

INTISARI

Latar belakang: Kanker payudara menjadi jenis kanker yang menyebabkan kematian nomor dua pada wanita di dunia. 4T1 merupakan lini sel model kanker payudara yang memiliki kemiripan molekuler dengan TNBC dan diperoleh dari kelenjar mammae tikus BALB/c. Paclitaxel (PTX) adalah obat kemoterapi terapi lini pertama pada kanker payudara. Toksisitas PTX pada TNBC dipengaruhi oleh enzim detoksifikasi seperti Glutathione S-transferase (GST). GSTM1 adalah sub famili GST yang paling banyak diekspresikan dan diketahui mengalami polimorfisme pada beberapa etnis di dunia. CRISPR merupakan sistem rekayasa genetika yang dapat digunakan untuk membuat pemodelan polimorfisme dengan menggunakan sgRNA yang berbeda untuk menarget gen yang sama.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi efek penggunaan sgRNA tunggal dan ganda terhadap *knockout* (KO) gen GSTM1 serta pengaruhnya terhadap respon lini sel kanker payudara 4T1 terhadap Paclitaxel (PTX).

Metode: Kultur sel dan elektroporasi CRISPR/Cas9 dengan Ribonukleoprotein (RNP) dilakukan pada tahap persiapan penelitian. KO diperiksa dengan Sanger-sequencing DNA GSTM1 dan ekspresi mRNA GSTM1 menggunakan qRT-PCR. Uji viabilitas sel 4T1 dilakukan dengan MTT Assay. Nilai *Inhibition Concentration* 50% (IC₅₀) dihitung menggunakan analisis probit dan dibandingkan antar kelompok.

Hasil penelitian: Jumlah pasang basa GSTM1 exon 4 pada rekayasa dengan sgRNA tunggal dan ganda adalah 86 basa. Persentase indel DNA GSTM1 exon 4 pada rekayasa menggunakan sgRNA tunggal dan ganda adalah 5% dan 14%. Ekspresi RNA GSTM1 sel 4T1 yang direkayasa sgRNA tunggal adalah $0,14 \pm 0,004$ dan $0,94 \pm 0,13$. Nilai IC₅₀ PTX kelompok *wild type*, *knocked out* sgRNA tunggal, dan ganda secara berturut-turut adalah $33,12 \pm 0,6 \mu\text{M}$; $33,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$; dan $35,3 \pm 2,2 \mu\text{M}$.

Kesimpulan: Panjang basa GSTM1 exon 4 lini sel 4T1 yang mengalami *knocked out* dengan sgRNA tunggal dan ganda adalah sama. Persentase indel GSTM1 lebih tinggi pada kelompok yang direkayasa dengan sgRNA ganda. Ekspresi mRNA GSTM1 lebih tinggi pada rekayasa dengan sgRNA ganda, dan nilai IC₅₀ PTX pada lini sel 4T1 kelompok kontrol dengan *knocked out* sgRNA tunggal maupun ganda tidak berbeda nyata, yaitu berada pada kisaran 30 μM .

Kata kunci: GSTM1, sgRNA, delesi ekson, sel 4T1, paclitaxel

ABSTRACT

Background: Breast cancer is becoming the second type of cancer that causes death in women in the world. 4T1 is a line of breast cancer model cells that bears a molecular resemblance to TNBC and is obtained from the mammary glands of BALB/c mice. Paclitaxel (PTX) is a first-line therapeutic chemotherapy drug in breast cancer. PTX toxicity in TNBC is influenced by metabolism of detoxifying enzymes such as Glutathione S-transferase (GST). GSTM1 is the most widely expressed subfamily GST and is known to undergo polymorphism in several ethnic groups in the world. CRISPR is a genetic engineering system that can be used to make polymorphisms model using different sgRNAs to target the same gene.

Objective: This study aims to explore the effects of single and double sgRNA on the knockout of the GSTM1 gene and its effect on the response of the 4T1 breast cancer cell line to Paclitaxel (PTX).

Methods: The study was carried out in the preparatory stage by cell culture and electroporation of CRISPR/Cas9 using Ribonucleoprotein (RNP). The success of the KO was examined using DNA Sanger-sequencing and RNA examination using the qRT-PCR method. 4T1 cell viability test was done using MTT Assay. The 50% Inhibition Concentration (IC₅₀) value was calculated using probit analysis and compared between groups.

Results: The number of base pairs of GSTM1 exon 4 on engineering with single and double sgRNA is 86 bases. Indel percentage of DNA GSTM1 exon 4 in engineering using single and double sgRNA were 5% and 14%. The RNA expression of GSTM1 single and double sgRNA-engineered 4T1 cells is 0.14 ± 0.004 and 0.94 ± 0.13 . The IC₅₀ PTX values of the wild type, single and double sgRNA groups were $33.12 \pm 0.6 \mu\text{M}$; $33.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$; and $35.3 \pm 2.2 \mu\text{M}$ respectively.

Conclusion: The base pair length GSTM1 exon 4 of 4T1 cells lines that are knocked out with single and double sgRNA are the same. The indel percentage of GSTM1 DNA is higher in engineering with double sgRNA, GSTM1 RNA expression is higher in engineering with double sgRNA, and IC₅₀ PTX values in the 4T1 cell line of the control group with single or double sgRNA knocked out did not differ markedly in the range of $30 \mu\text{M}$.

Keywords: GSTM1, sgRNA, exon deletion, 4T1 cell line, Paclitaxel