

Peran Sinyal Ephrin-B2/EPH-B4 pada Angiogenesis Postnatal

Elvin C. Angmalisang

Bagian Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado
Email: eangmalisang@unsrat.ac.id

Abstract: Angiogenesis is the process of developing new blood vessels that play an important role in embryogenesis as well as postnatal period. The postnatal angiogenesis is regulated by pro- and anti-angiogenic factors and several signals, one of which is the ephrin/Eph signal. Ephrin-B2 and its receptor EphB4 are transmembrane tyrosine kinase (RTKs) receptors which have an important role in angiogenesis inter alia promoting angiogenesis sprouting and participating in blood vessel maturation (remodeling and stabilization).

Keywords: angiogenesis, Ephrin-B2, EphB4, EphrinB2/EphB4 signaling

Abstrak: Angiogenesis adalah proses perkembangan pembuluh darah baru yang berperan penting pada embriogenesis, dan juga saat postnatal. Proses postnatal angiogenesis diregulasi oleh faktor-faktor pro- dan anti-angiogenik serta sinyal-sinyal, salah satunya ialah sinyal ephrin/Eph. Ephrin-B2 dan reseptornya EphB4 merupakan reseptor tirosin kinase (RTKs) transmembran yang berperan penting pada angiogenesis, yaitu untuk mempromosikan angio-genesis *sprouting*, serta berpartisipasi dalam pematangan pembuluh darah (*remodeling* dan stabilisasi).

Kata kunci: angiogenesis, Ephrin-B2, EphB4, sinyal EphrinB2/EphB4

Pendahuluan

Dewasa ini angiogenesis telah menjadi perhatian para peneliti di bidang kedokteran. Kondisi patologik dan perkembangan berbagai penyakit dapat dipahami melalui proses angiogenesis yang ditinjau dari berbagai aspek.¹ Angiogenesis *postnatal* sering terjadi pada saat penyembuhan luka. Luka dapat terjadi kapan saja dalam kehidupan. Tanpa angiogenesis, maka tidak akan terjadi pertumbuhan jaringan untuk proses penyembuhan luka. Demikian pula halnya dengan tumor, jaringan tumor tidak akan tumbuh bila tidak terjadi angiogenesis.²

Angiogenesis adalah proses perkembangan pembuluh darah baru yang berperan penting pada embriogenesis dan juga saat *postnatal*. Pada angiogenesis *postnatal*, sel-sel endotel dapat diaktifkan oleh induksi cedera jaringan, siklus hormon seperti pada kehamilan dan ovulasi, atau induksi pertumbuhan pembuluh darah pada tumor.³

Proses *postnatal* angiogenesis diregulasi oleh faktor-faktor pro- dan anti-angiogenik serta sinyal-sinyal yang meregulasinya. Faktor-faktor angiogenesis tersebut antara lain VEGF, FGF, IL-8, angiopoietin, TGF- α , TGF- β , trombospodin, dan interleukin¹, sedangkan sinyal-sinyal yang meregulasinya ialah notch/delta, ephrin/Eph reseptor, *round-about/slit*, dan netrin/UNC famili reseptor.⁴

Pada berbagai penelitian yang telah dilakukan, *knock-out* pada beberapa molekul dapat memengaruhi proses angiogenesis, salah satunya ialah *knock-out* pada molekul Ephrin-B2 akan menyebabkan gangguan proses angiogenesis.⁴ Oleh karena itu, Ephrin-B2 mulai diteliti perannya pada angiogenesis.

