domain CCD (residu asam amino 144–269), yaitu membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino Cys131A, Lys157A, Ser170B, Pro171B. Dari studi *in silico* ini terbukti bahwa ricin-A dari biji jarak *Ricinus communis* berperan penting dalam proses autofagi dan dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka terapi kanker.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Padjadjaran atas dukungan finansial untuk publikasi melalui Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Padjadjaran. Penelitian ini merupakan bagian disertasi doktor dari penulis pertama di Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia.

Daftar Pustaka

1. Herawati IE, Lesmana R, Levita J, Subarnas A. Molecular interaction of ricin-a with caspase-3, caspase-8, caspase-9 and autophagy-related gene5 (ATG5) to understand its role as anticancer agent. *Rasayan J Chem.* 2021;14(3).
2. Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med.* 2020;1564:76.
3. Lesmana R, Sinha R, Singh B, Zhou J, Ohba K. Thyroid hormone stimulation of autophagy is essential for mitochondrial biogenesis and activity in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2016;157(1):23–38.
4. Liu E, Ryan K. Autophagy and cancer-issues we need to digest. *J Cell Sci.* 2012;125.
5. Herawati I, Levita J, Lesmana R, Subarnas A. Ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds: A review on its anticancer activity and the role of cytotoxicity enhancers. *Res J Pharm Technol.* 2022;15. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00067>
6. Worbs R. Apoptosis in cancer; from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1). Available from: <https://10.0.4.162/1756-9966-30-87>
7. Tyagi N, Tyagi M, Pachauri M, Ghosh P. Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. *Tumor Biol.* 2015;36(11). Available from: <https://10.0.3.239/s13277-015-4028-4>
8. Trung N, Tho N, Dung B, Nhung Hoang T, Thang N. Effects of ricin extracted from seeds of the castor bean (*Ricinus communis*) on cytotoxicity and tumorigenesis of melanoma cells. *Biomed Res Ther.* 2016;3(5):633–44. Available from: <https://10.0.29.179/s40730-016-0023-7>
9. Lord M, Jolliffe N, Marsden C, Pateman C, Smith D, Spooner R, et al. Ricin. *Mech Cytotox.* 2003;22:53–64. Available from: <https://10.0.8.117/00139709-200322010-00006>
10. Rutenber, Katzin B, Ernst S, Collins E, Misna D, Ready M, et al. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins.* 1991;10.
11. Kozakov D, Hall R, Xia B, Porter K, Padhorney D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc.* 2017;12(2). Available from: <https://10.0.4.14/nprot.2016.169>
12. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella S, Xia B, et al. Structure, Function, and Bioinformatics. *New Addit to ClusPro Serv Motiv by CAPRI.* 2017;85:3. Available from: <https://10.0.3.234/prot.25219>
13. Heideman M, Johnson D, Burrus C. Gauss and the history of the Fast Fourier Transform. *IEEE ASSP Mag.* 1984;1(4):14–21.
14. Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571–80. Available from: <https://10.0.4.14/cdd.2010.191>
15. Meijer A, Lorin S, Blommaert E, Codogno P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids.* 2015;47(10):2037–63. Available from: <https://10.0.3.239/s00726-014-1765-4>
16. Liu W, Ye L, Huang W. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016;21:29.
17. Li X, Haou Y, Wang X, Zhang Y, Meng X, Hu Y. To elucidate the inhibition of excessive autophagy of *Rhodiola crenulata* on exhaustive exercise-induced skeletal muscle injury by combined network pharmacology and molecular docking. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(2):296–305. Available from: <https://10.0.4.224/bpb.b19->

00627

18. Erbil-Bilir S, Kocaturk N, Yayli M, Gozuacik D. Study of protein-protein interactions in autophagy research. *J Vis.* 2017;127(e):55881. Available from: <https://dx.doi.org/10.3791/55881>
19. Putyrski M, Vakhrusheva O, Bonn F, Guntur S, Vorobyov A, Brandts C, et al. Disrupting the LC3 interaction region (LIR) binding of selective autophagy receptors sensitizes AML cell lines to cytarabine. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:208.