

Efek Penghambatan Aktivitas Enzim Polo-Like Kinase 1 (PLK1) Pada Pembelahan Mitosis Sel Kanker Serviks

The Effect of Inhibition of Polo-Like Kinase 1 (PLK1) Activity on Cervical Cancer Cell Mitosis

Hartono^{1*}, Hasri², Ika Yustisia³, Rusdina Bte Ladju⁴, Irma Rapi¹, Tiara Putri Amelia¹,
Nur Putri Apriliani Basri¹, Eka Risdianti², St. Sulfia Afdalia²

*Email: hartono@unm.ac.id

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, Makassar

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, Makassar

³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁴Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar

Diterima: 07 Mei 2022 / Disetujui: 30 Agustus 2022

ABSTRAK

PLK1 merupakan salah satu enzim kinase yang memiliki peranan yang sangat penting dalam mengontrol siklus dan pembelahan sel. Penghambatan aktivitas enzim PLK1 diharapkan berdampak pada penghambatan proses perkembangan sel kanker yang berakhir pada kematian sel sehingga PLK1 direkomendasikan sebagai salah satu gen target yang potensial dihambat dalam terapi penyakit kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penghambatan aktivitas enzim PLK1 menggunakan inhibitor BI 2536 terhadap pembelahan mitosis sel kanker serviks. Pengujian penghambatan aktivitas enzim PLK1 dilakukan pada kultur sel kanker serviks (HeLa) yang mengekspresikan plasmid EGFP- α tubulin dengan menggunakan inhibitor BI 2536 dengan konsentrasi 100nM selama 25 menit. Pengamatan dilakukan dengan teknik *Live cell imaging* dengan menggunakan mikroskop konfokal *laser-scanning* Olympus FV10i-LIV dengan objektif 60 \times PlanApo/1.45NA DIC. Gambar yang dihasilkan dari mikroskop konfokal kemudian diolah dan dianalisis dengan menggunakan aplikasi Adobe Photoshop CS6 dan ImageJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penghambatan aktivitas enzim PLK1 pada sel kanker HeLa dengan menggunakan inhibitor PLK1 BI 2536 menyebabkan sel mengalami kelainan pada spindle dan sentrosom yang menyebabkan sel mengalami kelambatan dalam tahap pembelahan mitosisnya. Gangguan pada pembelahan mitosis menyebabkan sel mengalami kematian (apoptosis).

Kata Kunci: PLK1, mitosis, sel kanker serviks, HeLa, BI 2536

ABSTRACT

PLK1 is a kinase enzyme that has a very important role in controlling cell cycle and division. Inhibition of PLK1 enzyme activity is expected to have an impact on inhibiting the process of cancer cell development which ends in cell death so that PLK1 is recommended as one of the target genes that can potentially be inhibited in cancer therapy. The purpose of this study was to determine the effect of inhibiting PLK1 enzyme activity using the BI 2536 inhibitor on mitotic division of cervical cancer cells. Tests for inhibition of PLK1 enzyme activity were carried out on cervical cancer cell cultures (HeLa) expressing the plasmid EGFP- α tubulin using BI 2536 inhibitor at a concentration of 100nM for 25 minutes. Observations were made using Live cell imaging technique using an Olympus FV10i-LIV laser-scanning confocal microscope with a 60 \times PlanApo/1.45NA DIC objective. The images produced by the confocal microscope were then processed and analyzed using Adobe Photoshop CS6 and ImageJ applications. The results showed that inhibition of PLK1 enzyme activity in HeLa cancer cells using the PLK1 inhibitor BI 2536 caused cells to experience abnormalities in the spindle and centrosomes which caused cells to experience delays in their mitotic division stage. Disturbances in mitotic division cause cells to experience death (apoptosis).

Keywords: PLK1, mitosis, cervical cancer cells, HeLa, BI 2536



This work is licensed under Creative Commons Attribution License 4.0 CC-BY International license

A. PENDAHULUAN

Kanker adalah salah satu penyakit dengan tingkat mortalitas yang tinggi saat ini (Dermani et al, 2019). Beberapa terapi yang sering dilakukan dalam pengobatan penyakit kanker adalah kemoterapi, pembedahan dan radioterapi (Remitha et al, 2020). Diantara ketiga metode tersebut kemoterapi merupakan salah satu cara yang sering dipilih karena dipercaya memberikan hasil yang lebih baik. Namun demikian metode ini memiliki sejumlah kelemahan diantaranya kurang selektif dalam memilih dan mengeliminasi sel kanker serta toksisitas yang tinggi pada sel dan jaringan yang sehat (Sharifiaghdam et al, 2021).

