

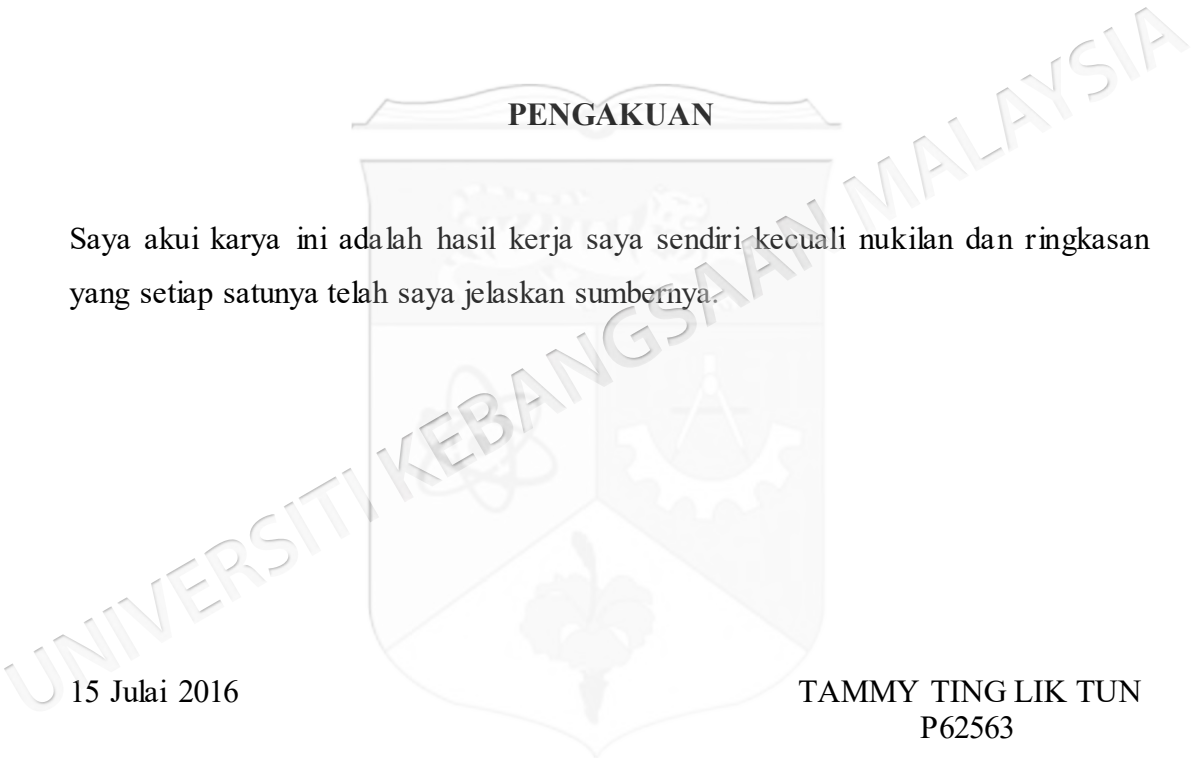
KAJIAN FUNGSI GEN YANG BERKAITAN DENGAN KANSER KOLOREKTAL
DI DALAM TITISAN SEL KEMOSENSITISIF BERIKUTAN
PENYENYAPAN GEN DAYA PEMROSESAN TINGGI

TAMMY TING LIK TUN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH
IJAZAH SARJANA SAINS

INSTITUT PERUBATAN MOLEKUL
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA BANGI
KUALA LUMPUR

2016



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

15 Julai 2016

TAMMY TING LIK TUN
P62563

PENGHARGAAN

Setinggi penghargaan dan ribuan terima kasih ingin saya sampaikan kepada Profesor Datuk Dr. A Rahman A Jamal dan Profesor Madya Dr. Norfilza Mohd Mokhtar selaku penyelia saya yang telah memberi banyak tunjuk ajar, bimbingan, sokongan dan nasihat sepanjang projek penyelidikan ini. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada ko-penyelia saya, Profesor Dr. Roslan Harun yang banyak memberi tunjuk ajar, didikan dan sokongan moral kepada saya.

Rakaman terima kasih juga ditujukan kepada Kementerian Pengajian Tinggi atas Penubuhan Pusat Kecemerlangan Pengajian Tinggi (*Higher Institution Centre of Excellence*, CoE) dan peruntukan geran JJ-007-2011 bagi menjalankan penyelidikan ini.

Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada semua felo penyelidik dan kakitangan UMBI yang selalu memberi bantuan dan tunjuk ajar bagi menjayakan projek ini.

Tidak dilupakan juga kepada rakan-rakan seperjuangan saya dari UMBI yang sentiasa memberi semangat dan bantuan dalam kajian dan analisis projek penyelidikan ini. Penghargaan khas juga diberikan kepada semua ahli keluarga tersayang saya yang banyak memberi bantuan, dorongan dan sokongan kepada saya.

Sekian, terima kasih.

ABSTRAK

Perkembangan teknologi gangguan RNA (RNAi) membolehkan kajian ke atas fungsi sasaran molekul tertentu dilakukan. Penggunaan RNAi bersama 5-fluorourasil (5-FU) mampu mengurangkan dos agen anti-kanser yang diperlukan. Integrasi di antara data mikroatur umum (Oncomine) dengan set data hasil kajian mikroatur terkini telah menghasilkan sebanyak 20 gen beregulasi menaik yang terlibat di dalam fungsi proliferasi dan kitaran sel. Kajian ini dijalankan untuk mengkaji peranan biologi gen-gen tersebut berikutan penyenapan gen dan rawatan 5-FU dalam titisan sel kanser kolorektal, HCT116 dan HT-29. Titisan sel dirawat dengan dos 5-FU yang berbeza bermula dengan 0 μ M sehingga 200 μ M selama 24, 48 dan 72 jam. Kesan sitotoksik 5-FU ditentukan dengan nilai perencatan kepekatan separa (IC_{50}). Titisan sel kemudiannya dirawat dengan RNA gangguan kecil (siRNA) dan dieram dengan 5-FU, iaitu 1/10 daripada kepekatan IC_{50} , untuk analisis fungsi yang selanjutnya. Keberkesanan penyenapan gen ditentukan dengan menggunakan kaedah kuantitatif tindak balas rantaian polimerase transkripsi berbalik (qPCR) selepas 48 jam tempoh transfeksi. Pengekspresan protein dikesan dengan menggunakan blot Western selepas 72 jam tempoh transfeksi. Kesan penyenapan gen terhadap pembahagian sel ditentukan dengan menggunakan asai viabiliti sel pendarcahaya *CellTiter-Glo*[®]. Kesan sel yang ditransfeksi dengan siRNA terhadap apoptosis ditentukan dengan menggunakan asai aktiviti *Caspase 3*. Kesan sel yang ditransfeksi dengan siRNA terhadap migrasi dan invasi masing-masing ditentukan dengan menggunakan asai migrasi sel *QCM chemotaxis* dan asai invasi sel *QCM collagen*. Penyenapan gen *transmembrane protein 97 (TMEM97)*, *dyskerin (DKC1)*, *sterile alpha motif (SAM) and leucine zipper (LZ) containing kinase AZK (ZAK)*, *CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2)* dan *non-metastatic cells 1 (NME1)* menurunkan pengekspresan mRNA secara signifikan selepas 48 jam transfeksi siRNA dalam kedua-dua titisan sel. Walau bagaimanapun, hanya 4 gen, iaitu *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK* dan *NME1*, yang menunjukkan perencatan viabiliti sel secara signifikan ($P < 0.05$) berbanding dengan sel kawalan pada kedua-dua titisan sel. RNAi yang mensasarkan *DKC1* menahan fasa G1 dalam kitaran sel HCT116. Penindasan *DKC1* mengurangkan viabiliti sel dan menahan kitaran sel kerana gen tersebut terlibat dalam biosintesis protein yang diperlukan untuk pembahagian dan viabiliti sel. Apabila digabungkan dengan rawatan 5-FU, penyenapan *DKC1* meningkatkan kemosisitiviti sel HCT116 dengan mengurangkan lagi viabiliti sel dan menyekat sel pada fasa S kitaran sel. Pengurangan signifikan migrasi sel HCT116 juga diperhatikan dalam RNAi yang mensasarkan *DKC1* dan *NME1*. Penyenapan *NME1* meningkatkan invasi sel HT-29 berbanding dengan sel kawalan ($P < 0.05$). Penindasan ekspresi *NME1* dapat meningkatkan invasi sel kerana *NME1* merupakan gen penindas metastasis yang menyekat invasi dan metastasis sel tumor. Kesimpulannya, penurunan ekspresi *DKC1* menggunakan RNAi meningkatkan aktiviti anti-tumor dan kesan kemosisitiviti kanser manusia. Penyenapan *DKC1* dengan kombinasi rawatan kemoterapi merupakan strategi yang berpotensi untuk menyekat pertumbuhan kanser kolorektal.

FUNCTIONAL STUDIES OF COLORECTAL CANCER-RELATED GENES IN CHEMOSENSITISED CELL LINES FOLLOWING HIGH-THROUGHPUT GENE SILENCING

ABSTRACT

The development of RNA interference (RNAi) technology has made it possible to suppress the function of specific molecular targets. It is hypothesised that the use of RNAi together with 5-fluorouracil (5-FU) would reduce the necessary dose of anti-cancer agents. Integration of publicly available microarray data (Oncomine) with the current microarray dataset revealed 20 up-regulated genes involved in proliferation and cell-cycle function. This study was performed to investigate their functional roles following gene silencing and 5-FU treatment in human colorectal cancer cell lines, HCT116 and HT-29. Cell lines were treated with different dosage of 5-FU ranging from 0 to 200 μ M for 24, 48 and 72 hours. The cytotoxic effect of 5-FU was then assessed by the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) value. Cell lines were then treated with small interfering RNAs (siRNA) and incubated with 5-FU in 1/10 of IC_{50} concentration for subsequent functional analyses. The efficacy of gene knockdown was assessed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) 48 hours post-transfection. Protein expression was detected by Western blot after 72 hours post-transfection. The effect of gene silencing on cell proliferation was assessed by CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay and cell cycle analysis. Cell apoptosis of siRNA-transfected cells were determined by caspase 3 activity assay. Cell migration and cell invasion of siRNA-transfected cells were analysed by QCM chemotaxis cell migration assay and QCM collagen cell invasion assay respectively. Silencing of *transmembrane protein 97 (TMEM97)*, *dyskerin (DKC1)*, *sterile alpha Motif (SAM)* and *leucine zipper (LZ) containing kinase AZK (ZAK)*, *CDC28 Protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2)* and *non-metastatic Cells 1 (NME1)* genes showed significant reduction of mRNA expression following 48 hours post-transfection in both cell lines. However, only four genes, namely *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK* and *NME1* showed significant suppression of cell viability ($P < 0.05$) compared to the control cells in both cell lines. RNAi targeting *DKC1* arrested HCT116 cells in the G1 phase of the cell cycle. Suppression of *DKC1* reduced cell viability and caused cell cycle arrest because this gene is involved in protein biosynthesis necessary for cell proliferation and viability. When combined with 5-FU treatment, RNAi-mediated *DKC1* enhanced chemosensitivity in HCT116 cells by further reduction in cell viability and arrested cells at S phase of the cell cycle. A significant reduction of HCT116 cell migration was observed following the RNAi targeting *DKC1* and *NME1* genes. Silencing of *NME1* increased the invasiveness of HT-29 cells relative to the control cells ($P < 0.05$). Suppression of *NME1* promoted cell invasiveness because *NME1* is a metastasis suppressor gene which inhibits tumor cell invasion and metastasis. In conclusion, RNAi-mediated downregulation of *DKC1* expression can lead to higher anti-tumor activity and chemosensitizing effects in human cancers. Silencing of *DKC1* in combination with chemotherapy treatment may represent a potential strategy to inhibit the growth of colorectal cancer.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI ILUSTRASI	x
SENARAI SINGKATAN	xv
SENARAI SIMBOL	xvi
SENARAI LAMPIRAN	xvii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif	5
1.2.1 Objektif umum	5
1.2.2 Objektif spesifik	5
1.3 Hipotesis	5
 BAB II KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Kanser Kolorektal	6
2.2 Gangguan RNA (RNAi)	13
2.3 Titisan Sel	20
2.3.1 HT-29	21
2.3.2 HCT116	21
2.4 5-Fluorourasil (5-FU)	22
 BAB III BAHAN DAN KAEDAH	
3.1 Titisan Sel	25

3.2	Transfeksi siRNA	26
3.3	Transfeksi siRNA Individu	32
3.4	Pengasaan Viabiliti Sel	32
3.5	Pengekstrakan RNA	33
	3.5.1 Penentuan kepekatan RNA	34
	3.5.2 Penentuan integriti RNA	35
3.6	Sintesis cDNA	36
3.7	Tindak Balas Rantai Polimerase Masa Nyata (qPCR)	36
3.8	Asai Migrasi Sel	40
3.9	Asai Invasi Sel	41
3.10	Asai Apoptosis Sel	42
3.11	Rawatan 5-FU	43
3.12	Analisis Kitaran Sel	44
3.13	Pengekstrakan Protein	44
3.14	Blot Western	45
3.15	Analisis Statistik	46
	3.15.1 Pengekspresan gen relatif	46
BAB 1V	HASIL KAJIAN	
4.1	Pengekspresan Gen	48
	4.1.1 Pengekspresan gen kawalan pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA	48
	4.1.2 Pengekspresan 20 gen pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA	50
	4.1.3 Pengekspresan gen kawalan pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA	60
	4.1.4 Pengekspresan 20 gen pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA	61
4.2	Asai Viabiliti Sel	72
	4.2.1 Viabiliti titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA	72
	4.2.2 Viabiliti titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA	73
	4.2.3 Viabiliti titisan sel HT-29 selepas pentitratan 5-FU	74
	4.2.4 Viabiliti titisan sel HCT116 selepas pentitratan 5-FU	75
	4.2.5 Viabiliti titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA spesifik bagi gen <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i>	76

	dan <i>NME1</i> diikuti dengan rawatan 5-FU	
4.2.6	Viabiliti titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA spesifik bagi gen <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> diikuti dengan rawatan 5-FU	77
4.3	Asai Migrasi Sel	79
4.3.1	Kesan penenyapan gen <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> atas migrasi titisan sel HT-29 dan HCT116	79
4.3.2	Kesan gabungan penenyapan gen <i>CKS2</i> dan rawatan 5-FU atas migrasi titisan sel HT-29	80
4.3.3	Kesan gabungan penenyapan gen <i>DKC1</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> diikuti rawatan 5-FU atas migrasi titisan sel HCT116	81
4.4	Asai Invasi Sel	82
4.4.1	Kesan penenyapan gen <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> atas invasi titisan sel HT-29 dan HCT116	82
4.4.2	Kesan gabungan penenyapan gen <i>NME1</i> diikuti rawatan 5-FU atas invasi titisan sel HT-29	83
4.5	Apoptosis Titisan Sel HCT116 Dan HT-29 Selepas Transfeksi siRNA	85
4.6	Analisis Kitaran Sel	86
4.6.1	Analisis kitaran sel HCT116 selepas penenyapan gen <i>DKC1</i> , <i>CKS2</i> , <i>TMEM97</i> , <i>ZAK</i> dan <i>NME1</i>	86
4.6.2	Analisis kitaran sel HT-29 selepas penenyapan gen <i>DKC1</i> , <i>CKS2</i> , <i>TMEM97</i> , <i>ZAK</i> , dan <i>NME1</i>	88
4.6.3	Analisis kitaran sel HCT116 selepas gabungan penenyapan gen dan rawatan 5-FU	89
4.6.4	Analisis kitaran sel HT-29 selepas gabungan penenyapan gen dan rawatan 5-FU	91
4.7	Pengekspresan Protein DKC1 Dan NME1 Dalam Titisan Sel HT-29 dan HCT116 Selepas Transfeksi siRNA	92
BAB V	PERBINCANGAN	95
BAB VI	KESIMPULAN	109
RUJUKAN		111
LAMPIRAN		132