Ephrin-B2 dan reseptornya EphB4 diketahui mempunyai peran penting dalam perkembangan sistem kardiovaskular dan juga berkontribusi pada fungsi struktur pembuluh darah, walaupun mekanisme

sebenarnya masih belum jelas. Reseptor Eph adalah protein yang termasuk famili reseptor tirosin kinase (RTKs) transmembran⁵ dan ephrin sebagai ligannya juga merupakan protein yang terikat pada membran.⁴ Sinyal ephrin-B2/EphB4 merupakan sinyal dua arah. Ketika ephrin-B2 terikat pada reseptor EphB4, maka EphB4 akan menginduksi sinyal 'forward' dan ephrin-B2 akan menyebabkan terjadinya sinyal 'reverse' pada sel dimana dia berada.⁵ Kedua sinyal ini akan mempromosikan angiogenesis *sprouting*, dan juga berpartisipasi dalam pematangan pembuluh darah (*remodeling* dan stabilisasi).⁶

Angiogenesis

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada. Angiogenesis merupakan tahap penting pada proses penyembuhan luka² dan pada etiologi dari berbagai penyakit, seperti psoriasis, retinopati diabetik, dan keganasan.⁴ Dalam hal penyembuhan luka, pembuluh darah baru berperan pada formasi jaringan granulasi yang mendukung pertumbuhan jaringan dengan oksigen dan nutrisi.²

Angiogenesis merupakan suatu proses perkembangan yang kompleks meliputi degradasi membran basalis melalui sekresi protease, proliferasi sel endotel, migrasi, pembentukan tabung pembuluh darah,⁴ dan diferensiasi sel-sel endotel. Angiogenesis diaktifkan oleh sinyal dari jaringan target. Sinyal-sinyal aktivasi merupakan faktor-faktor terlarut yang reseptornya lebih dominan berada di sel-sel endotel. Faktor yang terpenting ialah VEGF dan faktor regulasinya HIF-1 α , yang menstimulasi transkripsi gen VEGF. Faktor pertumbuhan lain yang penting, seperti aFGF dan bFGF, dapat juga menginisiasi angiogenesis, namun mereka tidak hanya memengaruhi sel-sel endotel tapi juga tipe sel lain. Faktor pertumbuhan yang juga secara spesifik memengaruhi sel-sel endotel melibatkan empat anggota dari famili angiopoietin dan setidaknya satu anggota famili ephrin. Faktor-faktor tersebut mengoperasikan koordinasi tingkat tinggi untuk membentuk pembuluh yang fungsional. Selanjutnya,

diperlukan juga faktor-faktor yang tidak spesifik untuk sel-sel endotel seperti PDGF dan TNF- β .⁷ Sinyal-sinyal yang juga meregulasi angiogenesis ialah notch/delta, ephrin/Eph reseptor, *roundabout/slit*, dan netrin/UNC famili reseptor.⁴

Dalam penyembuhan luka, terjadi kaskade angiogenesis pada tahap selular dan molekular. Permukaan sel endotel memiliki reseptor yang dapat mengikat faktor angiogenesis pada pembuluh darah yang sudah ada (pembuluh induk). Faktor pertumbuhan yang telah terikat pada reseptor akan mengaktifkan jalur-jalur sinyal di dalam sel endotel. Enzim proteolitik dilepaskan oleh sel-sel endotel yang teraktivasi, sehingga melarutkan membran basalis di sekitar pembuluh induk. Sel-sel endotel berproliferasi dan bertunas ke arah luar melalui membran basalis, kemudian sel-sel ini bermigrasi ke daerah luka menggunakan integrin ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, dan $\alpha\beta1$) yang merupakan molekul adesi permukaan sel. Matriks metaloproteinase (MMPs) melarutkan matriks jaringan sekitar pada bagian tunas pembuluh darah. Tunas pembuluh darah membentuk saluran tubulus yang berhubungan untuk membentuk simpul vaskular yang selanjutnya berdiferensiasi menjadi cabang arteri dan vena. Pembuluh darah yang baru dimaturasi oleh rekrutmen sel-sel mural (sel-sel otot polos dan perisit) untuk menstabilkan arsitektur dari vaskular. Sebagai hasil akhir, darah dapat mengalir pada pembuluh darah matur yang stabil.⁸