Metode terapi yang sering dilakukan pada pengobatan kanker payudara adalah pembedahan dan kemoterapi yang memiliki sejumlah efek samping (Dermani et al, 2019; Remitha et al, 2020). Pembedahan akan menyebabkan perubahan bentuk payudara, terjadinya pembengkakan, dan hematoma sedangkan kemoterapi memiliki toksisitas yang tinggi pada sel dan jaringan yang sehat, menyebabkan rambut rontok dan menurunkan kekebalan tubuh (Turner et al, 2015). Sampai saat ini belum ada metode terapi yang aman dan efektif dalam penanganan penyakit kanker payudara.

PLK1 merupakan salah satu jenis enzim kinase yang merupakan anggota dari kelompok enzim kinase *serine/threonine* yang ditemukan secara luas pada sel

eukariotik. PLK1 memiliki peranan yang sangat penting dalam mengontrol siklus sel khususnya ketika sel melakukan replikasi DNA (Fase S) dan pada saat sel akan memasuki fase mitosis (*G2/M checkpoint*). Selama proses mitosis berlangsung, PLK1 berperan dalam meregulasi pembentukan spindle dan sentrosom, mengatur pemisahan kromosom selama metaphase dan terlibat dalam proses sitokinesis (Giordano et al, 2019).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa terdapat hubungan antara overekspresi gen PLK1 dengan pembentukan sel kanker. Liu et al (2017) meneliti ekspresi gen PLK1 pada 19 tipe sel kanker yang berbeda. Mereka menemukan adanya fenomena overekspresi gen PLK1 pada jenis kanker yang diteliti dibandingkan dengan sel normal. Pasien kanker dengan overekspresi gen PLK1 juga menunjukkan gejala yang lebih parah. Gen PLK1 juga dilaporkan mengalami overekspresi pada beberapa jenis kanker diantaranya kanker payudara (Jeong et al, 2019), kanker glioma (Cheng et al, 2012) dan *hepatocellular carcinoma* (Lin et al, 2018) Berdasarkan sejumlah hasil penelitian yang telah dipublikasi sebelumnya maka PLK1 direkomendasikan sebagai salah satu gen target yang potensial dihambat dalam terapi penyakit kanker payudara (Zhao et al, 2021; Montaudon et al, 2020).

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh

penghambatan aktivitas enzim PLK1 menggunakan BI 2536 terhadap pembelahan mitosis sel kanker serviks. Hasil penelitian ini diharapkan menyediakan informasi untuk pengembangan metode pengobatan penyakit kanker yang memiliki potensi keberhasilan yang tinggi serta aman dari efek samping. Penelitian ini diharapkan bisa berkontribusi dalam menyediakan alternatif pengobatan penyakit kanker berbasis teknologi penghambatan aktivitas enzim PLK1 yang aman dan efektif.

B. METODE PENELITIAN

Pengujian penghambatan aktivitas enzim PLK1 dilakukan pada kultur sel kanker serviks (HeLa) yang mengekspresikan plasmid EGFP- α tubulin. Sel ini adalah sel yang telah ditransfeksi dengan plasmid EGFP- α tubulin sehingga secara permanen akan mengekspresikan protein EGFP- α tubulin yang akan menyebabkan sel tampak berfluoresensi warna hijau apabila diamati dengan menggunakan mikroskop konfokal atau mikroskop fluoresensi. Sel tersebut dibuat sebagai sel model untuk memudahkan pengamatan khususnya pada penelitian yang berkaitan dengan pembelahan sel secara mitosis (Hartono et al, 2019). Pada Penelitian ini kultur sel kanker HeLa yang mengekspresikan plasmid EGFP- α tubulin diberi perlakuan menggunakan inhibitor BI 2536 untuk menghambat aktivitas dari enzim PLK1. Sel kanker HeLa ditumbuhkan

