

Prediksi Kefatalan dari Mutasi *Missense* dan *Frameshift* pada Varian Gen *ULK2* Berpotensi Mengganggu Fungsi *Autophagy* pada Manusia

Erlan Pradan

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; erlanpradan11@gmail.com

Fadhilla Ika Herliana

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; fadhillaikahr@gmail.com

Vanisa Pricilia Putri

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; vanisapricilia1104@gmail.com

Tegar Adriansyah Putra Siregar

Departemen Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; tegaradriansyah@umsu.ac.id (koresponden)

ABSTRACT

The Unc-51 like kinase 2 (ULK2) protein plays a role in the formation of autophagosomes, a type of cellular compartment. ULK2 acts as an initiator in regulating the autophagy process, interacting with various other proteins in its regulation. ULK2 can experience disruptions in the process, one of which is caused by mutations. Genetic variations such as missense and frameshift mutations can cause changes in the three-dimensional structure of the protein, thereby disrupting cell performance and function. Therefore, the purpose of this study was to determine the distribution of genetic variations or mutations in the ULK2 gene in humans, as well as to determine the fatality rate of missense and frameshift mutations in ULK2 gene variants using PolyPhen-2 software. This type of study is a descriptive observational study with a bioinformatics analysis approach to predict the fatality rate of missense and frameshift mutations in ULK2 gene variants. The data source is genetic variant data of the ULK2 gene accessed and collected from the NCBI dbSNP (Database of Single Nucleotide Polymorphism) database. The research variables were analyzed using PolyPhen-2 software. The analysis results showed that 36% of ULK2 gene variants with missense and frameshift mutations were considered benign, 15% were possibly damaging, and 49% were probably damaging. Meanwhile, 27.27% of frameshift mutations in the ULK2 gene were considered benign, 13.63% were possibly damaging, and 59.09% were probably damaging. In conclusion, predicting the lethality of missense and frameshift mutations in ULK2 gene variants using PolyPhen-2 software has the potential to disrupt protein functionality and autophagy processes based on their lethality level.
Keywords: *Unc-51 like kinase 2; single nucleotide polymorphism; missense; frameshift; PolyPhen-2*

ABSTRAK

Protein *Unc-51 like kinase 2 (ULK2)* berperan dalam pembentukan *autophagosome*, salah satu jenis kompartemen seluler. ULK2 memiliki peran sebagai inisiator dalam mengatur proses *autophagy*, berinteraksi dengan berbagai protein lainnya dalam regulasi tersebut. ULK2 dapat mengalami gangguan dalam prosesnya, salah satunya disebabkan terjadinya mutasi. Variasi genetik seperti mutasi *missense* dan *frameshift* dapat menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi dari protein sehingga akan mengganggu kinerja dan fungsi sel. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui distribusi variasi genetik atau mutasi yang dimiliki oleh gen ULK2 pada manusia, serta untuk mengetahui tingkat kefatalan dari mutasi *missense* dan *frameshift* pada varian gen ULK2 dengan menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*. Jenis penelitian ini adalah deskriptif observasional dengan pendekatan analisis bioinformatika untuk mengetahui prediksi tingkat kefatalan mutasi *missense* dan *frameshift* dari varian gen ULK2. Sumber data merupakan data varian genetik gen ULK2 yang diakses dan dikumpulkan dari database NCBI dbSNP (*Database of Single Nucleotide Polymorphism*). Variabel penelitian dianalisis dengan piranti lunak *PolyPhen-2*. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen ULK2 yang mengalami mutasi *missense* dan *frameshift*, varian gen ULK2 yang mengalami mutasi *missense* menunjukkan bahwa 36% dianggap *benign*, 15% *possibly damaging*, dan 49% *probably damaging*. Adapun mutasi *frameshift* pada gen ULK2 memberikan hasil bahwa 27,27% dianggap *benign*, 13,63% *possibly damaging*, dan 59,09% *probably damaging*. Sebagai kesimpulan, prediksi kefatalan mutasi *missense* dan *frameshift* terhadap varian gen ULK2 menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2* berpotensi mengganggu fungsionalitas dari protein dan proses *autophagy* berdasarkan tingkat kefatalannya.

