

JULI 2020

Transformasi gen ScFv-anti-EGFRvIII menggunakan plasmid rekombinan pPICZa-ScFv-anti-EGFRvIII-egfp dengan promotor induktif PAOX1 pada *Komagataella phaffii* = Transformation of ScFv-anti-EGFRvIII gene using pPICZa-ScFv-anti-EGFRvIII-egfp recombinant plasmid with PAOX1 inductive promoter on *Komagataella phaffii*

Nizal Muhammad Rizqi, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20509644&lokasi=lokal>

Abstrak

<p style="text-align: justify;">Epidermal growth factor receptor variant III(EGFRvIII) telah ditemukan sebagai protein reseptor spesifik pada beberapa jenis sel kanker. Protein tersebut merupakan hasil ekspresi dari salah satu jenis mutan gen EGFR, yaitu gen EGFRvIII. Mutasi pada gen EGFRvIII terjadi karena adanya delesi ekson 2 hingga 7 yang merupakan bagian dari domain ekstraselular yang berinteraksi dengan ligan alaminya. Keberadaan EGFRvIII yang spesifik hanya pada sel kanker memberikan potensi bagi protein tersebut untuk dijadikan sebagai molekul target pada terapi penargetan kanker dengan antibodi monoklonal. Fragmen antibodi untai tunggal (ScFv) anti-EGFRvIII merupakan antibodi monoklonal yang dapat digunakan sebagai ligan spesifik terhadap EGFRvIII dalam simulasi terapi penargetan kanker. Antibodi ScFv-anti-EGFRvIII dapat diproduksi menggunakan plasmid pPICZ \hat{I} \pm -ScFv-anti-EGFRvIII-egfp. Plasmid rekombinan ini memiliki promotor inducibel AOX1 dan sinyal sekresi matting factor-a yang dapat ditransformasikan pada Komagataella phaffii sehingga antibodi ScFv-anti-EGFRvIII dapat disekresikan oleh sel inang. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan klon K. phaffii transforman yang membawa gen ScFv-anti-EGFRvIII. Plasmid diisolasi dari Escherichia coli TOP10F⁺ dan dipurifikasi dengan pelarut organik. Plasmid kemudian dipotong dengan enzim SacI sehingga diperoleh plasmid linear yang berukuran 5.150 bp. Metode transformasi yang digunakan adalah elektroporasi. Seleksi K. phaffii transforman dilakukan pada medium seleksi yang mengandung antibiotik zeocin. Hasil penelitian menunjukkan klon K. phaffii transforman yang mengandung plasmid rekombinan pPICZ \hat{I} \pm -ScFv-anti-EGFRvIII-egfp (5150 bp) berhasil diperoleh. Hasil seleksi K. phaffii transforman dengan replica plating menunjukkan, bahwa seluruh koloni tunggal transforman yang terpilih dapat tumbuh dengan baik pada konsentrasi zeocin 100 \hat{I} / \hat{I} g/mL. Hal tersebut mengindikasikan, bahwa plasmid rekombinan pPICZ \hat{I} \pm -ScFv-anti-EGFRvIII-egfp dapat berintegrasi ke dalam genom K. phaffii secara stabil.</p><p></p><hr /><p style="text-align: justify;">Cancer is a disease caused by abnormal proliferation of cell which can produce fatal effects for an organ system. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) has been found to be a spesific receptor protein in several tyoes of cancer cells. The protein is expressed by one of many types of mutant from EGFR gene, namely EGFRvIII. Mutation in EGFRvIII gene occur because of deletion on exon 2 to exon 7 that are part of the extracellular domain that interacts with their natural ligand. The specificity of EGFRvIII

on cancer cells EGFRvIII provides a potential for the protein to be used as target molecule in cancer-targeting therapy with monoclonal antibodies. Single-chain variable fragment (ScFv) of anti-EGFRvIII is a monoclonal antibody that can be used as specific ligands against EGFRvIII in simulating cancer-targeting therapy. The ScFv-anti-EGFRvIII antibody can be produced using the pPICZ⁺-ScFv-anti-EGFRvIII-egfp plasmid. This recombinant plasmid has an inducible AOX1 promoter and *α*-secretion signal that can be transformed into *Komagataella phaffii* so that the ScFv-anti-EGFRvIII antibody can be expressed extracellularly. The purpose of this study is to obtain a *K. phaffii* transformant clone that carries the ScFv-anti-EGFRvIII gene. The plasmid were isolated from *Escherichia coli* TOP10F⁺ and purified. Plasmid were then cut with the *Sac*I enzyme so that a 5.150 bp linear plasmid was obtained. The method of transformation in this study is electroporation. The selection of *K. phaffii* transformant was carried out on a selection medium containing zeocin antibiotic. The results showed that *K. phaffii* transformant clone containing pPICZ⁺-ScFv-anti-EGFRvIII-egfp (5150 bp) recombinant plasmid was successfully obtained. The selection of *K. phaffii* transformant with replica plating shows that all selected single colony transformants can grow well at zeocin concentration of 100 μ g/mL. The result indicate that the pPICZ⁺-ScFv-anti-EGFRvIII-egfp recombinant plasmid can be integrated into *K. phaffii* genome stably.