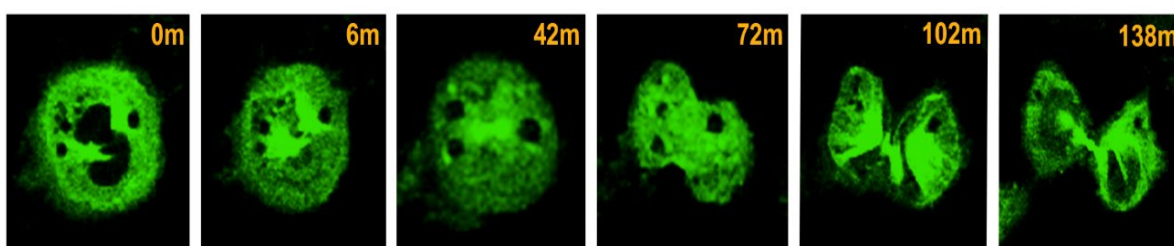
pada *glass bottom dish* 35 mm (*live cell imaging dish*) menggunakan medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang disuplementasi dengan 10% (v/v) *fetal bovine serum* (Life Technologies) dan 50 U/ ml antibiotik penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque). Sel ditumbuhkan dengan kepadatan 10^5 sel/*well*. Selanjutnya sel diinkubasi pada inkubator CO₂ pada suhu 37⁰ C yang disuplai dengan 5% CO₂, kelembaban 98% selama 24-48 jam. Sebelum pemberian inhibitor BI 2536, medium DMEM dibuang dan sel dicuci terlebih dahulu dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Hartono et al, 2019; Dewi et al, 2021). Kultur sel selanjutnya ditambahkan medium DMEM baru dan ditambahkan inhibitor BI 2536 dengan konsentrasi 100 nM sedangkan kelompok kontrol ditambahkan DMSO. Sel selanjutnya diinkubasi kembali selama 25 menit untuk memberikan waktu kepada sel untuk menyerap BI 2536. Setelah masa inkubasi selesai, medium dibuang kemudian sel dicuci kembali dengan PBS selanjutnya ditambahkan medium baru sebanyak 1 ml. Untuk mendapatkan banyak sel yang melakukan mitosis secara bersamaan maka sel terlebih dahulu disinkronisasi dengan menggunakan *double thymidine block*. *Live cell imaging* dilakukan dengan menggunakan mikroskop konfokal laser-scanning Olympus FV10i-LIV dengan objektif 60 \times PlanApo/1.45NA DIC pada sel yang sedang mengalami proses mitosis

sampai sitokinesis. Gambar yang dihasilkan dari mikroskop konfokal kemudian diolah dan dianalisis dengan menggunakan aplikasi Adobe Photoshop CS6 dan ImageJ (imagej.nih.gov/ij/) (Hartono et al, 2019; Dewi et al, 2021).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sel kanker serviks (HeLa) yang telah ditumbuhkan pada *glass bottom dish* 35 mm dengan konfluensi sekitar 70-90% kemudian

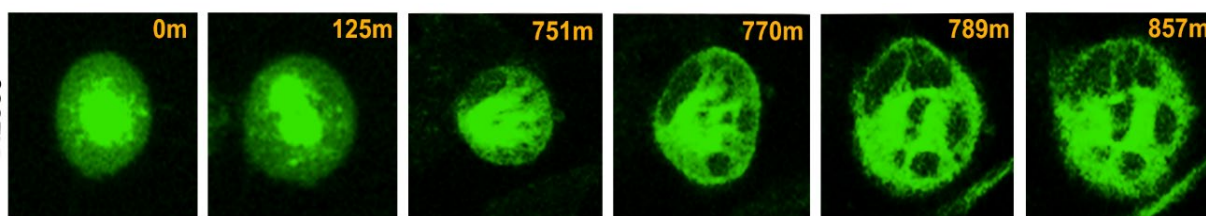
disinkronisasi dengan menggunakan *double thymidine block* selanjutnya diberi perlakuan inhibitor PLK1 BI 2536 dan DMSO (kontrol). Efek penghambatan aktivitas enzim PLK1 diamati pada saat sel mengalami proses pembelahan mitosis dengan teknik Live cell imaging menggunakan mikroskop konfokal *laser-scanning* Olympus FV10i-LIV yang datanya disajikan pada gambar 1, 2, 3 dan 4.



Gambar 1. Pola pembelahan mitosis pada sel kanker serviks (HeLa) dengan pemberian DMSO (Kontrol).