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
3.1	Jujukan-jujukan sasaran siRNA	28
3.2	Jujukan primer dan proba bagi gen-gen yang dikaji	37
3.3	Campuran sampel untuk asai aktiviti <i>caspase 3</i>	43
4.1	Langkah pengiraan pengekspresan gen relatif daripada nilai ambang kitaran (Ct) dengan menggunakan kaedah $\Delta\Delta C_t$	47



SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
2.1	Sistem pengelasan kanser kolorektal yang umum	9
2.2	Laluan siRNA, miRNA dan piRNA	17
2.3	Mekanisme pengaktifan 5-FU	24
4.1	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen kawalan positif (<i>GAPDH</i>), kawalan negatif (siRNA bebas-RISC), transfeksi <i>mock</i> dan <i>non-transfected</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA dengan beta-aktin (<i>ACTB</i>) sebagai gen rujukan endogenus (*P < 0.05).	49
4.2	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>NME1</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA	50
4.3	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CKS2</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	51
4.4	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ZAK</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	51
4.5	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TMEM97</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	52
4.6	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>DKC1</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	52
4.7	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TPX2</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	53
4.8	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>RRM1</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	53
4.9	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ENO1</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	54
4.10	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>POLR1D</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	54

4.11	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>MCM7</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	55
4.12	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CDC25B</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	55
4.13	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>PCNA</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	56
4.14	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>RAN</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	56
4.15	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>GTF3A</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	57
4.16	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ODC1</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	57
4.17	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CSE1L</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	58
4.18	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CDK4</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	58
4.19	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>MYBL2</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	59
4.20	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TOP2A</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	59
4.21	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>S100A11</i> pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA.	60
4.22	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi kawalan positif (gen <i>GAPDH</i>), kawalan negatif (siRNA bebas-RISC), transfeksi <i>mock</i> dan <i>non-transfected</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA dengan beta-aktin.	61
4.23	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CKS2</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	62
4.24	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TMEM97</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	62

4.25	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>NME1</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	63
4.26	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>DKC1</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	63
4.27	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>PCNA</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	64
4.28	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ODC1</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	64
4.29	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ZAK</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	65
4.30	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>GTF3A</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	65
4.31	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>RAN</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	66
4.32	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>POLR1D</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	66
4.33	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CSE1L</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	67
4.34	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TPX2</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	67
4.35	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>ENO1</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	68
4.36	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>TOP2A</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	68
4.37	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>RRM1</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	69
4.38	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CDC2B</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	69
4.39	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>MYBL2</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	70

4.40	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>S100A11</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	70
4.41	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>CDK4</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	71
4.42	Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen <i>MCM7</i> pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA.	71
4.43	Histogram menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HT-29 bagi penenyapan 20 gen yang terpilih.	72
4.44	Histogram menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HCT116 bagi penenyapan 20 gen yang terpilih.	74
4.45	Graf menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HT-29 selepas 24 jam, 48 jam dan 72 jam rawatan 5-FU.	75
4.46	Graf menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HCT116 selepas 24 jam, 48 jam dan 72 jam rawatan 5-FU.	76
4.47	Histogram menunjukkan peratusan viabiliti sel HT-29 bagi transfeksi siRNA 5 gen yang terpilih dan gabungan siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU.	77
4.48	Histogram menunjukkan peratusan viabiliti sel HCT116 bagi transfeksi siRNA 5 gen yang terpilih dan gabungan siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU.	78
4.49	Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel bagi titisan sel HCT116 dan HT-29 selepas 48 jam tempoh transfeksi siRNA.	80
4.50	Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA dan gabungan transfeksi siRNA <i>CKS2</i> diikuti rawatan 5-FU.	81
4.51	Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA <i>DKC1</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> dan gabungan transfeksi siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU.	82
4.52	Histogram menunjukkan peratusan invasi sel pada titisan sel HCT116 dan HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA.	83

4.53	Histogram menunjukkan peratusan invasi titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA <i>NME1</i> dan gabungan transfeksi siRNA <i>NME1</i> diikuti rawatan 5-FU.	84
4.54	Histogram menunjukkan <i>absorbance</i> relatif <i>Caspase 3</i> bagi titisan sel HCT116 dan HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA.	85
4.55	Histogram menunjukkan peratusan populasi kitaran sel HCT116 selepas transfeksi siRNA <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> .	87
4.56	Histogram menunjukkan peratusan populasi kitaran sel HT-29 selepas transfeksi siRNA <i>TMEM97</i> , <i>DKC1</i> , <i>ZAK</i> , <i>CKS2</i> dan <i>NME1</i> .	89
4.57	Histogram menunjukkan peratusan populasi sel HCT116 dalam kitaran sel selepas gabungan rawatan siRNA dan 5-FU.	90
4.58	Histogram menunjukkan peratusan populasi sel HT-29 dalam kitaran sel selepas gabungan rawatan siRNA dan 5-FU.	92
4.59	Gambar menunjukkan pengurangan pengekspresan protein <i>DKC1</i> dan <i>NME1</i> dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HT-29, di mana protein beta-aktin bertindak sebagai kawalan dalaman.	93
4.60	Gambar menunjukkan pengurangan pengekspresan protein <i>DKC1</i> dan <i>NME1</i> dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HCT116, di mana protein beta-aktin bertindak sebagai kawalan dalaman.	94

SENARAI SINGKATAN

bp	pasangan bes
cDNA	DNA komplementari
Ct	<i>cycle threshold</i>
CO ₂	karbon dioksida
DNA	asid deoksiribonukleik
DMSO	dimetilsulfoksida
et. al	dan pengarang-pengarang lain
g	graviti
IC ₅₀	nilai perencatan kepekatan separa
kDa	kilo dalton
ml	mililiter
mm	millimeter
NCR	Pendaftaran Kanser Kebangsaan
ng	nanogram
nm	nanometer
NTC	kawalan bukan templat (Non template control)
pH	ukuran keasidan dan kealkalian larutan
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RIN	nilai integriti RNA
RNA	asid ribonukleik
RTF	<i>reverse transfection</i>
rpm	pusingan per minit
SD	sisihan piawai
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TNM	<i>classification of malignant tumours</i>

SENARAI SIMBOL

%	peratus
°C	darjah Celcius
μl	mikroliter
μM	mikromol
μg	mikrogram
$\leq$	kurang atau sama dengan
X	kali
Δ	perbezaan



SENARAI LAMPIRAN

No.		Halaman
A	Perwakilan analisis kitaran sel HCT116 selepas 48 jam tempoh transfeksi dengan menggunakan aliran sitometri	132
B	Perwakilan analisis kitaran sel HT-29 selepas 48 jam tempoh transfeksi dengan menggunakan aliran sitometri	134
C	Perwakilan analisis kitaran sel HCT116 selepas gabungan transfeksi siRNA dan 5-FU dengan menggunakan aliran sitometri	136
D	Perwakilan analisis kitaran sel HT-29 selepas gabungan transfeksi siRNA dan 5-FU dengan menggunakan aliran sitometri	138
E	Penerbitan	140

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Kanser kolorektal merupakan kanser yang ketiga paling kerap ditemui pada lelaki dan perempuan dan merupakan punca kematian kedua (selepas kanser paru-paru) di seluruh dunia (Jemal et al. 2008; Jemal et al. 2011). Pada tahun 2008, seramai 663, 600 kaum lelaki dan 570, 100 kaum perempuan didiagnosis menghadapi kanser kolorektal. Daripada jumlah ini, seramai 320, 600 kaum lelaki dan 288, 100 kaum perempuan mengalami kematian akibat daripada penyakit tersebut (Jemal et al. 2011).

Di Malaysia, kanser kolorektal merupakan kanser yang kedua paling kerap didiagnosis daripada keseluruhan jumlah kes kanser pada kaum lelaki dan kaum perempuan. Merujuk kepada laporan Pendaftaran Kanser Kebangsaan (NCR) 2007, sebanyak 2246 kes baru, iaitu merangkumi 12.3%, telah didiagnosis di Malaysia pada tahun 2007. Daripada jumlah tersebut, 55% terdiri daripada kaum lelaki, iaitu sebanyak 1235 kes dan 45% terdiri daripada kaum perempuan, iaitu sebanyak 1011 kes.

Kanser kolorektal bermula dengan pembentukan polip pada dinding kolon dan seterusnya membesar menjadi tumor dan akhirnya menjadi kanser (Cardoso et al. 2007). Banyak kajian telah dijalankan untuk mengkaji peranan gen dari perkembangan biasa, adenoma, karsinoma, sehingga ke peringkat metastasis kanser kolorektal. Sebagai contoh, mutasi pada onkogen *KRAS2* adalah berkait rapat dengan peringkat awal pembentukan kanser serta pertumbuhan dan perkembangan adenoma (Rajagopalan et al. 2002). Selain itu, perubahan dalam laluan transduksi isyarat faktor

pertumbuhan perubahan β (*TGF β*) juga terlibat dalam peringkat adenoma lewat dan karsinoma awal (Markowitz et al. 1995). Penyahaktifan gen penindas tumor *TP53* pula menyebabkan pertumbuhan sel-sel secara tidak terkawal dan transformasi malignan dari adenoma ke peringkat karsinoma (Purdie et al. 1991). Untuk setiap peringkat kanser, pengekspresan gen-gen yang terlibat adalah berbeza. Akan tetapi, peranan gen-gen tersebut dalam perkembangan kanser kolorektal masih kurang pasti.

Untuk mengkaji peranan gen-gen dalam pembentukan kanser kolorektal, kajian meta-analisis daripada empat kajian kanser kolorektal diperolehi daripada data Oncomine telah dijalankan untuk mendapatkan senarai gen yang mengandungi regulasi berbeza di antara kanser kolorektal dan tisu normal yang berpasangan (Alon et al. 1999; Notterman et al. 2001; Kaiser et al. 2007; Ki et al. 2007). Sebanyak empat ratus gen yang beregulasi menaik diperolehi daripada kajian meta-analisis ini kemudiannya dibandingkan dengan hasil kajian mikroatur kanser kolorektal oleh kumpulan kami. Sebanyak 20 gen mempunyai persamaan hasil perbandingan ini dan kesemua gen terlibat di dalam proses proliferasi dan kitaran sel. Gen-gen tersebut meliputi *cyclin-dependent kinase 4* (*CDK4*) (Ikeda et al. 1996), *topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa* (*TOP2A*) (Kim et al. 1999; Takahashi et al. 2006), *non-metastatic cells 1* (*NME1*) (Tomonaga et al. 2004; Takahashi et al. 2006), *ras-related nuclear protein* (*RAN*) (Bertucci et al. 2004; Xia et al. 2008), *proliferating cell nuclear antigen* (*PCNA*) (Notterman et al. 2001; Birkenkamp-Demtroder et al. 2002), *cellular apoptosis susceptibility* (*CSE1L/CAS*) (Bertucci et al. 2004; Cardoso et al. 2007; Liao et al. 2008), *enolase 1* (*ENO1*) (Tomonaga et al. 2004; Bi et al. 2006), *general transcription factor IIIA* (*GTF3A*) (Notterman et al. 2001; Birkenkamp-Demtroder et al. 2002), *polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa* (*POLR1D*) (Sheffer et al. 2009), *transmembrane protein 97* (*TMEM97/MAC30*) (Kayed et al. 2004; Zhao et al. 2011), *sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase* *AZK* (*ZAK*), *cell division cycle 25 homolog B* (*CDC25B*) (Kitahara et al. 2001; Notterman et al. 2001; Birkenkamp-Demtroder et al. 2002), *microtubule-associated, homolog* (*TPX2*) (Keen & Taylor 2004; Kollareddy et al. 2008), *v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2* (*MYBL2*) (Platzer et al. 2002; Ramsay & Gonda 2008), *CDC28 protein kinase regulatory subunit 2* (*CKS2*) (Notterman et al. 2001; Lin et al. 2002; Koehler et al. 2004), *minichromosome maintenance complex component 7*

(*MCM7*) (Honeycutt et al. 2006), *S100 calcium binding protein A11* (*S100A11*) (Kuramitsu & Nakamura 2006; Melle et al. 2006; Wang et al. 2008), *ribonucleotide reductase M1* (*RRM1*) (Cao et al. 2003), *ornithine decarboxylase 1* (*ODC1*) (Matsubara et al. 1995; Giardiello et al. 1997; Lin et al. 2002), dan *dyskeratosis congenita 1, dyskerin* (*DKC1*) (Alawi et al. 2011).