Ephrin dan Reseptor Eph

Reseptor Eph adalah protein yang termasuk famili reseptor tirosin kinase (RTKs) transmembran⁵ dengan ephrin sebagai ligannya, yang juga terikat pada membran.⁴ Homolog reseptor Eph dan ligan ephrin telah diidentifikasi pada spesies vertebrata dan invertebrata seperti mencit, *Xenopus laevis*, *zebrafish*, dan *Caenorhabditis elegans*.⁹

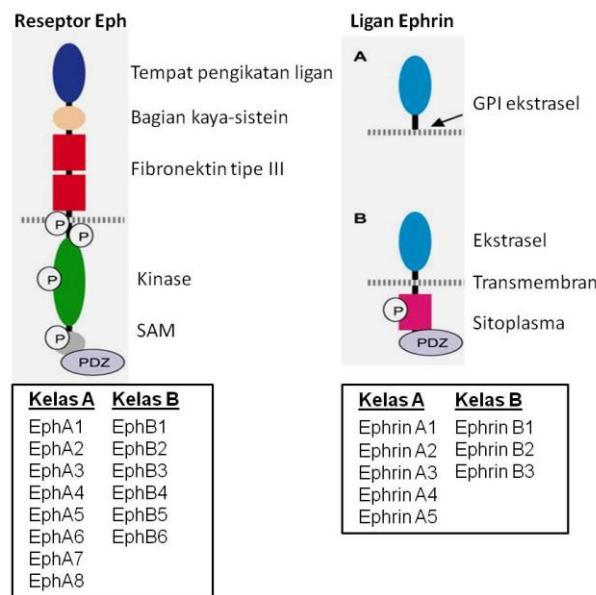
Reseptor Eph dibagi menjadi dua subkelas, yaitu kelas A dan B, tergantung dari tipe interaksinya dengan ligan ephrin.⁴ Secara umum, reseptor Eph kelas A (EphA) terikat pada jangkar GPI ligan (ephrinA),

sedangkan reseptor Eph kelas B (EphB) terikat pada ligan ephrin yang mengandung domain transmembran (ephrinB).⁹ Struktur skematis dari reseptor Eph dan ligan ephrin dapat dilihat pada Gambar 1.

Sama halnya dengan tipe RTK lainnya, reseptor Eph kelas A dan B mempunyai domain transmembran tunggal. Regio ekstrasel reseptor Eph terglykosilasi, dan mengandung domain pengikat ligan yang mengandung motif seperti-imunoglobulin, diikuti oleh sebuah domain yang kaya-sistein dan dua pengulangan fibro-nektin III. Regio intrasel terdiri dari regio jukstamembran, domain tirosin kinase tunggal, dan motif pengikat PDZ (PDS-95 *post-synaptic density protein, disc large, zona ocludens tight junction protein*) dalam region non-katalitik dari terminal-COOH. Domain kinase dan region jukstamembran mengandung residu tirosin, dan fosforilasi dari residu tirosin ini menciptakan tempat masuk untuk interaksi dengan protein sinyal yang mengandung domain SH2/SH3

(Src-Homology-2/3). Motif pengikat-PDZ mengikat protein yang mengandung domain PDZ, yang tersedia sebagai *scaffold* untuk pertemuan kompleks protein-protein sinyal di membran.⁹

Eph dan ephrin mempunyai hubungan yang kompleks. Ikatan reseptor-ligan sangat tinggi promiskuitasnya dalam setiap subkelas dan beberapa juga antara anggota dari subkelas yang berbeda.⁵ Sebagai tambahan dari perannya sebagai ligan konvensional untuk RTK-nya, yang disebut sebagai *'forward signaling'*, ephrin memiliki kemampuan seperti-reseptor untuk transduksi sinyal ke dalam sel tempatnya berada yang disebut *'reverse signaling'*.⁵ Karena itu sinyal Eph/ephrin sering disebut sebagai *bi-directional signaling* (sinyal dua-arah).⁹ Selama kontak ephrin pada sel-sel berdekatan, Eph menginisiasi sinyal *'forward'* oleh autofosforilasi dari beberapa residu tirosin pada domain tirosin kinase intrasitoplasma.



