

Rekayasa Sel Punca Mesenkim Rekombinan Pembawa Gen BMP-2 dengan Sistem Transduksi Lentivirus untuk Produksi Sekretom BMP-2 = Engineered Recombinant Mesenchymal Stem Cells Harboring BMP-2 Gene Using Lentiviral Transduction for Production of BMP-2 Secretome

Assyafiya Salwa, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920549151&lokasi=lokal>

Abstrak

Tulang normal mampu mengalami tahapan regenerasi kompleks dalam penyembuhan fraktur secara alami. Akan tetapi, terdapat beberapa kasus fraktur yang tidak dapat mengandalkan perbaikan tulang secara alami sehingga terjadi kegagalan penyatuan tulang. Berbagai pendekatan klinis dilakukan untuk meningkatkan regenerasi tulang dalam penyembuhan fraktur namun masih terbatas dan memiliki berbagai kekurangan. Sel punca mesenkimal (SPM) dan bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) merupakan faktor yang berperan penting dalam regenerasi dan perbaikan tulang, terutama dalam proses osteogenesis. Salah satu alternatif pengobatan tulang yang banyak dikembangkan adalah mengkombinasikan kedua faktor tersebut untuk meningkatkan kemampuan osteogenesis SPM. Penelitian ini berfokus pada pengembangan rekombinan BMP-2 pada sekretom SPM melalui rekayasa genetik dengan vektor lentivirus. Plasmid konstruksi vektor lentivirus pembawa gen BMP-2 yang dipakai terdiri dari plasmid transfer, plasmid packaging, plasmid regulatory dan plasmid envelope, yang merupakan kombinasi lentivirus generasi kedua ke ketiga. Titer vektor lentivirus yang berhasil diproduksi pada sel HEK293T sebesar 5.48×10^{10} copies/mL pada hari ke-2 dan 1.42×10^{10} copies/mL pada hari ke-4. SPM transduksi vektor lentivirus mengalami peningkatan ekspresi gen BMP-2 dengan hasil transduksi 100 MOI ($4,23 \pm 0,22$) lebih tinggi daripada 50 MOI ($2,49 \pm 0,07$). Sistem ekspresi gen inducible tet-off pada SPM dapat menekan ekspresi gen BMP-2 dengan pemberian doxycycline 100 ng/mL dan terjadi upregulasi ekspresi gen pasca penghilangan doxycycline. Rekombinan BMP-2 pada SPM terproduksi pada intraseluler (50 MOI: $1015,2 \pm 36$ pg/mL dan 100 MOI: $992,5 \pm 33,9$ pg/mL) namun sangat sedikit yang dapat tersekresi pada ekstraseluler, yaitu $84,5 \pm 6,9$ pg/mL dan $75,8 \pm 3,4$ pg/mL berturut-turut pada perlakuan 50 dan 100 MOI pada CM jika dibandingkan dengan NT. Rekombinan BMP-2 dalam sekretom SPM tidak memberikan efek signifikan dalam peningkatan diferensiasi osteogenik dibandingkan dengan medium induksi diferensiasi osteogenik komersial terstandar. Perlu dilakukan studi lanjutan terkait kapabilitas sekresi rekombinan BMP-2 yang juga berhubungan dengan fungsionalitas rekombinan BMP-2 secara biologis.

.....Normal bones can do complex regeneration stages in natural fracture healing. However, some fracture cases cannot rely on natural bone repair, failing bone union. Various clinical approaches have been used to increase bone regeneration in fracture healing. However, there are still many limitations and various shortcomings. Mesenchymal stem cells (MSCs) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) play an important role in bone regeneration and repair, especially in osteogenesis. One alternative bone treatment that has been developed is to combine these two factors to increase the osteogenesis ability of MSCs. This research focuses on developing recombinant BMP-2 in the SPM secretome through genetic engineering by lentivirus vectors. The construction of the lentivirus vector plasmid carrying the BMP-2 gene consists of a transfer plasmid, a packaging plasmid, a regulatory plasmid, and an envelope plasmid, which is classified

into a second to third-generation lentivirus transition. The lentivirus vector titer that was successfully produced in HEK293T cells was 5.48×10^{10} copies/mL on day 2 and 1.42×10^{10} copies/mL on day 4. Lentivirus vector transduced SPM experienced an increase in BMP-2 gene expression with transduction results of 100 MOI (4.23 ± 0.22) higher than 50 MOI (2.49 ± 0.07). The inducible tet-off gene expression system in SPM can suppress BMP-2 gene expression by administering 100 ng/mL doxycycline and upregulation of gene expression occurs after removing doxycycline. Recombinant BMP-2 in MSCs was produced intracellularly (50 MOI: 1015.2 ± 36 pg/mL and 100 MOI: 992.5 ± 33.9 pg/mL) but secreted extracellularly in low quantity, yaitu $84,5 \pm 6,9$ pg/mL dan $75,8 \pm 3,4$ pg/mL in 50 and 100 MOI group respectively. Recombinant BMP-2 in the SPM secretome did not significantly increase osteogenic differentiation compared with standard commercial osteogenic differentiation induction media. Further studies are needed regarding the secretion capability of recombinant BMP-2 which is also related to the biological functionality of recombinant BMP-2