Gen-gen tersebut berkemungkinan memainkan peranan yang penting dalam karsinogenesis kanser kolorektal. Kitaran sel merupakan urutan peristiwa yang menghasilkan dua sel anak yang serupa daripada sel induk melalui proses replikasi dengan membahagi secara tepat maklumat genetik kepada sel-sel anak (Cooper 2000). Kitaran sel terbahagi kepada dua peringkat iaitu interfasa dan mitosis. Interfasa adalah berkaitan dengan penambahan jisim sel dan replikasi DNA, di mana ia boleh dibahagikan kepada fasa-fasa G1, S dan G2. Pertumbuhan sel berterusan sehingga ke seluruh interfasa manakala replikasi DNA sel pula mengambil masa yang lebih pendek dan dihadkan kepada fasa S. Apabila memasuki mitosis, sel induk akan membahagikan DNA kepada dua set yang lengkap dan membelah sel kepada dua sel anak dimana proses ini dikenali sebagai sitokinesis (Cooper 2000). Sel-sel yang normal biasanya membahagi secara tepat dan di bawah kawalan sel. Sel kanser terjadi apabila sesuatu sel tersebut membahagi secara berterusan tanpa henti dan di luar kawalan sel. Maka, pengawal aturan kitaran sel adalah penting supaya sel-sel membahagi dengan tepat. Gangguan dalam mekanisme pengawalan sel akan menjejaskan integriti genetik proses biologi sel.

Gangguan RNA (RNAi) digunakan secara meluas dalam kajian penenyapan gen untuk mengkaji fungsi-fungsi gen dalam pelbagai sel dan organisma (Hannon 2002). RNAi merupakan suatu mekanisme penenyapan gen yang berasaskan penguraian mRNA oleh RNA kecil (Fire 1999). Maka, mRNA yang diurai tidak dapat bertindak sebagai tapak translasi dan mendorong kepada fenomena penenyapan gen. Rantaian berganda RNA menjadi RNA kecil yang menyebabkan penenyapan gen dan mengawal pengekspresan gen pada semua peringkat, termasuk transkripsi, kestabilan mRNA dan translasi. RNA gangguan kecil (siRNA) merupakan RNA kecil yang mengakibatkan kejadian RNAi (Grosshans & Filipowicz 2008). siRNA terdiri daripada 20-25 urutan nukleotida yang mengawalatur pelbagai proses biologi. Ia

memainkan peranan penting dalam mengawal aktiviti *transposon* dan jangkitan virus, dan mengawal atur gen-gen yang mengekodkan protein.

Banyak kajian telah dibuat untuk merencat pengekspresan gen-gen tertentu dengan menggunakan siRNA. Contohnya, siRNA CD44 pada titisan sel kanser kolorektal, iaitu HT-29, menunjukkan lebih daripada 75% perencatan ekspresi CD44 serta penurunan viabiliti dan perlekatan sel, serta meningkatkan kadar apoptosis (Subramaniam et al. 2007). SiRNA juga digunakan untuk merencat pengekspresan reseptor faktor I pertumbuhan mirip-insulin (IGF-IR) dan reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) dalam sel-sel DLD-1 dan Caco-2, iaitu titisan sel kanser kolorektal. Apabila gen-gen ini dirawat dengan siRNA, kadar proliferasi sel menurun dan kadar apoptosis sel meningkat (Kaulfuss et al. 2009). Selain itu, kadar pertumbuhan sel-sel glioma, U25, juga menyusut secara signifikan dalam selepas rawatan siRNA UbcH10. Tambahan pula, kesan RNAi ini juga mengaruh kejadian apoptosis melalui induksi Bax dan p53, pengurangan regulasi Bcl-2 dan penahanan fasa G2/M kitaran sel (Jiang et al. 2010).

Dalam kajian ini, RNAi digunakan untuk menurunkan pengekspresan gen-gen yang dikenali. Pembangunan teknologi RNAi membolehkan penyekatan fungsi sasaran gen tertentu. 5-FU merupakan agen anti-kanser yang popular dalam rawatan kanser kolorektal. Mekanisme tindakan bagi 5-FU termasuk perencatan *thymidylate synthase* menghalang penggabungan metabolitnya ke dalam RNA dan DNA, serta merencat kitaran sel dan apoptosis (Longley et al. 2003). Akan tetapi, kesan keseluruhan bagi 5-FU dalam pesakit kanser kolorektal adalah rendah, iaitu kira-kira 10–20% (Jones et al. 1995). Maka, strategi-strategi rawatan baru adalah perlu untuk meningkat kecekapan rawatan kanser kolorektal. RNAi merupakan strategi yang baik untuk merawat kanser di mana ianya lebih spesifik dan kurang toksik. Penggabungan siRNA dengan 5-FU juga mampu meningkatkan kemosisitiviti sel-sel tumor dan mengurangkan dos serta kesan sampingan agen anti-kanser.

1.2 OBJEKTIF

1.2.1 Objektif Umum

Untuk menentukan peranan gen-gen yang berkaitan dengan kanser kolorektal dalam titisan sel kanser kolorektal kemosensitif yang dirawat dengan 5-FU.

1.2.2 Objektif Khusus

- i. Untuk menentukan aras mRNA dan protein bagi gen-gen yang berkaitan dengan kanser kolorektal berikutan penenyapan gen dalam titisan sel HCT116 dan HT-29.
- ii. Untuk menentukan dos 5-fluorourasil (5-FU) yang optimum untuk mendapatkan fungsi kehilangan gen-gen yang berkaitan dengan kanser kolorektal.
- iii. Untuk menentukan fungsi kehilangan gen-gen seperti viabiliti, kitaran sel, motiliti dan apoptosis dalam titisan sel yang dirawat dengan 5-FU.

1.3 HIPOTHESIS

- i. Penenyapan gen mengurangkan mRNA bagi gen-gen yang beregulasi menaik dalam kanser kolorektal.
- ii. Gen-gen yang beregulasi menaik dalam kanser kolorektal berperanan penting dalam proses pembahagian sel, motiliti, apoptosis dan kitaran sel.
- iii. Penggunaan RNAi bersama 5-FU mampu mengurangkan dos 5-FU yang diperlukan untuk menyekat pertumbuhan sel kanser kolorektal.

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 KANSER KOLOREKTAL

Kanser kolorektal, merupakan kanser kedua (11.9%) yang kerap berlaku di Malaysia selepas kanser payudara (18%) dan diikuti dengan kanser paru-paru (7.4%). Merujuk kepada laporan daripada Pendaftaran Kanser Kebangsaan (NCR) 2008, sebanyak 67,792 kes baru kanser kolorektal telah dilaporkan di Semenanjung Malaysia pada tahun 2003 hingga 2005. Daripada jumlah tersebut, 43.7% terdiri daripada kaum lelaki, iaitu sebanyak 29,596 kes dan 56.3% terdiri daripada kaum perempuan, iaitu sebanyak 38,196 kes.

Proses pembentukan kanser kolorektal bermula dari peringkat adenoma ke peringkat karsinoma dan seterusnya metastasis. (Cardoso et al. 2007). Kemunculan *aberrant crypt focus* (ACF) di bahagian epitelium kolon pada peringkat awal adalah kesan daripada perbezaan sel-sel yang abnormal dan tanpa kawalan. Terdapat dua jenis ACF yang mempunyai ciri-ciri histologi yang berlainan, iaitu ACF heteroplasia dan ACF displasia (Nucci et al. 1997). Permulaan ACF heteroplasia adalah disebabkan oleh mutasi pada onkogen *KRAS2* manakala permulaan ACF displasia adalah disebabkan oleh penyahaktifan gen penindas tumor, *adenomatous polyposis coli* (*APC*) (Smith et al. 1994; Lamlum et al. 2000). Sebanyak 70-80% *familial adenomatous polyposis* (FAP) adalah disebabkan oleh mutasi gen *APC* (Powell et al. 1992). Penyahaktifan gen *APC* menyahkawal laluan isyarat Wnt/ β -catenin yang menyebabkan pertumbuhan progresif ACF displasia dan seterusnya menyumbang kepada adenoma (Reya & Clevers 2005). Mutasi pada onkogen *KRAS2* pula berkaitan

dengan pembentukan kanser peringkat awal serta pertumbuhan dan perkembangan adenoma (Rajagopalan et al. 2002).

Selain itu, perubahan dalam laluan transduksi isyarat faktor- β pertumbuhan transformasi (TGF β) juga berperanan dalam perkembangan tumor kepada peringkat adenoma lewat dan karsinoma awal. Mutasi dalam komponen-komponen laluan TGF β seperti gen-gen *TGF β reseptor 2* (*TGF β R2*), *SMAD2* dan *SMAD4* boleh menjejaskan angiogenesis, pertumbuhan dan perbezaan sel (Markowitz et al. 1995; Eppert et al. 1996).

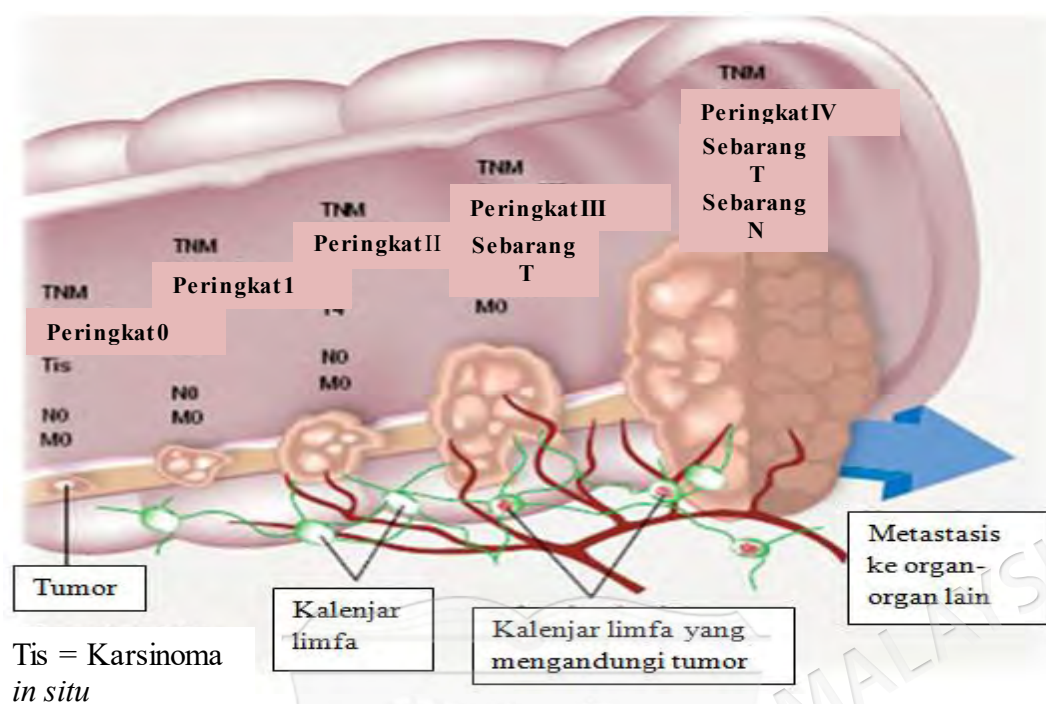
Penyahaktifan gen penindas tumor *TP53* juga berperanan dalam transformasi malignan dari adenoma ke peringkat karsinoma (Purdie et al. 1991). Protein p53 berfungsi untuk merencat pertumbuhan sel-sel dan merangsang kematian sel apabila sel tersebut berada dalam tekanan sel. Penyahaktifan gen *p53* menyebabkan pertumbuhan sel secara tidak terkawal dan memberi kesan dramatik dalam pengawalaturan integriti genom dalam sel usus (Cardoso et al. 2007).

Karsinoma kolorektal boleh dibahagikan kepada beberapa peringkat berasaskan invasi pada tapak utama dan kehadiran metastasis dalam nodus setempat dan organ-organ. Terdapat dua sistem pengkelasan kanser kolorektal yang umum, iaitu sistem Dukes' dan sistem TNM (Astler & Collier 1954; Sobin et al. 2010). Sistem Dukes' merupakan sistem pengkelasan kanser kolorektal yang lebih lama dan mudah. Dukes' A berlaku pada tahap yang paling awal apabila tumor muncul pada dinding kolon (mukosa). Dukes' B ialah tahap tumor yang menyerang menerusi dinding kolon tetapi bukan kalenjar nodus. Dukes' C merupakan tahap tumor yang menyerang kalenjar nodus tetapi bukan organ-organ lain. Dukes' D berlaku apabila tumor telah menyebar ke organ-organ lain dalam badan (Astler & Collier 1954; Cardoso et al. 2007).

Sistem TNM terdiri daripada tiga kategori yang berasaskan nombor. 'T' merujuk kepada darjah invasi pada dinding kolon, 'N' merujuk kepada penglibatan nodus limfa manakala 'M' merujuk kepada darjah metastasis (Sobin et al. 2010). Huruf T merujuk kepada saiz dan darjah invasi tumor yang diwakili oleh nombor

sifar hingga 4. Simbol 'N0' menunjukkan ketidakhadiran tumor dalam nodus limfa; 'N1' menunjukkan kehadiran metastasis nodus setempat; 'N2' menunjukkan penyebaran tumor ke lebih daripada satu nodus manakala 'N3' menunjukkan penyebaran tumor ke nodus limfa yang lebih jauh. Simbol 'M0' pula menunjukkan ketidakhadiran metastasis tumor manakala 'M1' bermaksud metastasis berlaku ke organ-organ yang berjauhan (Sobin et al. 2010).





Rajah 2.1 Sistem pengkelasan kanser kolorektal yang umum

Sumber: Ubah suai daripada Persatuan Kanser Kolorektal Kanada

Tanda-tanda atau simptom-simptom kanser kolorektal adalah bergantung kepada lokasi tumor dalam kolon. Simptom utama kanser kolorektal ialah kesakitan pada bahagian abdomen dan perubahan tabiat membuang air besar seperti sembelit atau cirit-birit. Pendarahan dalam kolon dan kehadiran darah dalam najis juga merupakan salah satu tanda kanser kolorektal. Selain itu, kehilangan selera makan, mual, muntah, kehilangan berat badan secara mendadak dan keletihan juga menunjukkan seseorang itu menghadapi kanser kolorektal (Majumdar et al. 1999).

Terdapat banyak faktor yang menyebabkan kanser kolorektal (Boyle & Leon 2002). Usia yang lebih lanjut meningkatkan risiko seseorang untuk mendapat kanser tersebut (Edwards et al. 2002). Contohnya, individu yang berusia lebih daripada 60 tahun mempunyai peluang yang tinggi untuk menghadapi kanser kolorektal berbanding dengan seseorang yang berusia kurang daripada 50 tahun. Individu yang mempunyai sejarah keluarga kanser kolorektal atau kanser lain juga mempunyai risiko yang tinggi untuk mendapat kanser kolorektal (Strate & Syngal 2005). Selain itu, pemakanan daging merah yang berlebihan dan kekurangan sayur-sayuran dan buah-buahan, juga meningkatkan risiko seseorang untuk menghadapi kanser kolorektal (Chao et al. 2005).

