

Pengembangan penghantar DNA berbasis polipeptida sebagai upaya meningkatkan efisiensi dan efektivitas transfeksi dna pada sel mamalia = Development peptide mediated DNA delivery system to increase the efficiency dan effectiveness of dna transfection into mammalian cells

Silvia Tri Widyaningtyas, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20423725&lokasi=lokal>

Abstrak

Pendahuluan: Barrier alamiah berupa membrane sel, kompartemen endosom, dan membrane inti sel yang menghalangi DNA ekstraseluler untuk mencapai target kerja dalam inti sel dalam mengawali proses pembentukan protein transgen. Sistem penghantar DNA, dalam hal ini protein penghantar DNA (PPD) dikembangkan untuk menghindari penghalang seluler tersebut. Karena sel tubuh berada dalam keadaan tidak membelah, maka diharapkan PPD tersebut dapat berfungsi pada sel tidak membelah.

Metodologi: Metodologi yang dipakai adalah telaah literature, pengkloningan, dan uji in vitro. Dilakukan telaah literature untuk mencari peptida yang memiliki 1) kemampuan untuk masuk ke dalam sel/ berfusi dengan membran sel hospes, 2) kemampuan mengikat DNA, 3) kemampuan menghantarkan DNA melalui nuclear localization signal (NLS). Sekuen protein diubah menjadi DNA dengan menggunakan perangkat lunak. Setelah menjadi fragmen DNA, maka langkah selanjutnya DNA di klon ke dalam plasmid pQE80L untuk menghasilkan plasmid rekombian pengeksresi PPD. PPD diperoleh dengan cara mengekspresikannya ke dalam sistem prokariota. Setelah PPD dimurnikan, dilakukan uji fungsi kemampuan PPD menghantarkan DNA pada sel kultur membelah dan tidak membelah.

Hasil: Berdasarkan telaah literature dihasilkan 5 rancangan PPD ALMR, SIMR, VPMR, THB2 dan THB4. Studi bioinformatika menunjukkan THB4 tidak dapat mengikat DNA dan bergerak ke inti sel. Proses pengkloningan menghasilkan 4 klon dan salah satu dari 4 kandidat PPD, THB2, tidak dapat diekspresikan dalam prokariota. ALMR, SIMR dan VPMR memiliki kemampuan untuk mengikat DNA dan melindungi DNA dari efek nuclease. Uji in vitro menunjukkan hanya ALMR yang dapat menghantarkan pcDNA3.1eGFP ke inti yang ditandai oleh ekspresi transgen oleh CHOK1. Jika dibandingkan dengan Lipofectamine, efektivitas penghantaran DNA oleh ALMR pada sel membelah kurang efektif, namun penghantaran DNA oleh ALMR pada sel tidak membelah lebih efektif dibandingkan Lipofectamine. Penambahan ALMR ke dalam kompleks Lipofectamine:DNA dapat meningkatkan efisiensi penghantaran DNA dan viabilitas sel.

Kesimpulan: PPD yang dapat mengikat, melindungi, dan menghantarkan DNA ke dalam sel membelah dan tidak membelah telah berhasil diperoleh. Penggabungan PPD dengan lipofectamine dapat meningkatkan efisiensi dan efektivitas penghantaran DNA kedalam sel tidak membelah serta meningkatkan viabilitas sel tidak membelah pasca transfeksi.

Background: The journey of extracellular DNA to reach its active site, nucleus, is dependent on its capability to overcome cellular barriers such as cell membrane, endosomal compartment and nuclear membran. To overcome such natural barriers, we developed peptide-mediated DNA delivery system that could deliver DNA especially into non-dividing cells as the majority of human cells are found in nondividing state.

Methodology: Based on literature studies we found peptides that have capability 1) to translocate/fuse with

cellular membrane, 2) to bind DNA and protect DNA from nuclease 3) as nuclear localization signal (NLS). We convert peptides into DNA sequences by using software. DNA coding peptide-mediated DNA delivery systems were synthesized by commercially and manually using conventional PCR. The DNA fragments were cloned into prokaryote-expression systems. After expression and purification, peptide-mediated DNA delivery systems were tested their capability to increase the efficiency and effectiveness of the transformation of extracellular DNA in dividing and non-dividing cells.

Result: We constructs 5 candidates of peptide-mediated delivery system. One of them has no capability to bind DNA and located using nucleus. One of the rest peptidemediated delivery system could not be expressed in prokaryote system. Furthermore, three candidates have capability to binds DNA and protect DNA from nuclease degradation. Based on in vitro study, only one candidate has the capability to deliver DNA pcDNA3.1 eGFP into CHOK1 nucleus that marked by the expression of transgen. Compared to the Lipofectamine, a commercial delivery system, the capability of ALMR to deliver DNA into dividing cell is less efficient, but the capability of ALMR to deliver DNA into non-dividing cells is more efficient compare to Lipofectamine. The addition of ALMR into lipofectamine-DNA complex could increasing both the percentage of transgeneexpressing cells and viability of cell.

Conclusions: We have gained one peptide-mediated delivery system that could bind, protect and deliver DNA from extracellular into intracellular environment of dividing and non dividing cells. The addition of peptide-mediated delivery into Lipofectamine could increase the efectivity of DNA transformation and increase the cell viability.</i>