Pada Gambar 1 bisa dilihat bahwa sel kanker HeLa mengekspresikan plasmid EGFP- α tubulin secara konsisten sehingga sel tampak berfluoresensi warna hijau setelah diamati dengan menggunakan mikroskop konfokal. Pada gambar 1 juga bisa dilihat bahwa sel yang diberi perlakuan DMSO tampak mengalami pembelahan

mitosis secara normal dengan melalui semua tahapan pembelahan mitosis mulai dari profase, metaphase, anaphase, telophase dan berakhir pada tahap sitokinesis dimana sel terpisah menjadi dua sel yang baru. Waktu yang digunakan oleh sel kanker HeLa untuk menyelesaikan proses pembelahan mitosisnya sekitar satu jam.



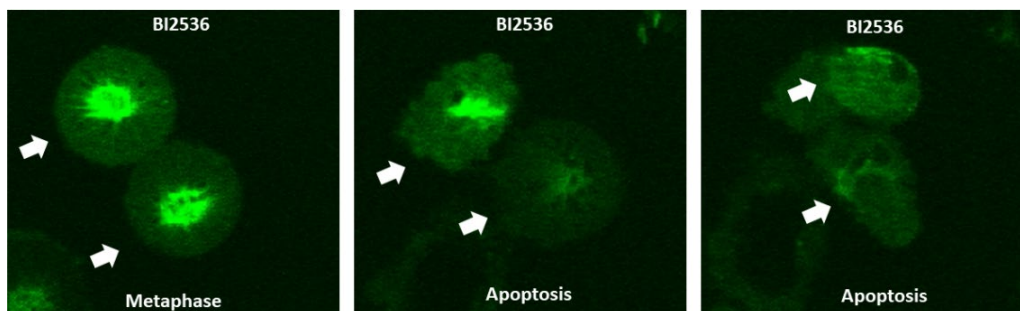
Gambar 2. Efek inhibitor PLK1 BI 2536 terhadap mitosis sel kanker serviks (HeLa)

Pada kelompok sel yang diberikan inhibitor PLK1 BI 2536 seperti yang disajikan pada Gambar 2 tampak bahwa sel

mengalami kelambatan dalam semua tahapan pembelahan mitosisnya jika dibandingkan dengan kelompok sel yang

diberi DMSO saja (Kontrol). Sel kanker HeLa tampak tertahan pada tahap pembelahan mitosis dalam waktu yang lama sekitar 800 menit. Selain itu sel juga tidak dapat menyelesaikan proses mitosisnya. Tampak pada gambar 2 bahwa sel kanker

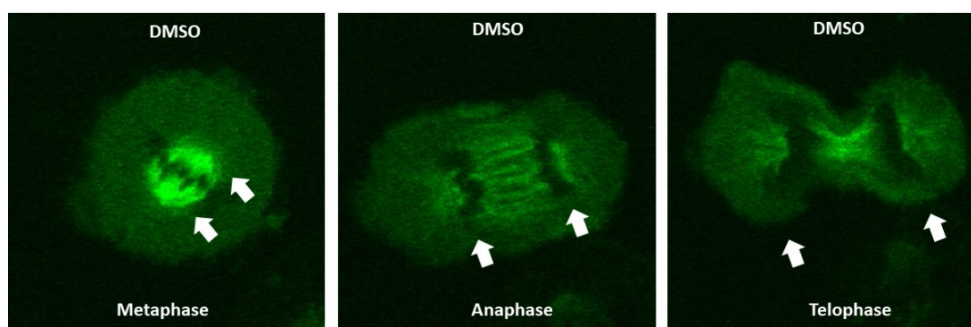
HeLa yang telah diberi BI 2536 tidak mampu membelah menjadi dua sel yang baru (sitokinesis) dan cenderung mengarah pada kematian sel (apoptosis) seperti yang ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Sel kanker HeLa setelah diberi perlakuan inhibitor BI 2536 mengalami kematian (apoptosis) seperti ditunjukkan pada tanda panah.

Baik pada gambar 2 dan gambar 3 terlihat bahwa sel kanker HeLa yang telah diberi perlakuan dengan inhibitor PLK1 BI 2536 selama 25 menit akan mengalami kelainan yang disebut *monopolar spindle* yang tampak pada tahap metaphase. Abnormalitas pada tahap mitosis dalam bentuk *monopolar spindle* terjadi karena pada saat sel mengalami metaphase, sentrosom tidak bergerak menuju ke dua kutub sel yang berlawanan tetapi berada pada kutub yang sama. Hal ini menyebabkan kromosom tidak mengalami pemisahan pada

saat sel memasuki tahap metaphase. Hal ini berbeda dengan sel HeLa yang hanya diberi DMSO dimana sel menunjukkan spindle yang bipolar (normal) sehingga sel mengalami pembelahan mitosis secara normal (Gambar 4). Pada saat tahap anaphase berlangsung tampak bahwa kromosom homolog tertarik menuju ke dua kutub yang berlawanan (Gambar 4). Sel yang menunjukkan tahap metaphase dan anaphase yang normal akan menyelesaikan tahapan mitosisnya dengan normal pula.