Gambar 1. Domain struktur dan sinyal dari reseptor Eph dan ligan ephrin. Jangkar-GPI ephrin-A dan ligan transmembran ephrin-B berinteraksi dengan domain globular N-terminal dari reseptor Eph sebagai tempat terikatnya ligan. Domanin globular diikuti oleh bagian kaya-sistein dan dua pengulangan fibronektin tipe III, yang mengandung motif dimerisasi. Residu tirosin terfosforilasi menyediakan tempat masuknya sinyal protein yang mengandung domain SH2. Domain SAM membentuk homodimer dan dapat meregulasi dimerisasi reseptor. Protein sinyal mengandung tempat masuk domain PDZ ke terminal karboksi dari reseptor Eph dan ligan ephrin-B. Sumber: Cheng et al, 2002.⁹

Pada saat yang sama, sinyal 'reverse' dimediasi oleh region terminal-C dari Ephrin-B, juga melalui fosforilasi tirosin oleh rekrutmen beberapa molekul, seperti famili Src kinase, atau jalur tergantung-PDZ.⁶

Jalur Sinyal Ephrin-B2/EphB4 pada Angiogenesis Postnatal

Pada angiogenesis *postnatal*, seperti pada tumor dan sistem reproduksi wanita, endotel yang akan membentuk pembuluh darah baru mengekspresikan ephrin-B2 dengan kuat.¹⁰ Ekspresi ephrin-B2 ini merupakan identitas dari sel-sel endotel maupun otot polos pembuluh arteri yang membedakannya dari pembuluh vena pada pembentukan pembuluh darah baru.¹¹ Kultur otot polos pembuluh arteri menunjukkan ephrin-B2 dapat mengontrol formasi adesi-fokal, adesi sel, penjarangan, dan arah migrasi.¹²

Sprouting adalah proses yang terkoordinasi dari migrasi dan proliferasi sel-sel endotel, termasuk sejumlah besar molekul, seperti ephrin-B2 dan EphB4. Stimulasi dari kultur sel-sel endotel dengan bentuk dimerik dari ephrin-B dan EphB menginduksi sinyal *forward* dan *reverse* untuk mempromosikan angiogenesis *sprouting*. Pada yang satu, aktivasi dari Ephrin-B2 pada sel-sel endotel mempromosikan adesi, migrasi, kemotaksis, pembentukan jaringan kapiler dan angiogenesis *sprouting*. Pada sisi yang lain, aktivasi sinyal *forward* EphB4 menginduksi migrasi dan proliferasi sel-sel endotel.⁶

EphB4 menginduksi proliferasi dan migrasi sel-sel endotel sebagai bagian dari mediasi PI3/Akt.⁵ Inhibisi EphB4 dapat menurunkan fosforilasi Akt, dengan demikian menghambat proliferasi sel. Demikian juga, blok terhadap PI3K, Akt, PKG dan MEK dapat menghambat proliferasi sel endotel yang diinduksi EphB4. Akt secara spesifik memfosforilasi sintase NO di endotel, yang akan meningkatkan produksi nitrit mengikuti stimulasi dari EphB4, dengan demikian mengaktifkan jalur sinyal cGMP-PKG. Jadi jalur EphB4 yang akan menginduksi terjadinya proliferasi ialah melalui kaskade kinase PI3/Akt-eNOS/NO-

cGMP/PKG-raf/MEK/MAP.⁶

Untuk migrasi sel-sel endotel, PI3K/Akt juga turut berperan melalui jalur PI3K/Akt-eNOS/NO-FAK. Bukti-bukti lain menunjukkan bahwa kaskade PI3K/Akt-NFκB-MMP dapat juga berpartisipasi pada migrasi sel-sel endotel yang dimediasi oleh EphB4.⁶