Kata kunci: *Unc-51 like kinase 2; single nucleotida polymorphism; missense; frameshift; PolyPhen-2*

PENDAHULUAN

Autophagy memiliki peran dalam fungsi sistem homeostasis tubuh dan imunitas, beroperasi pada berbagai tingkatan seluler.^(1,2) Proses *autophagy* terjadi dengan mengirimkan sinyal eukariotik melalui reseptor seluler, yang pada sistem imun diperantarai oleh makrofag, sel T dan sel B, yang bertujuan untuk merespons invasi patogen yang masuk ke dalam tubuh. *Autophagy* juga berkontribusi dalam mengatur sinyal-sinyal sistem imunitas adaptif, menjaga keseimbangan respon imun yang diinduksi dan diinhibisi.⁽³⁾

Autophagy terdiri dari tiga jenis utama, yaitu *macroautophagy*, *microautophagy*, dan *autophagy* terkait *chaperone*. Pada *macroautophagy* terjadi pembentukan organel perantara *autophagosome* yang ditandai oleh protein marker ATG8 (*Autophagy-related protein 8*)/LC3, serta keterlibatan beberapa protein mikrotanik seperti

ATG3, ATG5, ATG7, dan lainnya.^(4,5) Pada *microautophagy*, proses *autophagy* terjadi saat lisosom mengambil bagian kecil dari sitoplasma melalui invaginasi membran lisosom. Selanjutnya, pada *autophagy* terkait *chaperone*, terjadi translokasi langsung protein kompleks *autophagy* melintasi membran lisosom, dan mengenali motif protein yang akan didegradasi yaitu *KFERQ*.⁽⁶⁾

Unc-51 like kinase 2 (ULK2) berperan sebagai protein pada spesies manusia yang mengaktifasi *autophagy*, yang berasal dari protein *paralog* ATG1.^(7,8) ULK2 terletak pada kromosom 17p11.2, terdiri dari 97.107 pasang basa dan 1036 asam amino.^(9,10) ULK2 berperan dalam memicu aktivasi jalur sinyal yang merangsang pembentukan *autophagosome*. Dalam proses ini, protein yang diinduksi oleh ULK2 berinteraksi dan membentuk suatu kompleks protein yang dikenal sebagai kompleks ULK.⁽¹¹⁾ ULK2 bergerak ke tempat pembentukan *autophagosome* saat aktif dan mengatur perekrutan serta aktivasi *phosphatidylinositol-3 kinase class 3* (PI3KC3).⁽¹²⁾ PI3KC3 kemudian menghasilkan *phosphatidylinositol-3 phosphat* (PI(3)P), molekul sinyal yang menghubungkan faktor-faktor *downstream* terlibat dalam biogenesis *autophagosome*.⁽¹³⁾

Variasi-variasi genetik secara global didaftarkan dan dikumpulkan pada repositori publik (database) *NCBI dbSNP* (*Database of Single Nucleotide Polymorphism*). *NCBI dbSNP* merupakan bagian dari sistem pencarian dan pengambilan data berisi variasi *single nucleotide polymorphism* (SNP), *microsatellites*, dan *small-scale*.⁽¹⁴⁾ Variasi genetik seperti mutasi *missense* dan *frameshift* dapat menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi dari protein sehingga akan mengganggu kinerja dan fungsi sel.

Berdasarkan uraian masalah di atas, maka diperlukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui distribusi variasi genetik atau mutasi yang dimiliki oleh gen ULK2 pada manusia, serta untuk mengetahui tingkat kefatalan dari mutasi *missense* dan *frameshift* pada gen ULK2 dengan menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*.

METODE

Jenis penelitian ini adalah deskriptif observasional dengan pendekatan analisis bioinformatika untuk mengetahui prediksi tingkat kefatalan mutasi *missense* dan *frameshit* dari gen ULK2. Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (UMSU) Medan pada bulan Juni hingga November 2023.

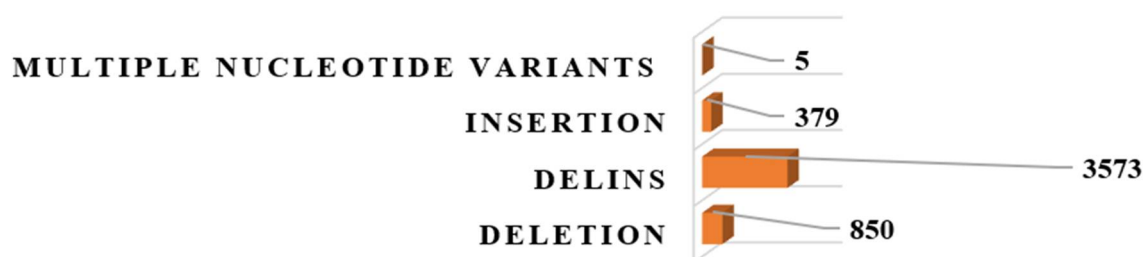
Sumber data yang dikumpulkan adalah data variasi genetik gen ULK2 yang berasal dari *database* *NCBI dbSNP* (*Database of Single Nucleotide Polymorphism*) yang diakses di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.⁽¹⁵⁾ Variabel penelitian adalah varian genetik mutasi *missense* dan *frameshit* dari gen ULK2 dengan skala nominal yang diukur dengan menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*. *PolyPhen-2* merupakan piranti lunak yang digunakan untuk memprediksi dampak potensial dari substitusi asam amino pada struktur dan fungsi protein dengan menghitung skor dari varian/sampel gen. *PolyPhen-2* dapat di akses di <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

