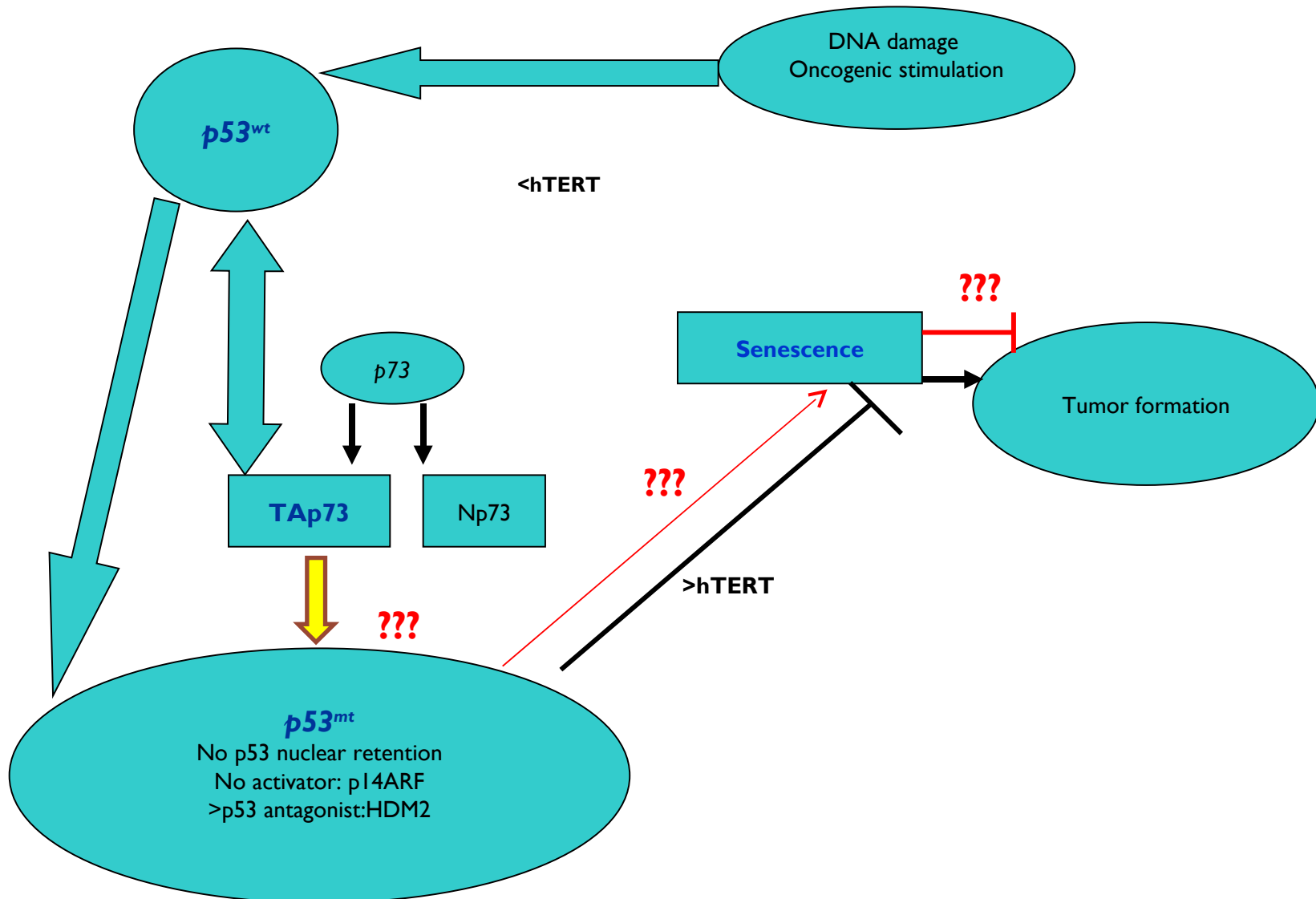


**PERAN ISOFORM TAp73 DAN STATUS
GEN p53 TERHADAP AKTIFITAS hTERT
PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA**

**RISBIN IPTEKDOK
2007**

LATAR BELAKANG



TUJUAN PENELITIAN

1. Menganalisis peran molekul protein isoform TAp73 pada ekspresi hTERT yang dihubungkan dengan status molekul p53 pada sel galur HSC-3 dan HSC-4. (Tahun I)
2. Menganalisis hasil transfeksi TAp73 pada kedua sel galur terhadap ekspresi hTERT. (Tahun II)