Sinyal yang dimediasi ephrin-B2 tergantung pada rekrutmen molekul-molekul sinyal yang kekurangan aktivitas katalisis intrinsik. Pada sisi yang satu, fosforilasi ephrin-B2 dimediasi oleh rekrutmen famili Src kinase (SFK), diikuti oleh ikatan dari domain SH2/SH3 yang mengandung protein adaptor seperti Grb4 dan STAT3. Grb4 menginduksi varietas dari sinyal regulasi sitoskeleton seperti FAK, GIT, dynamin, CAP/ponsin, Abi-1 dan PAK1, dengan demikian memediasi migrasi dari sel-sel endotel. Protein STAT3 mentransduksi sinyal ephrin-B2 dari membran sel ke nukleus, yang ditemukan berperan pada kumpulan sel-sel endotel dan perisit termediasi-matriks ekstrasel yang diinduksi oleh sinyal *reverse* ephrin-B2. Pada sisi yang lain, protein yang mengandung PDZ dapat direkrut ke motif ikatan-PDZ dari ephrin-B2 untuk memediasi sinyal yang tidak tergantung-fosforilasi, yang cukup penting dalam *sprouting* angiogenesis dan stabilisasi neovaskular.⁶

Regulasi Sinyal EphrinB2/EphB4 oleh VEGF

Hubungan antara sinyal-sinyal lain pada angiogenesis dengan sinyal ephrinB2/EphB4 masih belum jelas, namun terdapat kemungkinan ephrinB2/EphB4 diregulasi oleh VEGF, yaitu aktivator angiogenesis yang paling kuat dan diperkirakan mempromosi ekspresi ephrin-B2 oleh sel-sel endotel. DII4/Notch yang diinduksi oleh VEGF ialah jalur lain yang sangat diperlukan pada neovaskularisasi dan secara selektif mempromosikan ekspresi Ephrin-B2. Hal ini memberi kesan bahwa terdapat kaskade antara VEGF-DII4/Notch-EphrinB2 pada angiogenesis. VEGF telah dilaporkan menginduksi spesifik sinyal langsung-Notch/Delta melalui jalur

PI3K/Akt, yang mungkin berhubungan dengan faktor transkripsi Foxc. Telah dilaporkan juga sebelumnya, protein RBPJ merupakan mediator transkripsi dari sinyal Notch dan mungkin berperan pada ekspresi ephrinB2. Oleh karena itu, VEGF dapat menginduksi ekspresi dari ephrinB2 melalui kaskade VEGF/VEGFR-PI3K/Akt-Foxc-DII4/Notch-RBPJ-EphrinB2.⁶

Peran Sinyal Ephrin-B2/EphB4 pada Angiogenesis Postnatal

Sejumlah penelitian yang dilakukan telah membuktikan peran sinyal ephrin-B2/EphB4 ini pada angiogenesis *postnatal*, walaupun mekanismenya masih banyak yang belum jelas. Ephrin-B2 dan reseptornya EphB4 diketahui mempunyai peranan penting dalam perkembangan sistem kardiovaskular dan juga berkontribusi pada fungsi struktur pembuluh darah.⁶

Pada sistem vaskular, ephrin-B2 diekspresikan di endotel arteri dan sel-sel mural, sedangkan EphB4 diekspresikan di sel-sel endotel vena.¹³ Ephrin-B2/EphB4 mempunyai kemampuan lebih dibandingkan dengan faktor-faktor proangiogenesis klasik seperti VEGF/VEGFR dan Ang1/Tie2, yaitu tidak hanya mempromosikan angiogenesis *sprouting*, tetapi juga berpartisipasi dalam pematangan pembuluh darah (*remodeling* dan stabilisasi).⁶

Stimulasi kultur sel-sel endotel dengan bentuk dimerik larutan ligan ephrinB dan reseptor Eph mengindikasikan bahwa sinyal "forward" dan "reverse" dapat mempromosi angiogenesis *sprouting*. Aktivasi EphB4 menginduksi migrasi dan proliferasi sel-sel endotel, yang merupakan bagian dari kaskade sinyal PI3K/Akt.⁵ EphrinB2 juga menginduksi migrasi HUVEC melalui jalur sinyal PI3K dan mempromosikan angiogenesis *in vivo* pada mencit.¹⁴