Gambar 4. Sel kanker HeLa bipolar pada saat tahap transisi metaphase-anaphase berlangsung.

Fenomena proses pembelahan mitosis pada sel kanker HeLa yang abnormal seperti *mitotic delay*, *monopolar spindle* dan apoptosis dapat disebabkan karena inhibitor PLK1 BI 2536 bekerja menghambat aktivitas enzim PLK1 yang memiliki peranan penting dalam mengendalikan proses pembelahan sel (mitosis). PLK1 memiliki peranan yang sangat penting dalam mengontrol siklus sel khususnya ketika sel akan memasuki fase mitosis (*G2/M checkpoint*). Selama proses mitosis berlangsung, PLK1 berperan dalam meregulasi pembentukan benang spindel dan sentrosom, mengatur pemisahan kromosom selama metaphase dan terlibat dalam proses sitokinesis (Giordano et al, 2019; Smith et al, 2019).

Beberapa hasil penelitian yang relevan dengan hasil penelitian ini melaporkan bahwa penghambatan aktivitas enzim PLK1 dengan inhibitor enzim secara efektif menghambat proliferasi sel kanker payudara dan menginduksi kematian sel (apoptosis) (Ueda et al, 2019; Serrano-Sevilla et al, 2019; Zhao et al, 2021). Jeong et al (2018) melaporkan bahwa penghambatan aktivitas enzim PLK1 secara in vitro menggunakan inhibitor enzim BI 2536 pada sel kanker payudara MCF-7 resisten tamoxifen (TAMR-MCF-7) menunjukkan penghambatan pertumbuhan (proliferasi) sel kanker TAMR-MCF-7. Penelitian ini dilanjutkan dengan uji penghambatan

aktivitas enzim PLK1 dengan inhibitor BI 2536 secara in vivo pada tikus yang diinduksi mengalami kanker payudara. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa inhibitor BI 2536 dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dan penyebarannya (metastasis). Hasil yang sama dipublikasikan oleh Ueda et al (2019) pada *triple negative breast cancer* (TNBC). Mereka menemukan bahwa penghambatan aktivitas enzim PLK1 dengan inhibitor BI 2536 menyebabkan pembelahan sel kanker berhenti pada tahap G2/M sehingga memicu peningkatan populasi sel kanker yang mengalami poliploidi (multinukleat). Kondisi ini menyebabkan sel tidak berkembang dan berujung pada kematian (apoptosis) (Ueda et al, 2019).

D. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan bisa disimpulkan bahwa penghambatan aktivitas enzim PLK1 pada sel kanker HeLa dengan menggunakan inhibitor PLK1 BI 2536 akan menyebabkan sel mengalami kelainan pada spindel dan sentrosom yang dikenal dengan *monopolar spindle* yang menyebabkan sel mengalami kelambatan dalam tahap pembelahan mitosisnya. Kelainan ini menyebabkan sel tidak mampu melakukan pemisahan menjadi dua sel anakan yang baru (sitokinesis) dan akan mengarah pada kematian sel (apoptosis).

