

Evaluasi knockout Gen Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Terhadap Kemampuan Penghambatan Laju Pertumbuhan Serta Peningkatan Apoptosis Sel Kanker Payudara Triple Negative BT-549 = Evaluation Of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene Knockout Toward The Growth And Apoptosis Of BT-549 Triple Negative Breast Cancer Cells

Niken Rahmah Ghanny, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920519257&lokasi=lokal>

Abstrak

Sel kanker payudara jenis TNBC memiliki kadar MnSOD yang tinggi. Ekspresi MnSOD yang tinggi pada sel kanker TNBC dapat menghasilkan sel dengan kapasitas proliferasi tinggi, apoptosis minimal, dan resistensi terapeutik. Keberadaan teknologi edit genom CRISPR/Cas9 yang menargetkan MnSOD diyakini dapat menurunkan ekspresi MnSOD sehingga mengurangi aktivitas proliferasi sel kanker BT-549 dan meningkatkan apoptosisnya. MnSOD diketahui mengandung polimorfisme yang meningkatkan risiko berkembangnya kanker. Oleh karena itu, sangat penting untuk menganalisis ekson 2 dari pengeditan genom gen MnSOD pada sel BT-549. Pada penelitian ini, memanfaatkan kultur sel BT-549 untuk diperbanyak dan dilakukan pemisahan DNA, RNA, dan protein dari sel kultur. Analisis western blot MnSOD, survivin, caspase 3, caspase 9, cleaved caspase 3, dan cleaved caspase 9. Selain itu, ekspresi relatif mRNA MnSOD dan survivin dihitung menggunakan teknik qRT-PCR. Selain itu dilakukan sekuensing DNA, pemodelan homologi protein, dan prediksi protein pengeditan genom. Analisa fenotip terdapat analisis proliferasi sel juga dilakukan untuk menentukan waktu penggandaan, serta studi siklus sel flowcytometric. Pengukuran flow cytometric dari apoptosis juga dilakukan untuk menguji pengaruh genome editing pada MnSOD. Hasil pada pengeditan genom yang difokuskan pada ekson 2 gen MnSOD dapat menurunkan ekspresi relatif mRNA MnSOD dan ekspresi protein MnSOD. Selain itu, adanya genome editing pada MnSOD juga mempengaruhi pola proliferasi klon KO 11.3 dan 11.4 yang lebih lambat jika dibandingkan dengan sel WT; hal ini sesuai dengan hasil analisis siklus sel, yang menunjukkan persentase fase G0/G1 yang tinggi dan persentase fase S, G2/M yang rendah pada klon KO 11.3 dan 11.4 jika dibandingkan dengan WT. Penghambatan ekspresi MnSOD juga dapat meningkatkan kemampuan apoptosis sel, yang ditunjukkan dengan tingginya proporsi sel yang mengalami apoptosis yang diukur dengan flow cytometry, serta peningkatan kadar protein inisiator dan efektor apoptosis. Kesimpulannya, KO gen MnSOD pada sel BT-549 mengurangi ekspresi protein MnSOD, sehingga menghambat pertumbuhan sel dan mendorong kematian sel BT-549.

.....It is known that TNBC cancer cells have a high level of MnSOD. High MnSOD expression in TNBC cancer cells can result in cells with a high proliferation capacity, minimal apoptosis, and therapeutic resistance. It is believed that the existence of CRISPR/Cas9 genome editing technology that targets MnSOD can decrease MnSOD expression, hence reducing the proliferative activity of BT-549 cancer cells and increasing their apoptosis. MnSOD is known to include polymorphisms that increase the risk of developing cancer. Therefore, it is crucial to analyze exon 2 of the MnSOD gene genome editing in BT-549 cells.

Methods: This work utilized BT-549 cell culture to proliferate cells and to separate DNA, RNA, and protein from the cultured cells. Western blot analysis of MnSOD, survivin, caspase 3, caspase 9, cleaved caspase 3,

and cleaved caspase 9. Additionally, the relative expression of MnSOD and survivin mRNAs was calculated using the qRT-PCR technique. There was DNA sequencing, protein homology modeling, and genome editing protein prediction. In phenotypic analysis, cell proliferation analysis was also performed to determine doubling time, in addition to flowcytometric cell cycle study. Flow cytometric measurement of apoptosis was also performed to examine the effect of genome editing on MnSOD. Result: Genome editing focused at exon 2 of the MnSOD gene can reduce the relative expression of MnSOD mRNA and the expression of MnSOD protein. In addition, the existence of genome editing in MnSOD also affected the slower proliferation pattern of KO clones 11.3 and 11.4 when compared to WT cells; this is consistent with the results of cell cycle analysis, which demonstrated a high percentage of G0/G1 phase and a low percentage of S phase, G2/M, in KO clones 11.3 and 11.4 when compared to WT. The inhibition of MnSOD expression can also boost the capability of cell apoptosis, as indicated by the high proportion of cells undergoing apoptosis as measured by flow cytometry, as well as the elevated levels of apoptosis initiator and effector proteins. Conclusion: MnSOD gene knockout on BT-549 cells reduces MnSOD protein expression, hence inhibiting cell growth and promoting BT-549 cell death.