Ukuran populasi variasi genetik gen ULK2 adalah sekitar 38.479 sampel, sedangkan ukuran sampel penelitian adalah sebanyak 100 mutasi *missense*, dan 22 mutasi *frameshift*. Selanjutnya data dianalisis secara kuantitatif dengan statistik deskriptif, kemudian disajikan dalam bentuk narasi dan tabel distribusi frekuensi.

Penelitian ini memanfaatkan data dari *database* internasional, sehingga tidak berkaitan langsung dengan responden. Dengan demikian tidak diperlukan hasil kaji etik yang berkenaan dengan pelibatan responden. Namun demikian, prinsip etik tetap dijunjung tinggi seperti menjaga kerahasiaan informasi, tidak menyalahgunakan data dan sebagainya.

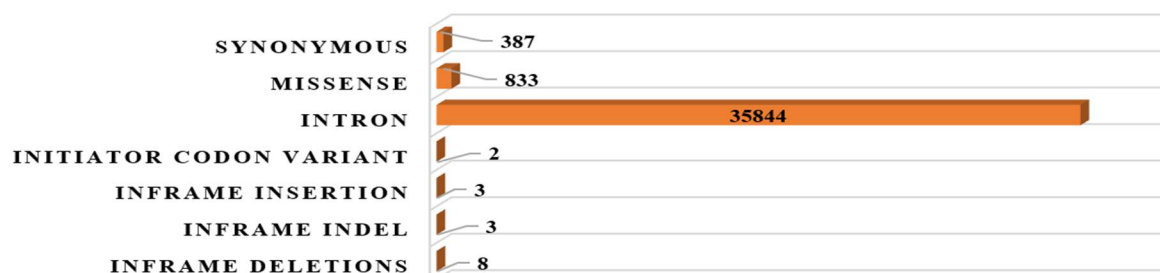
HASIL

Pada Gambar 1 diketahui bahwa data variasi genetik gen ULK2 yang diambil melalui *NCBI SNP* menunjukkan empat variasi, variasi yang paling terbanyak yaitu *delins* dengan yakni 3.573 sampel, lalu diikuti variasi dari *deletion* dengan 850 sampel, lalu diikuti variasi dari *Insertion* dengan jumlah 379 sampel, dan yang terakhir dari *multiple nucleotide variants* dengan jumlah 5 sampel.



Gambar 1. Distribusi dari variasi genetik gen ULK2 di database NCBI SNP

Pada Gambar 2 diketahui bahwa sub-kategori variasi genetik gen ULK2 terdapat tujuh sub-kategori variasi genetik, variasi yang paling terbanyak yaitu *intron* dengan 35.844 sampel, lalu *missense* dengan 833 sampel, lalu *synonymous* dengan 387 sampel, lalu *inframe deletion* dengan 8 sampel, lalu *inframe indel* dengan 3 sampel, lalu *inframe insertion* dengan 3 sampel, dan *initiator codon variant* dengan 2 sampel.

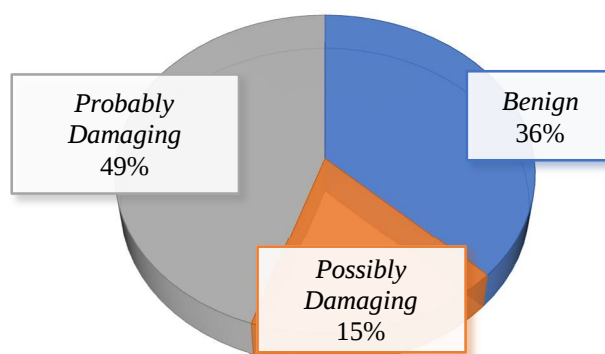


Gambar 2. Distribusi dari sub-kategori variasi genetik gen ULK2 di database NCBI SNP

Pada Tabel 1 dan Gambar 3 diketahui bahwa mutasi *missense* yang dianalisis menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2* menunjukkan 3 hasil, didapatkan hasil untuk *benign* dengan 36 sampel (36%), lalu untuk hasil *possibly damaging* dengan 15 sampel (15%), dan kemudian hasil terbesar adalah *probably damaging* dengan 49 sampel (49%).

