

IN VITRO STUDY OF *GSTM1* KNOCKED OUT EFFECT ON ARGINASE-1 (ARG-1) EXPRESSION IN RAW 264.7 MACROPHAGE CELL

ABSTRACT

Background: *Glutathione S-transferase mu 1* (*GSTM1*) null genotype, which has a high prevalence in the world population, plays an important role in regulating reactive oxygen species (ROS) through the *GSTM1* enzyme. Loss of *GSTM1* gene can cause the occurrence of oxidative stress. This can disrupt cell signaling pathways, thereby affecting the dynamic shift between M1 and M2 macrophage phenotypes, and resulting in a prolonged inflammatory process. This condition can impact the expression of Arginase-1 (ARG-1), which is the main biomarker of M2 activation. Thus, the *GSTM1* null genotype could potentially affect ARG-1 expression in macrophages.

Objective: The objective for this research is to investigate the effect of *GSTM1* null genotype on ARG-1 expression in RAW 264.7 macrophage cell.

Methods: The *GSTM1* gene was knocked out in RAW 264.7 cells using CRISPR-Cas9, resulting in the deletion of *GSTM1* from the RAW 264.7 macrophage cell line. ARG-1 mRNA expression data in RAW 264.7 macrophages were obtained by extracting and isolating RNA from the RAW264.7 cell line, followed by cDNA synthesis. Conventional PCR was performed to amplify the ARG-1 and GAPDH DNA sequences. The resulting PCR products were separated into DNA fragments using electrophoresis, and the bands were visualized under UV light. The obtained data were then subjected to semi-quantitative analysis using ImageJ. The analysis included the use of the Independent-T test for statistical assessment.

Results: The data obtained in this study were that in RAW 264.7 macrophage cell where the *GSTM1* gene was knocked out, the mean ratio of ARG-1 mRNA to GAPDH expression is 0.517. Conversely, in cell with the *GSTM1* gene present, the mean ratio of ARG-1 mRNA to GAPDH expression is 1.055. It shows that in RAW 264.7 macrophage cells with *GSTM1* gene knockout, the ARG-1 mRNA expression is significantly lower ($p = 0.029$, $p < 0.005$) compared to the cell in which the *GSTM1* gene was not knocked out.

Conclusion: The *GSTM1* gene knocked out showed a significant effect on ARG-1 expression in RAW 264.7 macrophage cells. This study demonstrates that the absence of the *GSTM1* gene in RAW 264.7 macrophage cells can lead to lower ARG-1 expression compared to cell in which the *GSTM1* gene is present.

Keywords: *GSTM1*, ARG-1, ROS, Oxidative stress, Detoxification, RAW 264.7, CRISPR/Cas9

STUDI IN VITRO EFEK GSTM1 KNOCKOUT TERHADAP EKSPRESI ARGINASE-1 (ARG-1) PADA SEL MAKROFAG RAW 264.7

INTISARI

Latar Belakang: Genotipe nol *Glutathione S-transferase mu 1* (GSTM1) yang memiliki prevalensi tinggi pada populasi dunia, berperan penting untuk mengatur spesies oksigen reaktif (ROS) melalui enzim GSTM1. Hilangnya gen *GSTM1* menyebabkan stres oksidatif. Hal ini dapat mengganggu jalur sinyal sel sehingga dapat mempengaruhi pergeseran dinamis antara fenotip makrofag M1 dan M2, dan mengakibatkan proses inflamasi yang berkepanjangan. Kondisi ini dapat berdampak pada ekspresi Arginase-1 (ARG-1), yang merupakan biomarker utama aktivasi M2. Dengan demikian, genotipe nol GSTM1 berpotensi mempengaruhi ekspresi ARG-1 di makrofag.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek genotipe *GSTM1* null terhadap ekspresi ARG-1 pada sel makrofag RAW 264.7.

Metode: Gen *GSTM1* di-*knockout* dari dalam sel RAW 264.7 menggunakan CRISPR-Cas9, mengakibatkan penghapusan GSTM1 dari garis sel makrofag RAW 264.7. Data ekspresi mRNA ARG-1 pada makrofag RAW 264.7 diperoleh dengan mengekstraksi dan mengisolasi RNA dari sel RAW264.7, dilanjutkan dengan sintesis cDNA. PCR konvensional dilakukan untuk memperkuat *sequence* DNA ARG-1 dan GAPDH. Produk PCR yang dihasilkan dipisahkan menjadi fragmen DNA menggunakan elektroforesis, dan pita-pita tersebut divisualisasikan di bawah sinar UV. Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis semi kuantitatif menggunakan ImageJ. Analisis data pada riset ini menggunakan uji T-Independen untuk penilaian statistik.

Hasil: Data yang didapat pada studi ini adalah bahwa dalam sel makrofag RAW 264,7 di mana gen *GSTM1* di-*knockout*, rerata rasio ekspresi mRNA ARG-1 terhadap ekspresi GAPDH adalah 0,517. Sebaliknya, dalam sel dengan gen *GSTM1*, rerata rasio ekspresi mRNA ARG-1 terhadap ekspresi GAPDH adalah 1,055. Hal ini menunjukkan bahwa sel makrofag RAW 264.7 dengan gen *GSTM1* di-*knockout* memiliki ekspresi mRNA ARG-1 lebih rendah secara signifikan ($p = 0.029$, $p < 0.005$) dibandingkan dengan sel yang gen *GSTM1*-nya tidak ter-*knockout*.

Kesimpulan: *GSTM1 knockout* menunjukkan adanya efek yang signifikan terhadap ekspresi ARG-1 pada sel makrofag RAW 264.7. Studi ini menunjukkan bahwa tidak adanya gen *GSTM1* pada sel makrofag RAW 264.7 dapat menyebabkan ekspresi ARG-1 lebih rendah dibandingkan dengan sel yang memiliki gen *GSTM1*.

Kata Kunci: *GSTM1*, ARG-1, ROS, Stres Oksidatif, Detoksifikasi, RAW 264.7, CRISPR/Cas9