Kehadiran polip dalam kolon juga merupakan salah satu faktor kejadian kanser kolorektal. Individu yang mempunyai keluarga terdekat yang menghadapi polip adenoma sebelum usia 60 mempunyai risiko relatif kanser sebanyak 2.59 (Winawer et al. 1996). Saiz dan histologi polip adalah berkait secara langsung dengan risiko kanser kolorektal. Risiko seseorang yang mempunyai saiz polip melebihi 2 cm adalah 50% lebih tinggi berbanding dengan polip yang kecil (Winawer et al. 1996). Pembuangan polip melalui kolonoskopi dapat merendahkan risiko seseorang individu untuk mendapat kanser.

Faktor genetik seperti penyakit *familial adenomatous polyposis* (FAP), *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC) atau sindrom *lynch*, *MYH-associated polyposis*, sindrom *Peutz Jegher* dan sindrom *juvenile polyposis* telah dikenalpasti meningkatkan risiko kanser kolon (de la Chapelle 2004; Cardoso et al. 2007; Labianca et al. 2010). Penyakit inflamasi kolon seperti penyakit *ulcerative colitis* atau *crohn's* juga merupakan salah satu risiko kanser kolorektal (DeCosse et al.

1994). Risiko tersebut adalah bergantung pada tempoh inflamasi dan darjah inflamasi penyakit tersebut di kolon (Xie & Itzkowitz 2008).

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa perokok tegar untuk jangka masa panjang mempunyai risiko sebanyak dua hingga tiga kali ganda lebih tinggi untuk mendapat kanser berbanding dengan individu biasa (Giovannucci 2001). Selain itu, meminum arak seperti bir juga meningkatkan risiko kanser sebanyak dua kali ganda lebih tinggi daripada individu biasa (Martinez et al. 1995).

Kekurangan aktiviti fizikal juga menyumbang kepada kejadian kanser kolorektal (Labianca et al. 2010). Seseorang individu yang mempunyai aktiviti fizikal yang aktif adalah berisiko rendah berbanding dengan individu yang kurang aktif (Shephard 1993). Faktor persekitaran juga merupakan salah satu punca kejadian kanser tersebut (Boyle & Leon 2002). Di samping itu, wanita yang menghadapi penyakit kencing manis juga berisiko tinggi untuk menghadapi kanser kolorektal (Nilsen & Vatten 2001). Insulin dan faktor pertumbuhan mirip-insulin merangsang perbezaan sel-sel kolorektal (Boyle & Leon 2002). Tambahan pula, regulasi menaik bagi reseptor insulin mendorong transformasi sel secara *in vitro*. Adenokarsinoma kolorektal mempunyai pengekspresan reseptor insulin yang tinggi menunjukkan sel-sel tersebut adalah sensitif terhadap kesan pertumbuhan insulin (Kiunga et al. 2004). Wanita yang menghadapi kanser payudara dan kanser ovari juga mudah menghadapi kanser kolorektal (Byers et al. 1982).

Endoskopi merupakan satu kaedah yang memberikan diagnostik penglihatan untuk menilai permukaan dalaman organ dengan memasukkan tiub ke dalam usus. (Baxter et al. 2009; Atkin et al. 2010). Kaedah ini adalah cara pemeriksaan yang tepat, sensitif dan spesifik. Ujian darah *fecal occult* (FOB) memeriksa kehadiran darah yang tersembunyi dalam najis (Grazzini et al. 2009). Ujian tersebut boleh menguji sifat-sifat seperti heme, globin, porfirin atau DNA sel-sel dari mukosa usus. Ujian DNA najis boleh mengesan perubahan genetik seperti mutasi pada gen *APC*, *KRAS*, *p53* dan *BAT26*, yang merupakan gen yang terlibat dalam ketidakstabilan mikrosatelit (MSI) (Ahlquist et al. 2000). Akan tetapi, ujian tersebut adalah kurang sensitif,

dengan tahap sensitivitinya adalah di antara 60 hingga 90%. Kos ujian ini juga tinggi menyebabkan ianya kurang digunakan.

Ujian darah juga dilakukan untuk mengesan kejadian kanser kolorektal. Peningkatan aras antigen karsinoembrionik (CEA) yang tinggi dalam darah menunjukkan kehadiran adenokarsinoma metastasis. Akan tetapi, ujian tersebut boleh memberi keputusan positif palsu atau negatif palsu kerana tahap CEA yang tinggi juga boleh dikesan dalam tumor payudara, pankreas, perut dan paru-paru (Wanebo et al. 1978). Tambahan pula, tahap CEA juga meningkat dalam perokok atau individu yang menghadapi penyakit kronik seperti inflamasi kolon, bronkitis, dan penyakit hati (Posner & Mayer 1994). Ujian tersebut adalah terhad kerana tahap CEA hanya meningkat apabila tumor telah menembusi lapisan serosa. Maka, ujian tersebut tidak sesuai dalam pengesanan awal kanser kolorektal.

Rawatan kanser kolorektal meliputi pembedahan, kemoterapi dan terapi radiasi (Weitz et al. 2005). Pembedahan setempat dibuat apabila kanser dikesan pada peringkat awal. Pembedahan yang lebih luas yang meliputi pemotongan tisu kanser dan tisu normal di sekelilingnya dibuat sekiranya tumor bersaiz lebih besar. Nodus limfa yang berhampiran perlu dikeluarkan untuk mengkaji sekiranya kanser telah merebak. Kolostomi dijalankan apabila sebahagian usus kecil dan segmen kolon besar dipotong dan doktor tidak berupaya untuk menyambung semula bahagian hujung kolon bersama. Sebuah lubang dibuka di dinding perut dan disambungkan dengan satu beg untuk mengumpulkan bahan buangan tubuh. Kolostomi boleh bersifat sementara atau kekal bergantung kepada keadaan pesakit (Nelson et al. 2001).

Rawatan kemoterapi pula menggunakan dadah untuk mengurangkan perkembangan metastasis, mengecilkan saiz tumor, dan memperlahankan pertumbuhan tumor. Kemoterapi boleh diberikan kepada pesakit sebelum pembedahan atau selepas pembedahan. Kemoterapi biasanya diberikan selepas pembedahan apabila tumor telah merebak ke bahagian nodus, iaitu peringkat ketiga kanser (Ades 2009). 5-Fluorourasil (5-FU) ialah kemoterapi yang diberi secara intravena yang telah digunakan sejak 1950-an (de Gramont et al. 2000; Jover et al. 2009). 5-FU merupakan anti-kanser fluoropirimidina dan strukturnya adalah mirip

dengan urasil dengan mengandungi fluoro pada karbon kedudukan kelima dalam cincin pirimidina. 5-FU meniru urasil semasa proses replikasi asid nukleik tetapi ia tidak mempunyai sifat kimia yang serupa dengan urasil. 5-FU tidak dapat dimetilkan oleh *thymidylate synthase* (TS) dan menyebabkan perencatan enzim tersebut dan penurunan hasil dTMP. Maka, kekurangan dTMP menyebabkan sel-sel kanser yang aktif tidak dapat bertumbuh dan mengalami kematian. 5-FU bergabung dengan DNA atau RNA dan menyebabkan penguraian helaian DNA dan penurunan sintesis protein (Longley et al. 2003; Jover et al. 2009). 5-FU biasanya diberi bersama dengan ubat lain seperti *leucovorin* atau asid folinik untuk meningkatkan keberkesanan 5-FU (Keshava et al. 1998).

Irinotecan merupakan sejenis kemoterapi intravena yang digunakan sejak tahun 1996. Ia ialah perencat kepada protein topoisomerase I, komponen nukleus yang penting semasa replikasi DNA. Maka, replikasi dan transkripsi DNA turut direncat (O'Dwyer & Catalano 2006). *Oxaliplatin* merupakan analog generasi ketiga yang berasaskan platinum. Ia menyasarkan DNA sel kanser dan merencatkan pertumbuhan sel kanser. *Oxaliplatin* biasanya digunakan bersama 5-FU dan *leucovorin* dalam rawatan kanser (de Gramont et al. 2000).

Selain itu, terapi radiasi juga dilakukan sebelum pembedahan untuk mengecilkan saiz tumor atau selepas pembedahan untuk membunuh sel-sel kanser yang mungkin tertinggal di badan. Terapi radiasi juga digunakan bersama dengan kemoterapi untuk mengurangkan peluang pengulangan kanser tersebut. Terapi radiasi menghentikan pertumbuhan sel-sel yang aktif, termasuk sel-sel kanser. Oleh sebab sel-sel normal dalam kolon juga membahagi dengan aktif, maka terapi radiasi juga menghentikan sel tersebut daripada terus membahagi. Kesan sampingan terapi radiasi termasuk muntah, cirit-birit, mual, kelelahan, pendarahan dan kesakitan rektum (Cummings 1993).

2.2 GANGGUAN RNA (RNAi)

Perkataan gangguan RNA (RNAi) telah digunakan oleh Fire dan rakan sekerjanya untuk menerangkan pemerhatian bahawa helaian berganda RNA boleh merencat

pengekspresan gen apabila dimasukkan ke dalam cacing (Fire et al. 1998; Fire 1999). Peristiwa RNAi telah dijumpai di dalam pelbagai haiwan, seperti lalat *Drosophila* (Kennerdell & Carthew 1998; Misquitta & Paterson 1999), *trypanosomes* (Ngo et al. 1998), *hydra* (Lohmann et al. 1999), *planaria* (Sanchez Alvarado & Newmark 1999), ikan zebra (Wargelius et al. 1999), dan tikus (Wianny & Zernicka-Goetz 2000). Selain itu, RNAi juga dijumpai dalam tumbuh-tumbuhan (Vaucheret et al. 1998; Waterhouse et al. 1998; Baulcombe 1999; Waterhouse et al. 1999) dan kulat *Neurospora* (Cogoni et al. 1996; Cogoni & Macino 1999; Cogoni & Macino 1999).

Non-coding RNA (ncRNA) atau RNA kecil berperanan penting dalam peristiwa RNAi. ncRNA terdiri daripada 20-30 nukleotida dan tidak ditranslasi kepada protein (Grosshans & Filipowicz 2008). Akan tetapi, mereka berperanan penting untuk mengawalatur pelbagai proses biologi terutamanya dalam mengganggu translasi mRNA (Montgomery et al. 1998). Kelas ncRNA yang paling umum ialah RNA gangguan kecil (siRNA), mikroRNA (miRNA) dan *piwi-associated RNAs* (piRNA) (Grosshans & Filipowicz 2008).

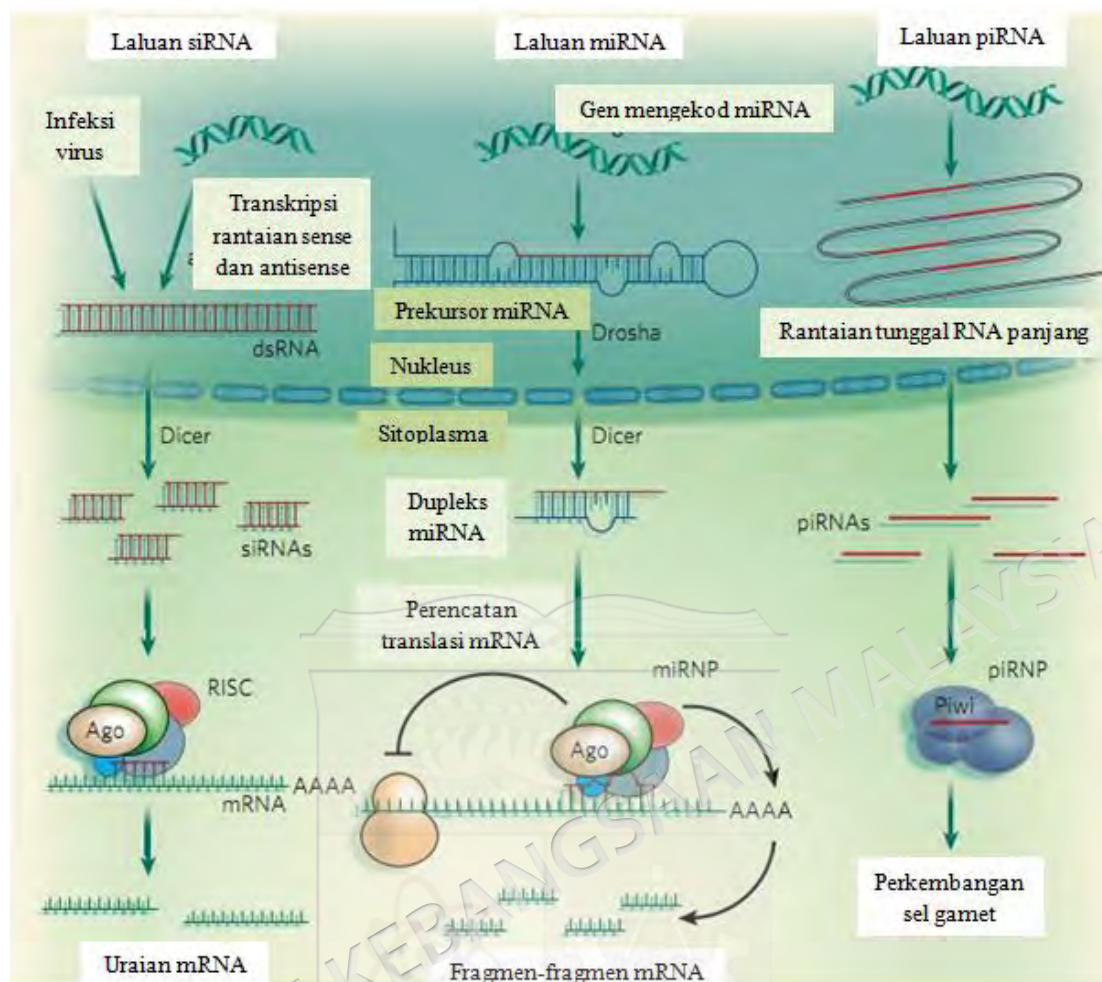
ncRNA adalah hasil daripada pemecahan prekursor panjang RNA. miRNA terdiri daripada 20-25 nukleotida yang dikodkan oleh gen-gen spesifik untuk merencat translasi dan mengurai mRNA dalam tumbuh-tumbuhan dan haiwan (Bartel 2004). miRNAs dihasilkan daripada prekursor pengekodan genom spesifik, di mana melipat menjadi *hairpin* intramolekul yang mengandungi segmen-segmen tidak berpasangan sempurna. Proses ini biasanya berlaku dalam dua langkah dan dikatalisis oleh Drosha enzim dalam nukleus dan Dicer enzim dalam sitoplasma. Salah satu hasil rantaian miRNA dupleks, menyerupai siRNA, kemudian bergabung dengan kompleks *RNA induced silencing* (RISC)-mirip miRNA-ribonukleoprotein (miRNP). Komponen utama RISC dan miRNP ialah keluarga protein Argonaute (Ago). miRNA mempengaruhi degradasi mRNA atau merencat pengekspresan mRNA bergantung kepada peringkat komplementari. Laluan miRNA bermula dengan penyingkiran mRNA ekor poli(A) (Grosshans & Filipowicz 2008).

miRNA berfungsi sebagai spesies rantaian tunggal RNA dan mengawalatur translasi sasaran mRNA yang berkomplementari (Carrington & Ambros 2003).

miRNA disintesis oleh RNA polimerase II kepada 60-70 nukleotida pre-miRNA. Pre-miRNA tersebut akan membentuk struktur *stem-loop* atau *hairpin* kerana mereka tidak berpasangan lengkap antara satu sama lain. Maka, ciri-ciri pre-miRNA ialah kehadiran ketidaksepadanan atau gegelung dalam rantaian (Pasquinelli 2002). Pre-miRNA tersebut kemudian dieksport ke sitoplasma untuk pemprosesan selanjutnya oleh Dicer (Lee et al. 2002). miRNA yang matang mempunyai saiz yang sama dengan siRNA, tetapi berantaian tunggal dan mengenal pada 3'UTR mRNA sasaran. miRNA memulakan penguraian mRNA dengan bergantung kepada takat homologi miRNA dengan sasaran (Doench et al. 2003). miRNA mengawalatur kebanyakan gen-gen mengekod protein di dalam mamalia dengan merencatkan pengekspresan gen (Edelstein & Bray 2011). Seseengah miRNA diekspres secara spontan manakala seseengah miRNA adalah tisu dan/atau peringkat spesifik pertumbuhan. Kandungan miRNA sel adalah berubah-ubah dari satu salinan sehingga 10,000 salinan (Chen et al. 2005). Kira-kira 30% miRNA berada di dalam kawasan intergenik dan kira-kira 70% miRNA berada di antara intron atau exon gen-gen mengekod protein (Edelstein & Bray 2011).