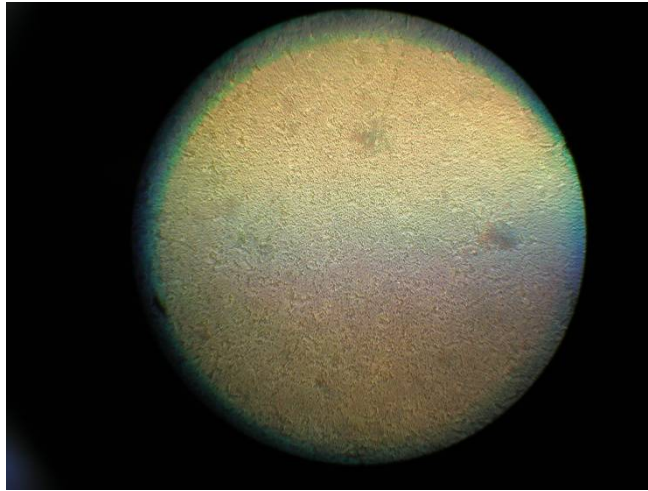
Tahun I (2007)

- Analisa ekspresi mRNA TAp73 dan hTERT pada sel galur HSC-3 dan HSC-4
- Analisa ekspresi protein TAp73 dan hTERT pada sel galur HSC-3 dan HSC-4
- Tahap persiapan transfeksi cloning konstruksi DNA TAp73

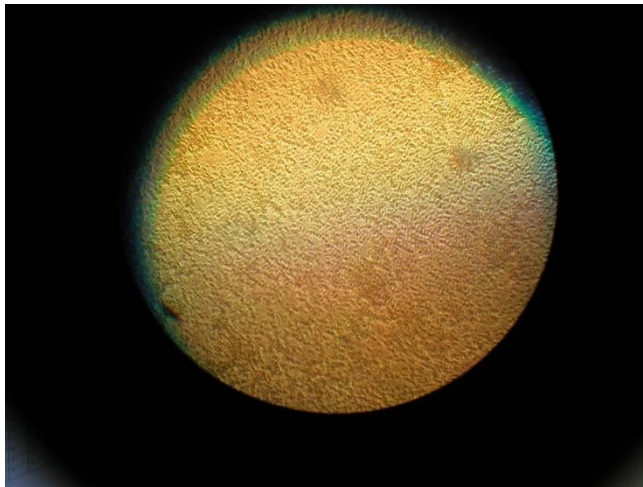
Kultur sel galur HSC-3 dan HSC-4

- Sel galur dikultur di *cell culture dish* berdiameter 9cm dalam inkubator dengan kondisi kelembaban 95% dan kadar CO₂ 5% pada suhu 37°C dengan medium DMEM yang disuplementasi dengan 10% *fetal calf serum* dengan 1ug/ml streptomisin, 1i.u/ml penisilin dan 1ug/ml fungizone.
- Sel kemudian dipanen dengan *cell scraper*.

Photomicrograph HSC-3 dan HSC-4

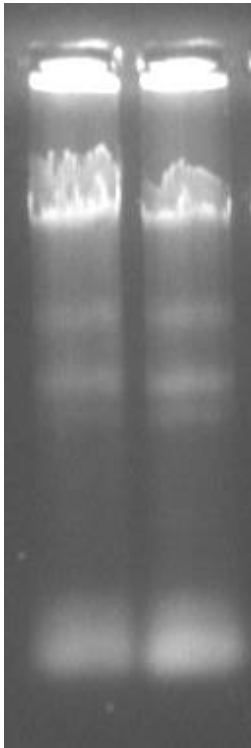


HSC-3



HSC-4

Ekspresi mRNA TAp73



- Ekstraksi RNA dengan TriZol (sesuai instruksi produk)
- Template untuk RT-PCR
→ total RNA ~ 1-1.5 μ g
- Primer pair (Beitzinger, 2006)
F 5-GGC TGC GAC GGC TGC AGA GC-3
R 5-GCT CAG CAG ATT GAA CTG GGC CAT-3
Produk → 257bp

Ekspresi mRNA TAp73

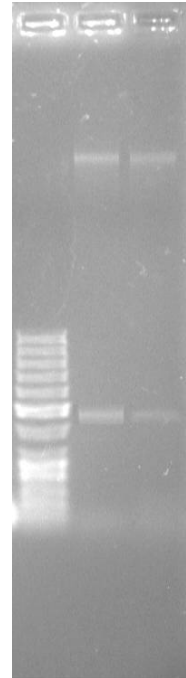
- Sintesis cDNA dilakukan sesuai instruksi produk (Fermentas First strand cDNA Synthesis Kit #K1611)
- Kondisi PCR