Tabel 1. Distribusi mutasi *missense* gen ULK2 menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*

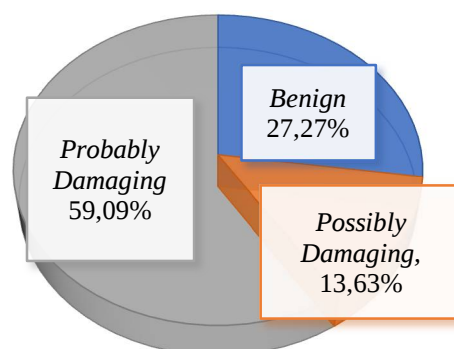
Range	Hasil	Frekuensi	Persentase
0,000 - 0,384	<i>Benign</i>	36	36
0,457 - 0,943	<i>Possibly Damaging</i>	15	15
0,961 - 1,000	<i>Probably Damaging</i>	49	49



Gambar 3. Mutasi *missense* menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*

Tabel 2. Distribusi frekuensi mutasi *frameshift* gen ULK2 menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*

Range	Hasil	Frekuensi	Persentase
0,000 - 0,064	<i>Benign</i>	6	27,27
0,891 - 0,941	<i>Possibly Damaging</i>	3	13,63
0,968 - 1,000	<i>Probably Damaging</i>	13	59,09



Gambar 4. Mutasi *frameshift* menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2*

Pada Tabel 2 dan Gambar 4 diketahui bahwa mutasi *frameshift* yang dianalisis menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2* menunjukkan 3 hasil, didapatkan hasil untuk *benign* dengan jumlah 6 sampel (27,27%), lalu untuk hasil *possibly damaging* dengan jumlah 3 sampel (13,63%), dan kemudian hasil terbesar adalah *probably damaging* dengan jumlah 13 sampel (59,09%).

PEMBAHASAN

Informasi mengenai variasi genetik pada gen ULK2 pada manusia diambil dari basis data NCBI dbSNP. Gen ULK2, dengan ID: 9706, memiliki sekuens protein yang diambil dari *UniProt* dengan ID: Q8IYT8. Basis data untuk gen ULK2 melaporkan adanya total 38.479 SNP. Dalam konteks penelitian ini, SNP digunakan sebagai penanda nukleotida tunggal. Oleh karena itu, SNP *missense* dan *frameshift* yang dipilih untuk penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki efek merusak dan dampaknya terhadap karakteristik fenotipik dari masing-masing protein yang dihasilkan oleh gen tersebut.

Prediksi terhadap SNP dapat dilakukan menggunakan berbagai piranti lunak, seperti *PolyPhen-2*, SIFT, PROVEAN, SNAP, PhD-SNP, dan SNP&GO.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Keenam piranti lunak tersebut digunakan pada penelitian terkait SNP pada gen DEFB1.⁽¹⁹⁾ Analisis nsSNP pada gen DEFB1 pada mutasi *missense*, dari total 86 nsSNP *missense* ditemukan 10 nsSNP yang memiliki potensi merusak (*damaging*), yang disebabkan oleh adanya SNP *missense* pada gen DEFB1.⁽¹⁹⁾

Dalam penelitian analisis *in silico* mengenai lokasi ekspresi gen dan SNP pada reseptor glukagon seperti *peptide 1* (GLP-1R), empat piranti lunak, yaitu SIFT, *PolyPhen-2*, PROVEAN, dan PhD-SNP, digunakan untuk memahami struktur dan fungsi protein. Dalam upaya untuk menyelidiki dampak dari 13 *missense* SNP nsSNP terhadap fungsi dan stabilitas protein GLP-1R, mengungkapkan bahwa mutasi *missense* dapat menghambat kestabilan dan mengubah fungsi protein GLP-1R.⁽²⁰⁾

Dalam penelitian analisis *in silico* mengenai nsSNP pada gen KLK-2 manusia yang terkait dengan kanker prostat, penelitian ini menggunakan berbagai perangkat lunak seperti SIFT, *PolyPhen-2*, PROVEAN, MUpro, dan I-Mutant2.0. Dari total 196 *missense* nsSNP yang dianalisis, 47 dianggap merusak (*damaging*), seperti yang diperkirakan oleh SIFT, *PolyPhen-2*, dan PROVEAN. Selain itu, terdapat mutasi pada tiga titik (M1T, M1R, dan L6P) pada sinyal peptida yang mengodekan gen KLK-2, dan mutasi pada satu titik (H65Y) pada situs aktif yang juga dianggap merugikan. Analisis oleh MUpro dan I-Mutant2.0 menunjukkan bahwa M1T menyebabkan penurunan stabilitas, sementara L6P menghasilkan peningkatan stabilitas. SNAP dan SNAP&GO hanya memperkirakan M1T sebagai netral, namun penggantian H65Y oleh keduanya memperkirakan efek dan risiko penyakit.⁽²¹⁾