Pada pembuluh darah di korpus luteum tikus, ditemukan overekspresi dari ephrin-B2 yang diduga berperan sebagai faktor proangiogenesis yang mempromosikan neovaskularisasi di korpus luteum. Ekspresi mRNA ephrin-B2 terdeteksi juga pada sampel ovarium manusia. EphB4 dan ephrin-B2 dilaporkan mengalami over-

ekspresi pada karsinoma dan hiperplasia endometrium manusia.¹³

Telah dilaporkan juga bahwa ekspresi EphB4 oleh sel-sel tumor mempromosikan angiogenesis melalui interaksinya dengan ephrin-B2 di sel-sel endotel. Deregulasi ekspresi ephrin-B2 dan EphB4 pada sel-sel endotel diimplikasikan dengan *remodeling* abnormal dari pembuluh darah tumor dan kehilangan identitas arteri-vena pada sarkoma Kaposi. Sama halnya dengan hepatokarsinoma yang meng-upregulasi jalur Notch dan ephrin-B2 di sel-sel endotel sinusoid, yang biasanya menunjukkan identitas vena dan mengekspresikan EphB4.⁵

Simpulan

Reseptor Eph adalah protein yang termasuk famili reseptor tirosin kinase (RTKs) transmembran dengan ephrin sebagai ligannya, yang juga terikat pada membran. Pada sistem vaskular, ephrin-B2 diekspresikan di endotel arteri dan sel-sel mural, sedangkan EphB4 diekspresikan di sel-sel endotel vena.

Sinyal Eph/ephrin sering disebut sebagai *bi-directional signaling* (sinyal dua-arah), yaitu terdiri dari 'forward signaling' dan 'reverse signaling'. Melalui sinyal *forward*, EphB4 akan menginduksi terjadinya proliferasi dan migrasi sel-sel endotel. Pada sinyal *reverse*, ephrin-B2 juga akan menginduksi migrasi sel-sel endotel dan berperan pada *sprouting* angiogenesis, juga stabilisasi neovaskular. Karena itu, pada angiogenesis *postnatal*, sinyal ephrin-B2/EphB4 berperan untuk mempromosikan angiogenesis *sprouting*, juga berpartisipasi dalam pematangan pembuluh darah (*remodeling* dan stabilisasi).

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, et al. Angiogenesis factors. Intern Med. 2001; 40(7):565-572.
doi:10.2169/internalmedicine.40.565

2. de Mendoca RJ. Angiogenesis in wound healing. In: Davies J, editor. *Tissue Regeneration - from Basic Biology to Clinical Application*. Rijeka: InTech, 2010; p. 93-108.
3. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33. doi:10.1182/blood-2007-09-113837
4. Ahmed Z, Bicknell R. Angiogenic signaling pathways. In: Martin SCM, editor. *Methods in Molecular, Angiogenesis Protocols Vol 467 (2nd ed)*. New York: Humana Press, 2009; p.1-22.
5. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-Ephrin interaction. *TCM*. 2007;17(5):145-51.
6. Yang D, Jin C, Ma H, Huang M. EphrinB2/EphB4 pathway in postnatal angiogenesis: a potential therapeutic target for ischemic cardiovascular disease. *Angiogenesis*. 2016;19(3):297-309.
7. Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol*. 2010; 2010:1-12.
8. Honnegowda TM, Kumar P, Udupa EG, Kumar S, Kumar U, Rao P. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plast Aesthetic Res*. 2015;2(5):243-249.
9. Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(1):75-85.
10. Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, et al. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol*. 2001; 230(2):151-160.
11. Shin D, Garcia-Cardena G, Hayashi S, Gerety S, Asahara T, Stavrakis G, et al. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol*. 2001;230(2):139-150.
12. Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, et al. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell*. 2006;124:161-173.
13. Brantley-sieders DM, Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. 2004;7:17-28.
14. Maekawa H, Oike Y, Kanda S, Ito Y, Yamada Y, Kurihara H, et al. Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(11):2008-2014.