1X	94°C	5 menit
35X	94°C	30 detik
	58°C	40 detik
	72°C	60 detik
1X	72°C	10 menit

Produk → 257bp

Gel Electrophoresis RT-PCR TAp73

1 2 3



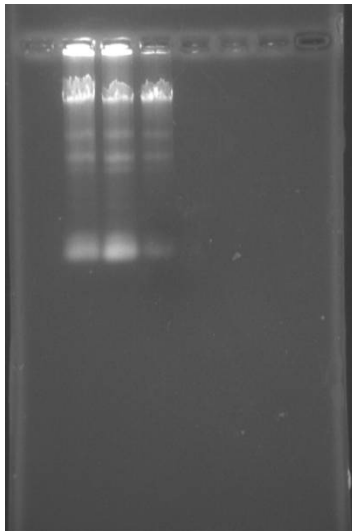
←257bp
TAp73 produk PCR

Ekspresi TAp73 pada sel HSC-3 terlihat
Lebih tinggi dibanding HSC-4 (pita lebih
tebal)

- 1 Molecular weight marker
- 2 HSC-3 TAp73 product
- 3 HSC-4 TAp73 product

Ekspresi mRNA hTERT

- Ekstraksi RNA dengan TriZol (sesuai instruksi produk)



- Template untuk RT-PCR
→ total RNA ~ 1-1.5 µg

- Primer pair (Beitzinger, 2006)

F 5-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3

R 5-TGA CCT CCG TGA GCC TGT-3

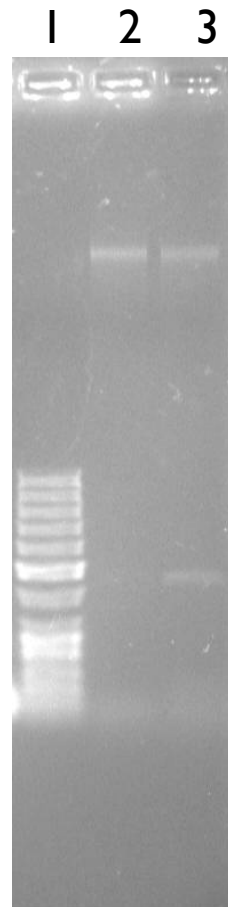
Ekspresi mRNA hTERT

- Sintesis cDNA dilakukan sesuai instruksi produk (Fermentas First strand cDNA Synthesis Kit #K1611)
- Kondisi PCR

1X	94°C	5 menit
35X	94°C	30 detik
	60°C	40 detik
	72°C	60 detik
1X	72°C	10 menit

Produk →457bp

Gel Electrophoresis RT-PCR hTERT



1 Molecular weight marker
2 HSC-3 hTERT product
3 HSC-4 hTERT product

←457bp
hTERT produk PCR

Ekspresi hTERT pada
HSC-3 lebih rendah
dibandingkan HSC-4
(pita lebih tipis)

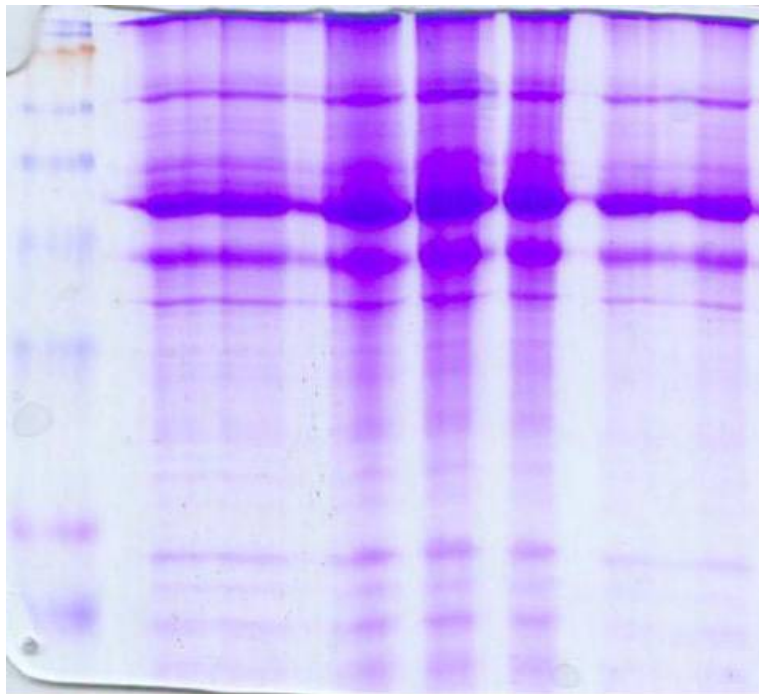
Ekspresi protein TAp73 dan hTERT

- Kultur sel galur HSC-3 dan HSC-4
- Ekstraksi protein dengan TriZol (sesuai instruksi produk)
- Kuantifikasi konsentrasi total protein Bradford assay
- SDS PAGE
- Western blot