DAFTAR PUSTAKA

- Cheng, M. W., Wang, B. C., Weng, Z. Q., & Zhu, X. W. (2012). Clinicopathological significance of Polo-like kinase 1 (PLK1) expression in human malignant glioma. *Acta histochemica*, 114(5), 503-509.
- Dewi, F., Jiapaer, S., Kobayashi, A., Hazawa, M., Ikliptikawati, D. K., Hartono, Sabit, H., Nakada, M., & Wong, R. W. (2021). Nucleoporin TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) upregulation alters MTOR-HSF1 trails and suppresses autophagy induction in ependymoma. *Autophagy*, 17(4), 1001–1012.
- Giordano, A., Liu, Y., Armeson, K., Park, Y., Ridinger, M., Erlander, M., Reuben, J., Britten, C., Kappler, C., Yeh, E., & Ethier, S. (2019). Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibition synergizes with taxanes in triple negative breast cancer. *PloS one*, 14(11), e0224420.
- Hartono, Hazawa, M., Lim, K.S. et al. (2019). Nucleoporin Nup58 localizes to centrosomes and mid-bodies during mitosis. *Cell Div* 14, 7.
- Jeong, S. B., Im, J. H., Yoon, J. H., Bui, Q. T., Lim, S. C., Song, J. M., Shim, Y., Yun, J., Hong, J., & Kang, K. W. (2018). Essential Role of Polo-like Kinase 1 (Plk1) Oncogene in Tumor Growth and Metastasis of TamoxifenResistant Breast Cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 17(4), 825–837.
- Lin P., Wen D.Y., Dang Y.W., He Y., Yang H., Chen G. (2018). Comprehensive and integrative analysis reveals the diagnostic, clinicopathological and prognostic significance of polo-Like kinase 1 in hepatocellular carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem* ;47:925–947.
- Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol*. 2017 Feb;10(1):22-32. doi: 10.1016/j.tranon.2016.10.003. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27888710; PMCID: PMC5124362.
- Karimi Dermiani, F., Azizi Jalilian, F., Hossienkhani, H., Ezati, R., & Amini, R. (2019). siRNA Delivery Technology for Cancer Therapy: Promise and Challenges. *Acta Medica Iranica*, 57(2), 83-93.
- Montaudon, E., Nikitorowicz-Buniak, J., Sourd, L., Morisset, L., El Botty, R., Huguet, L., Dahmani, A., Painsec, P., Némati, F., Vacher, S., Chemlali, W., Masliah-planchon, J., Château-Joubert, S., Rega, C., Leal, M.F., Simigdala, N., Pancholi, S., Ribas, R., Nicolas, A., Meseure, D., VincentSalomon, A., Reyes, C., Rapinat, A., Gentien, D., Larcher, T., Bohec, M., Baulande, S., Bernard, V., Decaudin, D., Coussy, F., Le Romancer, M., Dutertre, G., Tariq, Z., Cottu, P., Driouch, K., Bièche, I., Martin, L., & Marangoni, E. (2020). PLK1 inhibition exhibits strong anti-tumoral activity in CCND1- driven breast cancer metastases with acquired palbociclib resistance. *Nature Communications*, 11.
- Remitha N. P. S. I., Rompis A. Y., Yani M. V. W., Wiguna I. G. W. W., Sadvika I. G. A. S., & Putra I. G. M. A. D. (2020). SiRNA Berbasis Aptamer- PLEGP1800 Enkapsulasi Chitosan: Literature Review Penatalaksanaan Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Health Science and Prevention*, 4(2), 68-78.
- Sharifiaghdam M, Shaabani E, Sharifiaghdam Z, De Keersmaecker H, De Rycke R, De Smedt S, Faridi-Majidi R, Braeckmans K and Fraire JC. (2021). Enhanced siRNA Delivery and Selective Apoptosis Induction in H1299 Cancer Cells by Layer-by-Layer-Assembled Se Nanocomplexes: Toward More Efficient Cancer Therapy. *Front. Mol. Biosci*. 8:639184.
- Smith, L., Farzan, R., Ali, S. et al. (2017). The responses of cancer cells to PLK1 inhibitors reveal a novel protective role for p53 in maintaining centrosome separation. *Sci Rep* 7, 16115.
- Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Mitchell, S.

- G., De Matteis, L., & de la Fuente, J. M. (2019). Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(14), 2570.
- Turner NC, Ro J, Andre F, Loi S, Verma S, H. I. (2015). Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 373:209–19.
- Ueda, A., Oikawa, K., Fujita, K. et al. (2019). Therapeutic potential of PLK1 inhibition in triple-negative breast cancer. *Lab Invest* 99, 1275–1286.
- Zhao, S., Geng, Y., Cao, L., Yang, Q., Pan, T., Zhou, D., Liu, J., Shi, Z., & Zhang, J. (2021). Deciphering the performance of polo-like kinase 1 in triple-negative breast cancer progression according to the centromere protein U-phosphorylation pathway. *American journal of cancer research*, 11(5), 2142–2158.
- Zhao, S., Geng, Y., Cao, L., Yang, Q., Pan, T., Zhou, D., Liu, J., Shi, Z., & Zhang, J. (2021). Deciphering the performance of polo-like kinase 1 in triple-negative breast cancer progression according to the centromere protein U-phosphorylation pathway. *American journal of cancer research*, 11(5), 2142–2158