Piwi-associated RNAs (piRNA) juga merupakan ncRNA dalam RNAi. piRNA mula dijumpai dalam lalat *Drosophila* (Grosshans & Filipowicz 2008). Kehadiran 25-27 nukleotida RNA yang homolog dengan lokus *stellate* berulang adalah berkorelasi dengan fungsi penyenyapan dan memerlukan protein Piwi clade Aubergine (Aravin et al. 2007). piRNA dihasilkan daripada prekursor rantaian tunggal yang panjang dan bebas daripada protein Dorsha dan Dicer. RNA kecil ini bersekutu dengan subfamili protein Argonaute, juga dikenali sebagai protein Piwi (Grosshans & Filipowicz 2008). Sepuluh daripada ribuan piRNA telah dikenalpasti (Aravin et al. 2007). Walau bagaimanapun, piRNA tersebut masih dalam peringkat kajian. piRNA bersama dengan protein Piwi diperlukan untuk pertumbuhan sel-sel gamet (Carmell et al. 2007; Grosshans & Filipowicz 2008). *Drosophila piwi* diperlukan dalam regulasi proliferasi dan penyelenggaraan sel-sel dalam sel-sel gamet dan sel-sel somatik (Aravin et al. 2007). Dalam tikus, semua piRNA adalah diperlukan untuk spermatogenesis (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Kajian genetik juga menunjukkan peranan laluan Piwi dalam penyenyapan elemen genetik *selfish* (Aravin et al. 2007).

Selain itu, siRNA juga merupakan ncRNA utama dalam laluan gangguan RNA (Grosshans & Filipowicz 2008). Laluan siRNA bermula dengan enzim mirip RNase III yang dikenali sebagai *Dicer* enzim (Bernstein et al. 2003). *Dicer* enzim mengandungi dua domain, iaitu terminal-C rantai berganda domain pengikatan RNA dan terminal-N helikase RNA (Bernstein et al. 2001). *Dicer* enzim telah dijumpai dalam pelbagai organisma termasuk *C. elegans* (Knight & Bass 2001), *Drosophila* (Bernstein et al. 2001), yis (Provost et al. 2002; Volpe et al. 2002), tumbuh-tumbuhan (Golden et al. 2002; Park et al. 2002), tikus (Bernstein et al. 2003) dan manusia (Provost et al. 2002; Zhang et al. 2002). *Dicer* memotong rantai berganda panjang molekul RNA kepada 21-23 nukleotida siRNA (Zamore et al. 2000). siRNA dupleks akan dipisahkan dan rantai tunggal RNA akan bergabung dengan RISC (Martinez et al. 2002). Selepas itu, siRNAs akan berpasangan dengan urutan yang berkomplimentari dan mencetuskan penguraian mRNA oleh Argonaute (Zamore et al. 2000). Argonaute merupakan komponen pemangkin kompleks RISC. Penguraian mRNA berlaku pada tapak tengah dupleks siRNA-mRNA (Elbashir et al. 2001; Martinez et al. 2002). Penguraian mRNA menyebabkan mRNA tidak boleh berfungsi sebagai tapak translasi dan mengarah kepada penenyapan gen.



Rajah 2.2 Laluan siRNA, miRNA dan piRNA

Sumber: Ubah suai daripada Grosshans & Filipowicz 2008

RNAi memainkan peranan penting dalam tindak balas pengimunan. siRNA merupakan benda genetik asing di mana ia menghalang propagasi diri transposon dalam tumbuh-tumbuhan (Stram & Kuzntzova 2006). Salah satu laporan awal menunjukkan bahawa siRNA adalah berkaitan dengan virus polio dan mempunyai potensi untuk merencat replikasi virus haiwan (Gitlin et al. 2002). Dalam laporan tersebut, dua siRNA telah digunakan untuk merencat replikasi virus. Satu siRNA disasarkan kepada gen *viral protein 3 (VP3)* manakala siRNA kedua merencat protein bukan struktur, iaitu gen *polimerase (3D)* (Gitlin et al. 2002). Keputusan menunjukkan bahawa terdapat pengurangan titer virus, RNA dan protein virus yang signifikan dalam sel-sel yang dirawat dengan siRNA. Maka, siRNA boleh menyebabkan rintangan kepada antivirus intrasel dalam sel-sel manusia (Gitlin et al. 2002). Selain itu, RNAi juga memainkan peranan dalam pengimunan semulajadi antivirus dan adalah aktif terhadap patogen-patogen seperti virus *Drosophila X* dalam *Drosophila* juvana dan dewasa (Zambon et al. 2006). Dalam *C. elegans*, regulasi protein Argonaute meningkat apabila bertindak balas dengan virus. *C. elegans* yang menunjukkan pengepresan berlebihan dalam komponen-komponen laluan RNAi adalah rintangan terhadap infeksi virus (Wilkins et al. 2005).

Tumbuh-tumbuhan seperti *arabidopsis thaliana* juga mengekspres pelbagai jenis homolog *dicer* yang khusus untuk bertindak secara berbeza apabila tumbuhan tersebut didedahkan kepada jenis virus yang berlainan (Blevins et al. 2006). Dalam *arabidopsis*, lebih daripada 100 miRNA telah dilaporkan dan dikenalpasti penting dalam toleransi tekanan abiotik dan perkembangan tumbuh-tumbuhan (Jones-Rhoades & Bartel 2004; Jones-Rhoades et al. 2006; Mallory & Vaucheret 2006). miRNA juga berperanan dalam pertahanan basal terhadap bakteria melalui pengawalaturan isyarat auksin (Navarro et al. 2006). Sesetengah genom tumbuh-tumbuhan juga mengekspres endogenous siRNA apabila dijangkiti oleh bakteria tertentu (Katiyar-Agarwal et al. 2006).

Fungsi RNAi yang lain termasuk menurunkan regulasi gen. Mekanisme RNAi boleh dieksploitasikan untuk merebah gen penyakit penting, molekul isyarat

downstream yang memodulasikan penyakit tertentu dan gen-gen dominan yang menyebabkan penyakit genetik (Pushparaj & Melendez 2006). Peranan miRNA dalam menurunkan pengekspresan gen telah dilaporkan dalam *C. elegans* pada tahun 1993 (Lee et al. 1993). Dalam tumbuh-tumbuhan, fungsi RNAi telah ditemui apabila *JAW microRNA Arabidopsis* telah dikenalpasti terlibat dalam regulasi sesetengah gen-gen yang mengawalatur bentuk tumbuh-tumbuhan (Palatnik et al. 2003). Majoriti gen-gen yang diregulasikan oleh miRNA dalam tumbuh-tumbuhan terdiri daripada faktor transkripsi (Zhang et al. 2006). Dalam kebanyakan organisma, termasuk manusia, miRNA berperanan penting dalam pembentukan tumor dan gangguan kitaran sel (Zhang et al. 2007). Maka, miRNA juga boleh bertindak sebagai onkogen dan penindas tumor (Zhang et al. 2007).

RNAi menyebabkan penyenyapan gen melalui pemodelan kromatin dan seterusnya merencat transkripsi, mengurai mRNA-komplimentari, atau merencat translasi protein (Ahluquist 2002; Klase et al. 2007). Penemuan terbaharu mencadangkan bahawa RNA berganda dua kecil (dsRNA) seperti siRNA dan miRNA juga bertindak sebagai RNA pengaktifan kecil (saRNA) (Li et al. 2006; Janowski et al. 2007). Dengan menyasarkan jujukan dalam *promoter* gen, saRNA bersedia untuk mencetuskan pengekspresan gen sasaran pada peringkat transkripsi. Fenomena tersebut merujuk kepada pengaktifan *dsRNA-induced transcriptional* (RNAa) (Li et al. 2006).

Teknologi RNAi telah menjadi alat yang berpotensi untuk menyenyapkan gen yang dikehendaki. RNA berganda dua disintesisikan daripada jujukan yang berkomplimentari dengan gen sasaran dan seterusnya dimasukkan ke dalam sel atau organisma. RNA berganda dua tersebut akan dikesan sebagai bahan genetik eksogen dan seterusnya mengaktifkan laluan RNAi (Subramaniam et al. 2007; Kaulfuss et al. 2009; Jiang et al. 2010). Pengekspresan gen sasaran dapat dikurangkan dengan menggunakan mekanisme RNAi. Kesan pengurangan pengekspresan gen menunjukkan peranan fisiologi produk gen tersebut. siRNA CD44 dalam sel-sel kanser kolorektal, HT-29, menyebabkan lebih daripada 75 % perencatan dalam pengekspresan CD44 (Subramaniam et al. 2007). siRNA CD44 juga mengurangkan

viabiliti dan pelekatan sel serta meningkatkan kejadian apoptosis sel (Subramaniam et al. 2007).

Selain itu, siRNA *IGF-IR* dan *EGFR* pula merencat proliferasi sel dan peningkatan kadar apoptosis sel kanser kolorektal, iaitu DLD-1 dan Caco-2 (Kaulfuss et al. 2009). RNAi juga digunakan untuk menurunkan regulasi *UbcH10* dalam sel glioma, iaitu U251 (Jiang et al. 2010). Kadar pertumbuhan sel U251 menurun dengan signifikan selepas penurunan pengekspresan *UbcH10* oleh siRNA. Selain itu, RNAi *UbcH10* juga merangsang kejadian apoptosis melalui induksi *Bax* dan *p53*, penurunan regulasi *Bcl-2* dan penahanan fasa G2/M kitaran sel (Jiang et al. 2010). Secara ringkasnya, RNAi boleh menyekat pertumbuhan dan perkembangan sel-sel tumor.

Maka, pembangunan teknologi RNAi telah muncul sebagai rawatan baru yang berpotensi tinggi dalam rawatan pelbagai penyakit atau kanser. Banyak kajian klinikal yang berasaskan siRNA telah dijalankan. Sebagai contoh, ubat I5NP yang menyenyapkan gen *p53* digunakan untuk merawat kegagalan fungsi buah pinggang (Yang et al. 2015), ubat siG12D LODER yang menyenyapkan gen *KRAS* untuk merawat kanser pankreas (Lee et al. 2013), dan ubat TKM-080301 yang menyenyapkan gen *PLK1* untuk merawat pelbagai jenis kanser (Kanasty et al. 2013; Lee et al. 2013).

2.3 TITISAN SEL

Titisan sel merupakan sumber berharga yang boleh diguna secara berterusan dan berulang sepanjang masa, tidak seperti tisu manusia primer yang hanya boleh diguna sekali sahaja. Titisan sel boleh dicari berdasarkan kandungan mutasi (Liu & Bodmer 2006) dan ekspresi mRNA. Titisan sel tidak mengandungi tisu stroma, di mana ia boleh menjejaskan penilaian data tisu manusia primer (Volchenboum et al. 2009). Kajian terdahulu menunjukkan titisan sel berjaya mewakili tumor asalnya (Douglas et al. 2004) dan mempunyai struktur yang serupa apabila berbanding tisu asal (Willson et al. 1987). Peratus mutasi gen juga adalah sama bagi kedua-dua titisan sel dan tisu kanser kolorektal primer (Yeung et al. 2010). Tambahan pula, titisan sel

salinan daripada makmal berlainan mempunyai mutasi yang sama dan profil ekspresi mikroatur yang sama (Yeung et al. 2010).

2.3.1 HT-29

Titisan sel HT-29 asal diasingkan oleh Fogh dan Trempe (Fogh 1975). Titisan sel tersebut diperoleh dari wanita Caucasian yang berumur 44 tahun dengan kolon adenokarsinoma gred kedua, iaitu sel yang membahagi secara sederhana pada tahun 1964 (von Kleist et al. 1975). Titisan sel HT-29 mengandungi sifat tumorigenik yang sama apabila ditumbuhkan dalam subkutis, sekum, limpa dan hati tikus, tetapi ia akan metastasis ke hati dan limpa sahaja selepas implantasi sekum (Sekikawa et al. 1988; Bertrand et al. 1999).

Titisan sel ini menunjukkan pengekspresan positif bagi onkogen c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis dan fos (Trainer et al. 1988). Titisan sel HT-29 mengandungi mutasi G-> A pada 273 kodon yang menyebabkan penggantian Arg-> His (Ahmed et al. 2013). Fungsi gen *TP53* adalah mengekalkan integriti genom dan menyebabkan kejadian apoptosis (Toledo & Wahl 2006). Titisan sel HT-29 diguna sebagai model tumor xenograf bagi kanser kolorektal dan juga dalam model *in-vitro* dalam kajian penyerapan, pengangkutan, dan perembesan sel kolon (Huet et al. 1987).