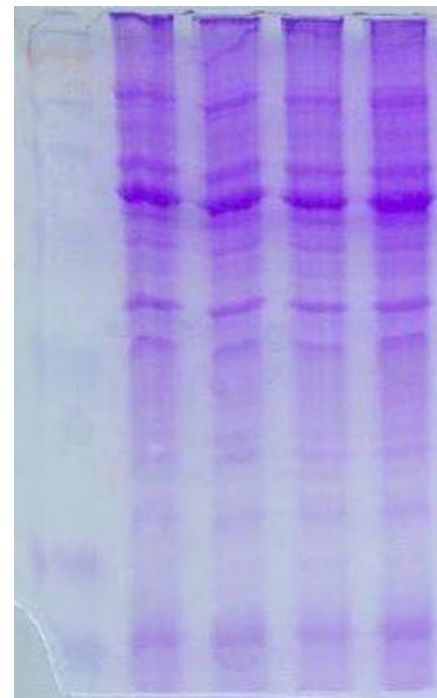
Ekspresi protein TAp73 dan hTERT

SDS PAGE – Comassie blue

HSC-3



HSC-4



Ekspresi protein TAp73

No	Sampel	Keberadaan Protein p73	Berat Molekul protein p73 (KDa)*	Tingkat Ekspresi Protein p73**
1	HSC 3	+	75.665 dan 72.614	tebal
2	HSC 3	+	72.07	tebal
3	HSC 3	+	77.069	tebal
4	HSC 3	+	78.103	tebal
5	HSC 3	+	78.242 dan 77.633	tebal
6	HSC 4	+	71.686	sedang
7	HSC 4	+	70.103	Tidak terlihat
8	HSC 4	+	78.385	sedang
9	HSC 4	-	70.103	-

Ekspresi protein hTERT

Sampel Protein	Lajur ke-	Keberadaan protein yang diperkirakan sebagai protein hTERT (+/-)	Berat molekul protein yang diperkirakan sebagai protein hTERT (KDa)	Tingkat ekspresi protein
HSC3	1*	+	131.732	Tidak terlihat (0)
	2*	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	+	134.697	Tidak terlihat (0)
	7*	+	135.229	Tidak terlihat (0)
	8*	-	-	-
HSC4	1	-	-	-
	2	+	129.563	Tidak terlihat (0)
	3	+	135.735	Tipis (1)
	4	-	-	-

Ekspresi protein TAp73 dan hTERT

- Optimasi metode Western Blot untuk TAp73 dan hTERT dengan p73 α dan telomerase
- Belum teroptimasi

Pembahasan

- Di tingkat mRNA ekspresi TAp73 pada sel galur HSC-3 lebih tinggi dibanding HSC-4 (visual → semikuantitatif → untuk memastikan perlu dilakukan qRT-PCR)
- Hasil ini sama dengan ekspresi TAp73 di tingkat protein berdasarkan analisis visual gel SDS PAGE
- Analisis protein spesifik dengan Western Blot belum teroptimasi

Pembahasan

- Menurut literatur, setiap protein dan isoform dari p73 diekspresikan pada level yang berbeda tergantung pada jenis jaringan dan tahap perkembangannya. (p53/p63/p73 Isoform)
- Ekspresi p73 pada kanker sangat bervariasi dan beberapa sel galur dan sel tumor primer mengekspresikan p73 pada level yang mudah dideteksi

Pembahasan

- Protein mutant p53 diketahui dapat berikatan ke TAp73 dan menghambat fungsi proapoptosisnya.
- Kekuatan interaksi antara p73 dan mutant p53 lebih jauh lagi dipengaruhi oleh keberadaan polimorfisme pada p53 kodon 72.

Pembahasan

- Protein p53 mutant dengan arginine pada residu 72 (R72) lebih kuat berikatan dan menginaktivasi p73
- Hal ini sejalan dengan teori bahwa HSC 4 memiliki polimorfisme nukleotida tunggal pada kodon 72(R) yang mengkode arginine sehingga mutan p53 berikatan lebih kuat dengan p73 dan menginaktivasinya.

Pembahasan

- Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini juga menggunakan program Quantity One, HSC3 dan HSC4 mengekspresikan protein hTERT.
- Namun secara kasat mata, protein hTERT pada HSC3 tidak terlihat, pada HSC 4 terlihat namun tipis.

Persiapan Pembuatan vector untuk transfeksi gen TAp73

- Plasmid pcDNA3.1
- Enzim restriksi EcoRV (GAATTC \downarrow)
- Insert : Homo sapiens tumor protein p73 (TP73), transcript variant 1, mRNA NM_005427.2 1911bp
- Primers set:
5-GAATTC \downarrow GGC TGC GAC GGC TGC AGA GC-3
R 5- GAATTC \downarrow GCT CAG CAG ATT GAA CTG GGC CAT-3

TAHUN II (2008)????

- Menganalisis hasil transfeksi TAp73 pada kedua sel galur terhadap ekspresi hTERT.