Selanjutnya, untuk membedakan penelitian mengenai SNP ini dari penelitian SNP lainnya, penelitian ini menggunakan gen ULK2 terhadap SNP *missense* dan *frameshift*. Analisis dilakukan menggunakan piranti lunak *PolyPhen-2* untuk menyelidiki efek mutasi dari *missense* dan *frameshift*. Hasil analisis *PolyPhen-2* pada varian gen ULK2 yang mengalami mutasi *missense* dan *frameshift* masing-masing menunjukkan hasil terbesar adalah *probably damaging*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dapat disimpulkan bahwa terdapat dampak kefatalan dari mutasi *missense* dan *frameshift* pada gen ULK2. Dengan merujuk pada hasil penelitian dan diskusi yang telah dilakukan, dapat disimpulkan yaitu dengan menggunakan analisis bioinformatika, ditemukan potensi bahwa mutasi *missense* dan *frameshift* pada gen ULK2 dapat merusak fungsi *autophagy*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P. Autophagy in major human diseases. *EMBO J*. 2021;40(19).
2. Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med*. 2020;383(16):1564–76.
3. Paik S, Jo EK. An interplay between autophagy and immunometabolism for host defense against mycobacterial infection. *Front Immunol*. 2020;11:603951.
4. Tamargo-Gómez I, Fernández ÁF, Mariño G. Pathogenic single nucleotide polymorphisms on autophagy-related genes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):1–42.
5. Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero MDC, Flores-Morelos DS, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez AM. Autophagy: A key regulator of homeostasis and disease: an overview of molecular mechanisms and modulators. *Cells*. 2022;11(15):1–40.
6. Galluzzi L, Green DR. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery. *Cell*. 2019;177(7):1682–99.
7. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*. 2017;61(6):585–96.
8. Demeter A, Romero-Mulero MC, Csabai L, Ölbei M, Sudhakar P, Haerty W, et al. ULK1 and ULK2 are less redundant than previously thought: computational analysis uncovers distinct regulation and functions of these autophagy induction proteins. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–17.
9. Kang WS, Lee SM, Hwang D, Park HJ, Kim JW, Shen L. Association between Unc-51-like autophagy activating kinase 2 gene polymorphisms and schizophrenia in the Korean population. *Med (United States)*. 2022;101(5):E28745.
10. Zhang RR, Liang L, Chen WW, Wen C, Wan BS, Luo LL. ULK1 polymorphisms confer susceptibility to pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019;23(2):265–71.

11. Cheng H, Yang ZT, Bai YQ, Cai YF, Zhao JP. Overexpression of Ulk2 inhibits proliferation and enhances chemosensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2019;17(1):79–86.
12. Chaikuad A, Koschade SE, Stolz A, Zivkovic K, Pohl C, Shaid S, et al. Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK1/2). *Biochem J.* 2019;476(5):875–87.
13. Kumar M, Papaleo E. A pan-cancer assessment of alterations of the kinase domain of ULK1, an upstream regulator of autophagy. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–18.
14. Wieland J, Buchan S, Sen Gupta S, Mantzouratou A. Genomic instability and the link to infertility: A focus on microsatellites and genomic instability syndromes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2022;274(June):229–37.
15. Warmadewi DA. Buku ajar mutasi genetik. *Mutasi Genet.* 2017;15–16(Mutasi):1–53.
16. Sim N, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng P. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research.* 2012; 40.
17. Choi Y, Sims G, Murphy S, Miller J, Chan A. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE.* 2012; 7.
18. Choi Y. A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein. *Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine.* 2012;1(1):12-18.
19. Venkata Subbiah H, Ramesh Babu P, Subbiah U. In silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of human DEFB1 gene. *Egypt J Med Hum Genet.* 2020;21(1).
20. Maliza R, Santoso P, Arya B, Tofrizal A, Pratiwi R. In Silico Analysis of Gene Expression Location and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of The Glucagon Like Peptide 1 Receptor (GLP-1R). *HAYATI J Biosci.* 2023;30(2):281–91.
21. Yousefi T, Mir SM, Asadi J, Tourani M, Karimian A, Maniati M, et al. In silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphism in a human KLK-2 gene associated with prostate cancer. *Meta Gene.* 2019;21(November 2018):100578.