2.3.2 HCT116

Titisan sel HCT116 diperoleh dari lelaki dengan kolon karsinoma gred ketiga, iaitu sel yang kurang membahagi (Brattain et al. 1981). Titisan sel HCT16 mempunyai mutasi gen *hMLH1* yang menyebabkan kecacatan dalam pembaikan tidak sepadan (MMR) dan ketidakstabilan mikrosatelit (Tronov et al. 2007). Titisan sel tersebut mengandungi gen *TP53* jenis liar (Toledo & Wahl 2006). Sel HCT116 mengandungi mutasi G->A pada 13 kodon (Brink et al. 2003). Kajian terdahulu telah melaporkan bahawa mutasi gen *k-ras* dijumpai dalam 30-60% kanser kolorektal (Breivik et al. 1994; Kressner et al. 1998).

Titisan sel HCT116 banyak digunakan dalam kajian kanser. Titisan sel tersebut bersifat invasif dan kemobilitan yang tinggi dalam kajian *in-vitro* (Howell et al. 1998; Sawhney et al. 2002; Awwad et al. 2003).

2.4 5-FLUOROURASIL (5-FU)

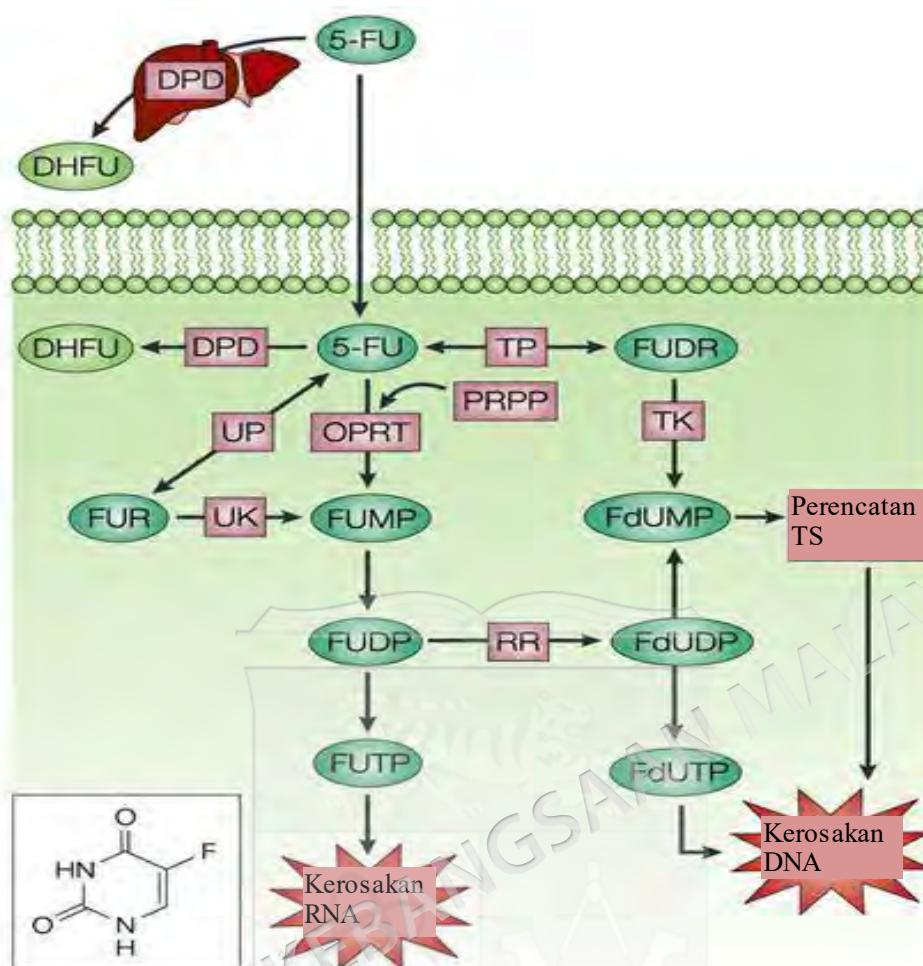
5-Fluorourasil (5-FU) ialah sejenis ubat yang merupakan analog pirimidina di mana digunakan secara meluas dalam rawatan kanser kolorektal sejak tahun 1957 (Noordhuis et al. 2004). Ubat ini mempunyai tapak jalan metabolisme yang serupa dengan urasil (Diasio & Harris 1989). Sebagai analog pirimidina bagi urasil pirimidina semula jadi, 5-FU menjalankan proses tranformasi dan menukar kepada metabolit sitotoksik yang berlainan di dalam sel. Metabolit tersebut kemudian bergabung dengan DNA dan RNA untuk mengaruh perencatan kitaran sel dan apoptosis (Longley et al. 2003). 5-FU menyekat proses sintesis DNA melalui perencatan tidak berbalik *thymidylate synthase* (TS) (Longley et al. 2003).

5-FU ialah ubat spesifik fasa-S dan hanya aktif pada kitaran sel yang tertentu. Gabungan 5-FU dengan RNA telah dikaitkan dengan tindakan sitotoksik 5-FU (Ghoshal & Jacob 1997). Selain itu, 5-FU juga menyebabkan kesitoksikan apabila bergabung dengan DNA sel-sel sumsung tulang dan tumor manusia (Noordhuis et al. 2004). 5-FU bergabung dengan DNA menyebabkan penghasilan rantai DNA yang putus (Yin & Rustum 1991). Apabila 5-FU bertindak dengan DNA, 5-FU dikeluarkan oleh *uracil-DNA-glycosylase* dan diikuti dengan pembersihan endonukleolitik *apurinic-aprimidinic*, di mana menyebabkan permutusan rantai DNA (Mauro et al. 1993).

Selain pergabungan DNA dan RNA, 5-FU juga merencat aktiviti kompleks eksosom, iaitu kompleks eksoribonuklease, yang memainkan peranan penting dalam kehidupan sel (Noordhuis et al. 2004). Ia digolongkan dalam keluarga ubat yang dinamakan anti-metabolit. Kemoterapi yang berasaskan 5-FU meningkatkan kemandirian bagi kebanyakan pesakit bebas penyakit yang *resected* pada peringkat ketiga kanser kolorektal (Longley et al. 2003).

5-FU menukar ke beberapa metabolit aktif seperti fluorodeoksiuridina monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridina trifosfat (FdUTP) dan fluorouridina monofosfat (FdUMP) secara intrasel seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.3 bawah. Metabolit aktif 5-FU mengganggu sintesis RNA (FUTP), merencat tindakan *thymidylate synthase* (TS) iaitu enzim sintetik nukleotida (FdUMP) dan juga bergabung secara langsung dengan DNA (FdUTP). Enzim kadar penghadkan dalam katabolisma 5-FU ialah dihidropirimidina dehidrogenase (DPD) yang menukarkan 5-FU kepada dihidrofluorourasil (DHFU) (Diasio & Harris 1989; Longley et al. 2003)





Rajah 2.3 Mekanisme pengaktifan 5-FU. 5-FU menukar secara intrasel kepada tiga metabolit aktif seperti fluorodeoksiuridina monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridina trifosfat (FdUTP), dan fluorouridina trifosfat (FUTP). Mekanisme utama bagi pengaktifan 5-FU ialah penukaran kepada fluorouridina monofosfat (FUMP), sama ada secara langsung oleh orotat fosforibosiltransferase (OPRT) dengan fosforibosil pirofosfat (PRPP) sebagai kofaktor, atau secara tidak langsung dengan melalui fluorouridina (FUR) daripada tindakan uridina fosforilase (UP) dan uridina kinase (UK). FUMP kemudian difosfatkan kepada fluorouridina difosfat (FUDP), sama ada boleh difosfatkan selanjutnya kepada metabolit aktif fluorouridina trifosfat (FUTP), atau menukar kepada fluorodeoksiuridina difosfat (FdUDP) oleh ribonukleotida reduktase (RR). Seterusnya, FdUDP boleh difosforilasikan atau dinyahfosforilasikan untuk menghasilkan metabolit aktif FdUTP dan FdUMP masing-masing. Tapak jalan alternatif melibatkan penukaran 5-FU yang dikatalisirkan oleh timidina fosforilase kepada fluorodeoksiuridina (FUDR), di mana akan difosfatkan kemudian oleh timidina kinase (TK) kepada FdUMP. Penukaran 5-FU oleh dihidropirimidina dehidrogenase (DPD)-perantaraan kepada dihidrofluorourasil (DHFU) ialah langkah kadar penghadkan bagi katabolisma 5-FU dalam sel-sel normal dan tumor.

Sumber: (Diasio & Harris 1989; Longley et al. 2003)

BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 TITISAN SEL

Titisan sel kanser kolon karsinoma manusia, HCT116, dan sel kanser kolon adenokarsinoma manusia, HT-29, telah diperoleh daripada ATCC, iaitu American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Sel-sel tersebut dikultur dan dikekalkan dalam media McCoy's 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA) dengan tambahan 10 % serum fetus lembu (FBS) yang telah dinyahaktifkan (Invitrogen). Sel-sel tersebut dikekalkan dalam 37 °C, 5% CO₂.

Untuk kerja subkultur sel, media kultur dalam kelalang sel dialihkan dan dibuang. Lapisan sel-sel dibilas secara ringkas dengan menggunakan larutan 1X PBS (Salina timbal fosfat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) untuk membuang semua baki serum yang mengandungi perencat tripsin. 2 ml larutan 1X tripsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) ditambahkan ke dalam kelalang sel dan dieram selama lima minit dalam 37 °C, 5% CO₂ sehingga lapisan sel tertanggal. Kira-kira 6.0 hingga 8.0 ml media pertumbuhan lengkap ditambahkan dan sel-sel diaspirat dengan pempipetan yang lembut. Alikuot ampaian sel yang sesuai ditambahkan ke kelalang kultur sel yang baru. Kemudian, sel-sel tersebut dieram pada 37 °C, 5% CO₂. Biasanya, kadar subkultur sel sebanyak 1:3 sehingga 1:8 adalah digalakkan. Media sel diperbaharui setiap dua atau tiga hari.

Untuk pengkrioawetan, kultur sel dalam kelalang dialihkan dan dibuang. Lapisan sel-sel dibilas secara ringkas dengan menggunakan larutan 1X PBS (Sigma-Aldrich) untuk membuang semua jejak serum yang mengandungi perencat tripsin. 2ml larutan 1X tripsin-EDTA (Gibco) ditambahkan ke dalam kelalang sel dan dieram

selama lima minit dalam 37 °C, 5% CO₂ sehingga lapisan sel tertanggal. 1.0 ml media pertumbuhan lengkap ditambahkan untuk menyahaktifkan tripsin. Larutan kultur kemudian dipindah ke 15 ml tiub falcon dan diemparkan pada kelajuan 150 rpm selama 5 minit. Pelet sel diambil semula dengan menggunakan media pertumbuhan lengkap dengan tambahan 5% (v/v) dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich). Selepas itu, ampaian sel dialikuotkan ke dalam kriotuib dan disimpan dalam fasa wap nitrogen cecair.

3.2 TRANSFEKSI siRNA

Dharmacon® format transfeksi berbalik (RTF) siRNA *Libraries* telah direka untuk menyaring siRNA dalam titisan sel manusia dengan menggunakan format transfeksi berbalik (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Kumpulan pre-reka *Dharmacon's siGENOME SMARTpool* bagi empat oligo, iaitu *siGENOME SMARTpool*, digunakan untuk penyenyapan gen pemprosesan tinggi bagi 20 gen yang beregulasi secara menaik dalam kanser kolorektum. 20 gen tersebut termasuk gen-gen *CDK4* (NM_000075), *TOP2A* (NM_001067), *NME1* (NM_198175), *RAN* (NM_006325), *PCNA* (NM_002592), *CSE1L/CAS* (NM_001316), *ENO1* (NM_001428), *GTF3A* (NM_002097), *POLR1D* (NM_152705), *TMEM97* (NM_014573), *ZAK* (NM_133646), *CDC25B* (NM_021873), *TPX2* (NM_012112), *MYBL2* (NM_002466), *CKS2* (NM_001827), *MCM7* (NM_005916), *S100A11* (NM_005620), *RRM1* (NM_001033), *ODC1* (NM_002539), *DKC1* (NM_001363). siRNA gen *GAPDH* merupakan siRNA yang mensasarkan gen penyelenggara *GAPDH* dan digunakan sebagai kawalan positif. siRNA bebas-RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) merupakan dupleks bukan sasaran yang membawa modifikasi kimia untuk menghalang interaksi dengan RISC pula dijadikan sebagai kawalan negatif. *Mock* pula merupakan kawalan yang menunjukkan sel-sel yang dirawat oleh lipid sahaja.

Semua protokol transfeksi dijalankan dalam kabinet keselamatan biologikal. Pada mulanya, plat *Dharmacon RTF siRNA library* dan reagen kultur sel DharmaFECT untuk siRNA (DCCR) (Dharmacon) diizinkan untuk *equilibrate* ke suhu bilik. Larutan rehidrasi disediakan dengan mencampurkan reagen transfeksi DharmaFECT 4 (Dharmacon) dan DCCR mengikut formulasi. Untuk setiap set plat

peniga, 8.0 ml larutan rehidrasi disediakan dalam 15 ml tiub. Kepekatan stok bagi reagen transfeksi DharmaFECT 4 ialah 1.0 mg/ml. Untuk menyediakan isipadu akhir sebanyak 2.0 μ l/telaga reagen transfeksi DharmaFECT 4, sebanyak 15 μ l stok reagen transfeksi DharmaFECT 4 dicampurkan dengan 1860 μ l of DCCR. 25 μ l larutan rehidrasi kemudian diagihkan ke semua telaga yang mengandungi siRNA pra-salut di dalamnya. Reagen transfeksi DharmaFECT 4 dibenarkan untuk mengkomplekskan dengan siRNA dengan mengeramkan plat *Dharmacon RTF siRNA library* yang direhidrasi pada suhu bilik selama 30 minit. Kemudian, 35.0 ml ampaian sel disediakan dalam media pertumbuhan lengkap tanpa antibiotik. Media pertumbuhan lengkap ialah media yang biasanya digunakan dalam kultur sel, iaitu media McCoy's 5A dengan tambahan 10 % FBS yang telah dinyahaktifkan. 100 μ l ampaian sel (5×10^4 sel-sel per ml) ditambahkan ke dalam setiap telaga dalam plat 96 telaga. Isipadu akhir dalam setiap telaga adalah sebanyak 125 μ l dan kepekatan reagen siRNA dalam setiap telaga ialah 50 nM. Plat *Dharmacon RTF siRNA library* dieram pada 37 °C, 5 % CO₂ selama 48 jam. Asai saringan dijalankan mengikut laluan biologi yang diminati.

Jadual 3.1 Jujukan-jujukan sasaran siRNA

Bil	siRNA	Jujukan-jujukan Sasaran
1	<i>CDK4</i>	CAAGGUAACCCUGGUGUUU GAGCUCUGCAGCACUCUUA CAGCACAGUUCGUGAGGUG GCACUUACACCCGUGGUUG
2	<i>TOP2A</i>	CGAAAGGAAUGGUUAAACUA GAUGAACUCUGCAGGCUAA GGAGAAGAUUAUACAUGUA GGUAACUCCUUGAAAGUAA
3	<i>NME1</i>	GAGAUCGGCUUGUGGUUUC CCGCCUUGUUGGUCUGAAA GAGCGUACCUUCAUUGCGA GAGAGAUUAUCAAGCGUUU
4	<i>RAN</i>	GGAAAGUGAAGGCGAAAUC CUAGGAAGCUCAUUGGAGA GAGAAGAAGUAUGUAGCCA GAAAAGCCCUUCCUCUGGC
5	<i>PCNA</i>	GCACGUUAUAUGCCGAGAUC AACGAGGCCUGCUGGGAUA GCGGAUAUGGGACACUUA CACUAAGGGCCGAAGAUAA
6	<i>CSE1L</i>	CGUCAUGAAUUUAAGUCAA CGAGUUAUGGACUGAAAUU AUAGUGCACUUGAUGCUUA CAGAAAUGGUGAAUCGCUU

Bersambung...

Sambungan...

7	<i>ENO1</i>	UGACUUGGCUGGCAACUCU CAUGGUGUCUCAUCGUUCG CCGAGUCUCUUCAGGCGUG CGAGAAGUCCUGCAACUGC
8	<i>GTF3A</i>	GCUAAGAACUGCACUGCUU ACGCAAAGAUUACCUUAAG CCACGAGGGCUAUGUAUGU UACAUGAUCCUGACAAGAA
9	<i>POLR1D</i>	GCAUAAAGGACUAUAAGGA UAGGAAAUUCUCUACGUUA UGACAUUUGUAUUGCACGA CCUCAAUGGCUGAAGGCGA
10	<i>TMEM97</i>	CGGUGUGGGCUAGGUUAUA UGCCUGAGUUCCACCGCAA AGACUUUGCAUGAACGGUU ACAGAUCAUCCUAGGCGAA
11	<i>ZAK</i>	CGAGAAAGACGUUUAAGA GGAUAUCACAGGACAAGGA GAGUGGAGGUGCGAAAUUG CAAGAAACGUUGUUAUAGC
12	<i>CDC25B</i>	GAGAUUACUCUAAGGCCUU GCAGAUACCCCUAUGAAUA UGGAUAAGUUUGUGAUUGU AGAGUGACUUAAGGAUGA
13	<i>TPX2</i>	GGACGAACCGGUAGUGAUA GCAUAAGGCAAAUCCAAUA GUACCAUUGUUAAGCCUUU

Bersambung...

Sambungan...

GAAAUUCUACCCUCUAAGA

14 *MYBL2*

AAACGAGCCUGCCUUACAA
 GAGCACACCUGUUAAGACC
 GUAACAGCCUCACGCCCAA
 GAACAGGAGCCCAUCGGUA

15 *CKS2*

UCGACGAACACUACGAGUA
 CCAGAGAACUUUCCAAACA
 CCACAUAUUCUUCUCUUUA
 ACAAGCAGAUUCUACUACUC

16 *M CM7*

GGAAAUAUCCCUCGUAGUA
 GCUCAUGAGGCGUUACAUA
 CAGCAUACGUGGAGAUGAG
 GUGGAGAACUGACCUUAGA

17 *S100A11*

CAACAGUGAUGGUCAGCUA
 AAAGGAUGGUUAUAACUAC
 UGAUUGCUGUCUCCAGAA
 CCACCUGCCAAUAGUAAUA

18 *RRM1*

UAUGAGGGCUCUCCAGUUA
 UGAGAGAGGUGCUUUCAUU
 UGGAAGACCUCUAUAACUA
 CUACUAAGCACCCUGACUA

19 *ODC1*

CGAAAGAGCUAAAUAUCGA
 GAGCAGACCUUUAUGUAUU
 ACAAUACUUUCCGUCAGA
 CGGCUAGUAUUAUGUGUA

Bersambung...

Sambungan...

20	<i>DKCI</i>	CAAGGUGACUGGUUGUUUA GCAGGUAGUUGCCGAAGCA UCUCAUAAACGGCUGGUUA GGACAGGUUUCAUUAUAUCU
21	<i>GAPDH</i>	CAACGGAUUUGGUCGUAUU GACCUCAACUACAUGGUUU UGGUUUACAUGUCCAAUA GUCAACGGAUUUGGUCGUA



3.3 TRANSFEKSI siRNA INDIVIDU

Sel-sel ditripsinkan dan jumlah sel dikira. Sel-sel dicairkan dalam media bebas antibiotik sehingga kepekatan kira-kira 5×10^4 sel/ml untuk transfeksi dengan DharmaFECT 4. Sebanyak 100 μ l sel diplatkan ke dalam setiap telaga dalam plat 96 telaga. Sel-sel tersebut dieram semalaman dalam 37 °C, 5 % CO₂.

Pada hari transfeksi, larutan 2 μ M siRNA disediakan dalam 1X siRNA penimbang. Dalam tiub yang berlainan, jumlah 2 μ M siRNA yang sesuai (tiub 1) dan DharmaFECT 4 (tiub 2) dicairkan dengan menggunakan media tanpa serum. Untuk tiub 1, 17.5 μ l 2 μ M siRNA ditambahkan ke dalam 17.5 μ l media bebas serum. Jumlah isipadu ialah 35 μ l. Untuk tiub 2, 1.4 μ l DharmaFECT 4 ditambahkan ke dalam 33.6 μ l media tanpa serum. Jumlah isipadu ialah sebanyak 35 μ l. Kandungan setiap tiub dicampur dengan sekata dengan pempipetan atas dan bawah dan dieram selama 5 minit pada suhu bilik. Selepas itu, kandungan kedua-dua tiub tersebut dicampur. Jumlah isipadu ialah sebanyak 70 μ l. Kandungan tersebut dicampur dengan sekata dengan pempipetan atas dan bawah dan dieram selama 20 minit pada suhu bilik. Kemudian, 280 μ l media lengkap tanpa antibiotik ditambahkan sehingga jumlah isipadu akhir menjadi 350 μ l. Media kultur lengkap dalam plat 96 telaga dibuang dan digantikan dengan 100 μ l media transfeksi dalam setiap telaga. Selepas 48 jam, aras rebah sasaran gen ditentukan dengan menggunakan asai yang sesuai seperti asai viabiliti sel (Promega, Madison, WI, USA), asai apoptosis sel (Millipore, MA, USA), asai migrasi sel (Millipore), asai invasi sel (Millipore), analisis kitaran sel (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) dan tindak balas rantaian polimerase masa nyata (qPCR) (Thermo Scientific, Waltham) mengikut arahan pengilang.

3.4 ASAI VIABILITI SEL

Viabiliti sel ditentukan dengan menggunakan asai viabiliti sel *CellTiter-Glo luminescent* (Promega, Madison, WI, USA), yang menentukan jumlah aras adenosina trifosfat (ATP) sebagai indeks nombor sel. Ia merupakan kaedah homogen untuk menentukan nombor sel yang hidup dalam kultur yang berasaskan kuantiti ATP yang

hadir. ATP yang hadir dalam kultur merujuk kepada kehadiran sel-sel yang aktif secara metabolik. Reagen disediakan sebelum asai. Penimbal *CellTiter-Glo*® dan substrat *CellTiter-Glo*® yang *lyophilized* dicairkan dan ‘*equilibrate*’ ke suhu bilik sebelum guna. Selepas itu, penimbal *CellTiter-Glo*® ditambah ke dalam botol yang mengandungi substrat *CellTiter-Glo*® untuk menjadikan campuran enzim/substrat. Campuran tersebut dikenali sebagai reagen *CellTiter-Glo*®. Campuran tersebut dicampur dengan penvorteksan yang lembut, berpusar atau membalikkan kandungan botol untuk mendapat larutan yang homogen.

Untuk memulakan asai viabiliti sel, plat *opaque-walled multiwell* yang mengandungi sel-sel mamalia dalam media kultur disediakan, iaitu sebanyak 100 µl dalam setiap telaga bagi plat 96 telaga. Telaga kawalan terdiri daripada telaga yang mengandungi media tanpa kehadiran sel-sel untuk mendapat nilai latar belakang pendarcahaya. Plat dan kandungannya dibiarkan seimbang pada suhu bilik selama 30 minit. Kemudian, 100 µl reagen ditambahkan ke dalam 100 µl sel-sel dalam setiap telaga. Kandungan tersebut dicampurkan selama dua minit pada penggoncang *orbital* untuk menggalakkan lisis sel. Selepas itu, plat tersebut dieramkan pada suhu bilik selama 10 minit untuk menstabilkan isyarat pendarcahaya. Isyarat pendarcahaya ditentukan pada saiz gelombang 570 nm dengan menggunakan pembaca mikroplat pendarcahaya SpectraMax L (Molecular Devices, Sunnyvale, California, US).

3.5 PENGEKSTRAKAN RNA

Jumlah RNA dalam titisan sel diekstrakkan dengan menggunakan *RNeasy plus mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Pada mulanya, 10 µl β-merkaptotanol (β-ME) ditambahkan ke setiap 1.0 ml RLT plus penimbal. Langkah ini dijalankan dalam tukang wasap dan pakaian pelindung yang sesuai dipakai. RPE penimbal pula dibekalkan dalam bentuk larutan yang pekat. Empat kali isipadu etanol (96-100 %) ditambahkan seperti yang diarahkan pada label botol untuk mendapat larutan kerja.

Bagi sel-sel monolapisan yang tidak melebihi jumlah 1×10^7 sel-sel, sel tersebut dilisiskan secara langsung dalam vesel kultur sel. Nombor sel dalam vesel ditentukan. Media kultur dalam vesel dibuang dan sel-sel dilisiskan dengan

menggunakan 350 μ l RLT plus penimbal. Lisat sel dialihkan ke dalam *QIAshredder spin column* dalam 2 ml tiub penggumpul dan diempar selama dua minit pada kelajuan penuh. Lisat sel dikumpul dan dialihkan ke *gDNA eliminator column* dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama 30 saat. Kemudian, satu isipadu 70 % etanol ditambahkan ke dalam lisat yang homogen dan dicampur dengan sekata dengan menggunakan pipet. 700 μ l sampel, termasuk sebarang mendakan yang terhasil, dipindah ke *RNeasy spin column* dalam 2 ml tiub penggumpul yang dibekalkan dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama 15 saat. Aliran terus dibuang. Sebanyak 700 μ l RW1 penimbal ditambah ke dalam *RNeasy spin column*. *RNeasy spin column* ditutup dengan lembut dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama 15 saat untuk membersihkan membran *spin column*. Aliran terus dibuang. Selepas itu, 500 μ l RPE penimbal ditambah ke dalam *RNeasy spin column*. Penutup *spin column* ditutup dengan lembut dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama 15 saat. Aliran terus dibuang. Selepas itu, 500 μ l RPE penimbal ditambah sekali lagi ke dalam *RNeasy spin column*. Penutup *spin column* ditutup dengan lembut dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama dua minit untuk membersihkan membran *spin column*. *RNeasy spin column* kemudian diletakkan pada 2 ml tiub penggumpul baru yang dibekalkan di mana tiub penggumpul lama bersama dengan aliran terus dibuang. Penutup *spin column* ditutup dengan lembut dan diempar pada kelajuan penuh selama satu minit. *RNeasy spin column* kemudian diletakkan pada 1.5 ml tiub penggumpul baru yang dibekalkan. 30 μ l air bebas RNase ditambahkan terus ke dalam membran *spin column*. Penutup *spin column* ditutup dengan lembut dan diempar pada kelajuan 10,000 x g selama satu minit untuk mengelusi RNA. Sampel RNA yang diekstrak disimpan dalam -80 °C untuk simpanan lama.

3.5.1 Penentuan Kepekatan RNA

Kuantiti RNA ditentukan pada penyerapan $A_{260\text{nm}}$ dengan menggunakan *NanoDrop ND-1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific). Sebanyak 1.5 μ l sampel dipipetkan ke ruang bacaan pada Nanodrop ND-100 untuk mendapatkan kepekatan RNA. Ketulenan RNA diukur berasaskan kepada nisbah penyerapan $A_{260\text{nm}}$ dan $A_{280\text{nm}}$. Nisbah $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ merujuk kepada kuantiti RNA yang diperolehi. RNA yang tulen mempunyai nilai nisbah $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ yang berjulat antara 1.8 hingga 2.2.

3.5.2 Penentuan Integriti RNA

Kualiti dan integriti RNA ditentukan dengan menggunakan *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, USA) dan kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies). Kit RNA 6000 Nano boleh mengesan kuantiti RNA dari 5 ng hingga 5 µg. Nombor Integriti RNA (RIN) yang bernilai lebih daripada 7.0 menunjukkan bahawa sampel RNA yang diperolehi adalah berkualiti baik dan boleh digunakan untuk analisis seterusnya.

Gel RNA disediakan dengan menambah 550 µl larutan gel matriks RNA 6000 Nano ke dalam pemutar turas yang dibekalkan dan diempar pada kelajuan 4,000 rpm selama 10 minit. Kemudian, 65 µl gel matriks tersebut dipipetkan ke dalam 1.5 ml tiub bebas RNase (Axygen, California, USA) dan dicampurkan dengan 1 µl perwarna RNA 6000 Nano. Campuran tersebut diempar pada kelajuan 13,000 rpm selama 10 minit. 9 µl campuran tersebut dipipetkan ke telaga cip RNA Nano yang ditetapkan. Gel tersebut ditolak ke dalam terusan mikro di dalam cip dengan menggunakan picagari dan stesen cip yang disediakan bersama dengan kit ini. Kemudian 5 µl larutan penimbal RNA 6000 Nano dipipet ke dalam satu telaga penanda dan 12 telaga sampel. Sampel-sampel RNA didenaturasi pada suhu 70 °C selama 2 minit sebelum analisis. Selepas didenaturasi, sampel RNA hendaklah disimpan dalam ais sehingga guna. Sebanyak 1 µl sampel RNA yang telah didenaturasi dipipetkan ke dalam telaga sampel masing-masing. 1 µl penanda RNA pula dipipetkan ke dalam telaga penanda RNA. Cip tersebut divorteks pada kelajuan 2,400 rpm selama satu minit. Setelah itu, cip tersebut dimasukkan ke dalam alat *2100 Bioanalyzer*. Program asai RNA Nano eukariot dipilih dalam senarai program yang ada dan bacaan analisis RNA diperolehi dalam masa 20 minit. Graf penanda yang memberi 7 puncak nyata dijadikan sebagai kawalan kualiti. Nilai integriti RNA (RIN) diperolehi untuk menentukan keutuhan sampel RNA.

3.6 SINTESIS cDNA

cDNA disintesis dari RNA dengan menggunakan *verso cDNA Kit* (Thermo Scientific). Heksamer rawak dan primer oligo-dT dicampurkan dalam kadar 3:1 dalam tindak balas cDNA. Campuran dNTP dicairkan sebanyak 10 kali ganda kepada kepekatan akhir 500 μM . Untuk menyediakan campuran tindak balas, 4 μl 5X penimbal sintesis cDNA, 2 μl campuran dNTP, 1 μl primer RNA, 1 μl penggalak RT, 1 μl campuran enzim *verso*, 6 μl air and 5 μl templat RNA dicampurkan. Isipadu akhir bagi jumlah tindak balas ialah 20 μl . Keadaan pengitaran bagi sintesis cDNA ialah 42 °C selama 30 minit. Kepekatan dan ketulenan cDNA ditentukan pada penyerapan $A_{260\text{nm}}$ dengan menggunakan *NanoDrop ND-1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.7 TINDAK BALAS RANTAIAN POLIMERASE MASA NYATA (qPCR)

Pengekspresan gen-gen *CDK4* (NM_000075), *TOP2A* (NM_001067), *NME1* (NM_198175), *RAN* (NM_006325), *PCNA* (NM_002592), *CSE1L/CAS* (NM_001316), *ENO1* (NM_001428), *GTF3A* (NM_002097), *POLR1D* (NM_152705), *TMEM97* (NM_014573), *ZAK* (NM_133646), *CDC25B* (NM_021873), *TPX2* (NM_012112), *MYBL2* (NM_002466), *CKS2* (NM_001827), *MCM7* (NM_005916), *S100A11* (NM_005620), *RRM1* (NM_001033), *ODC1* (NM_002539), *DKC1* (NM_001363) dalam kedua-dua sel yang ditransfeksi dengan siRNA dan kawalan sel ditentukan dengan menggunakan qPCR. *Thermo scientific solaris human qPCR gene expression assays* yang sepadan dengan gen-gen yang dikaji telah dibeli daripada Thermo Scientific, Waltham, seperti yang disenaraikan: *CDK4*, *TOP2A*, *NME1*, *RAN*, *PCNA*, *CSE1L/CAS*, *ENO1*, *GTF3A*, *POLR1D*, *TMEM97/MAC30*, *ZAK*, *CDC25B*, *TPX2*, *MYBL2*, *CKS2*, *MCM7*, *S100A11*, *RRM1*, *ODC1* dan *DKC1*. *Solaris human qPCR gene expression* bagi gen *GAPDH* digunakan sebagai kawalan positif untuk menentukan pengekspresan gen *GAPDH* (NM_002046) bagi penormalan input sampel dan analisis bagi pengekspresan relatif gen-gen yang spesifik. *Solaris human qPCR gene expression* bagi gen *ACTB* pula digunakan sebagai gen kawalan endogenus untuk penentuan pengekspresan gen. Kaedah

$\Delta\Delta C_t$ pula diaplikasikan untuk menentukan aras transkrip relatif dalam unit kuantifikasi relatif (Livak & Schmittgen 2001).

cDNA dicairkan sebanyak tiga kali ganda sehingga mendapat kepekatan akhir 50 ng/ul, dan 1 μ l daripada cairan cDNA dijadikan sebagai sampel input dalam tindak balas qPCR. *Thermo scientific solaris qPCR gene expression master mix* (Thermo Scientific) digunakan dalam langkah qPCR untuk jumlah 25 μ l isipadu akhir tindak balas. Semua tindak balas qPCR dijalankan mengikut protokol pembekal, iaitu satu kitaran pada 95 °C selama 15 minit untuk mengaktifkan enzim, kemudian pada 95 °C selama 15 saat diikuti dengan 60°C selama satu minit sebanyak 40 kitaran. Nilai C_t yang didapati daripada mesin *rotor-gene RG-6000 real-time thermal cycler* (Corbett Research, Sydney, Australia) digunakan untuk analisis selanjutnya untuk menentukan pengekspresan gen relatif. Semua asai adalah dibuat dalam triplikat.

Jadual 3.2 Jujukan primer dan proba bagi gen-gen yang dikaji

Bil	Simbol gen	Nama gen	Primer depan	Primer berbalik	Proba
1	<i>CDK4</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	TGCAACACC TGTGGACAT	AGATTTTGC CCAACTGG	TGGAAA CTCTGAA GCCGAC
2	<i>TOP2A</i>	<i>Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa</i>	GCCCAATTA GCTGGATCA GT	GTCATCATT AGTGACATC TCACC	GTCTTCT TATCATC ATGG
3	<i>NME1</i>	<i>Non-metastatic cells 1</i>	GCATACAA GTTGGCAGG AAC	TGAGCACA GCTCGTGTA ATCTAC	TTCACCC TGAGGA ACTGG
4	<i>RAN</i>	<i>RAs-related Nuclear protein3</i>	GAAGCTCAT TGGAGACCC TAAC	ATACTGTGC TGCCAAAGC TG	GAAGTT GTCATG GACCC
5	<i>PCNA</i>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	GTGAACCTC ACCAGTATG TC	CCAAGGTAT CCGCGTTA	TACACTA AGGGCC GAAGAT
6	<i>CSE1L</i>	<i>CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)</i>	GGCACAGTC ACTTCACAA GTTG	CACCATTGA TGGAACCCT TC	TACCGCC TGTCCAG GAA

Bersambung...

Sambungan...

7	<i>ENO1</i>	<i>Enolase 1 (alpha)</i>	TGCCTCCTG CTCAAAGTC AA	CAGCTTGCA CGCCTGAA	GTGACC GAGTCTC TTCA
8	<i>GTF3A</i>	<i>General transcription factor IIIA</i>	ATCCATCAG TGCCAGCAT AC	TGACATACA TAGCCCTCG TG	ACGACA TGCCAA GGCCC
9	<i>POLR1D</i>	<i>Polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa</i>	TCGCGCTAT GGGACAGA	TGATCCTCT TCCATCGCT G	ATCCAG AAACCG CCCCA
10	<i>TMEM97</i>	<i>Transmembrane protein 97</i>	AGCCTGGTT TAAGTCCTT TCTG	ACTTGCAGC TTCCTTTGA G	CAACGT ATGCCTT CCTC
11	<i>ZAK</i>	<i>Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK</i>	CCACTGATG TAGCCAAA GGAAT	TGAGGTCTC TGTGAATCA CC	ATGGAG GCTCCTG TCAAG
12	<i>CDC25B</i>	<i>Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)</i>	TCCTAGAGA GTGACTTAA AGGATG	TTCCAAGGT CTTGACCAG TG	AGAGTC TCATTAG TGCCCC
13	<i>TPX2</i>	<i>Microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)</i>	ACTTCCACT TCCGCACAG AT	GGTACATCC CTTAGTCA	CATCTCC TGCCCCG AGTG
14	<i>MYBL2</i>	<i>v-myb Myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2</i>	GCTTCTTGA GCGAGTCCA AA	GAGGGCCA GTTGGTCAG	AAGGCC AGGGAA GTCTTC
15	<i>CKS2</i>	<i>CDC28 protein kinase regulatory subunit 2</i>	GATGGCCCA CAAGCAGA T	GGAAAGTTC TCTGGGTAA C	ACGAGT ACCGGC ATGTTAT G
16	<i>MCM7</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 7</i>	GCTAGTAAG GATGCCACC TAT	ATTCTCAGA CGTGCCAGA G	CCTGCGC CTTICCA CTGC
17	<i>S100A11</i>	<i>S100 calcium binding protein A11</i>	TGCATCGAG TCCCTGATT G	ACACCAGG GTCCTTCTG GTTCTTTG	GAACTA GCTGCCT TCAC

Bersambung...

Sambungan...

18	<i>RRM1</i>	<i>Ribonucleotide reductase M1</i>	TTACCGAGC GGGGCCTAT	CAGGTCATC AGGAATTTT TGG	TCTATTC AGAGCA TACC
19	<i>ODC1</i>	<i>Ornithine decarboxylase 1</i>	ACGTTCAAT GGCTTCCAG AG	ATTGCTGCA TGAGTTGCC ACGCA	ATGTGAT GTCAGG GCCTGC
20	<i>DKC1</i>	<i>Dyskeratosis congenita 1, dyskerin</i>	GGACTATAT CAGGACAG GTTTC	GAAGTATCC GTCGAATCC AG	TTCCCAT GAGGTG GTAGCC
21	<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GCCTCAAGA TCATCAGCA ATG	CTTCCACGA TACCAAAGT TGTC	GCCAAG GTCATCC ATGA
22	<i>ACTB</i>	<i>Beta-actin</i>	TGGAGAAA ATCTGGCAC CAC	GGTCTCAAA CATGATCTG G	ACCGCG AGAAGA TGACC

3.8 ASAI MIGRASI SEL

Asai migrasi sel dilakukan dengan menggunakan asai migrasi sel *QCM chemotaxis* (Millipore). Sebelum asai, sel-sel subjek dieram dalam media McCoy's 5A bebas serum selama 18-24 jam. Sel-sel tersebut diperiksa di bawah mikroskop sebelum diuji. Nombor sel relatif dan morfologi sel ditentu dan diperhatikan. Sel-sel dibasuh sebanyak dua kali dengan menggunakan 1X PBS yang steril. 5 ml 1X tripsin ditambahkan dan dieramkan pada 37 °C selama 5-15 minit. Sel-sel dipipet dengan lembut dan 10-20 ml media pelindapan ditambahkan untuk menyahaktifkan tripsin/EDTA. Media pelindapan terdiri daripada media bebas serum yang mengandungi 5% albumin serum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich). Sel-sel tersebut diemparkan pada kelajuan 1500 rpm selama 5 minit untuk mendapatkan pelet. Pelet sel kemudian diambakan semula (*resuspend*) dengan lembut dalam 1-5 ml media pelindapan bergantung kepada saiz pelet yang terhasil. Sel-sel tersebut dikira dan disediakan dengan kepekatan sebanyak $0.5-1.0 \times 10^6$ sel/ ml.

Asai migrasi sel dijalankan di dalam kabinet keselamatan biologikal. Untuk memperolehi keputusan yang optimum, plat-plat dan reagen-reagen dibawa ke suhu bilik (25 °C) sebelum asai. Forsep telah disterilkan dengan menggunakan 70% etanol dan selitan-selitan asai dikendalikan dengan menggunakan forsep steril. Ampaian sel disediakan dengan kepekatan sel kira-kira $0.5-1.0 \times 10^6$ sel-sel/ml dalam media bebas serum. 300 µl ampaian sel ditambahkan ke dalam setiap selitan masing-masing. Kemudian, 500 µl media lengkap dalam kehadiran 10 % FBS ditambahkan ke dalam kebuk bawah plat. Plat tersebut ditutup dan dieram selama 24 jam pada 37 °C, 5% CO₂.

Selepas pengeraman, media pada atas selitan migrasi dibuang dengan berhati-hati dengan mempipet keluar ampaian sel yang tinggal. Selitan migrasi kemudian diletakkan ke dalam telaga bersih yang mengandungi 400 µl perwarna sel. Selitan tersebut dieram selama 20 minit pada suhu bilik. Selitan tersebut kemudian dice lup ke dalam bikar air beberapa kali untuk dibilas. Sementara selitan tersebut masih lembap, sebatang putik kapas digunakan secara berhati-hati untuk mengeluarkan lapisan sel

bukan migrasi daripada bahagian dalaman selitan. Semua sel dalam perimeter dalaman dipastikan telah dibuang dengan bersih kerana sel-sel yang tinggal dalam bahagian dalam selitan boleh menyumbang kepada perwarna latar belakang. Protokol ini diulangi dengan putik kapas kedua yang bersih. Selitan tersebut dibiarkan kering dalam suhu bilik. Selitan yang diwarna dipindahkan ke telaga bersih yang mengandungi 200 µl penimbal pengestrakan dan diaram selama 15 minit pada suhu bilik. Perwarna diekstrakkan daripada bahagian bawah selitan dengan *tilt* selitan ke depan dan belakang secara lembut beberapa kali semasa pengeraman. Selitan tersebut dikeluarkan daripada telaga. 100 µl campuran perwarna dipindahkan ke plat mikrotiter 96 telaga yang sesuai dengan pengukuran kolorimetrik. Penyerapan diukur dengan menggunakan *Variouskan Flash microplate reader* (Thermo Scientific) pada saiz gelombang 560 nm.

3.9 ASAI INVASI SEL

Asai invasi sel dilakukan dengan menggunakan asai invasi sel *QCM Collagen* (Millipore). Sebelum asai, sel-sel subjek diaram dalam media McCoy's 5A bebas serum selama 18-24 jam. Sel-sel tersebut diperiksa di bawah mikroskop sebelum diuji. Nombor sel relatif dan morfologi sel ditentu dan diperhatikan. Sel-sel dibasuh sebanyak dua kali dengan menggunakan 1X PBS yang steril. 5 ml 1X tripsin ditambahkan dan diaramkan pada 37 °C selama 5 minit. Sel-sel dipipet dengan lembut dan 10-20 ml media pelindapan ditambahkan untuk menyahaktifkan tripsin/EDTA. Media pelindapan terdiri daripada media bebas serum yang mengandungi 5% albumin serum bovin (BSA). Sel-sel tersebut diemparkan pada kelajuan 1500 rpm selama 5 minit untuk mendapatkan pelet. Pelet sel tersebut kemudian diambil semula dengan lembut dalam 1-5 ml media pelindapan bergantung kepada saiz pelet yang terhasil. Sel-sel tersebut dikira dan disediakan dengan kepekatan sebanyak $0.5-1.0 \times 10^6$ sel/ ml.

Asai invasi sel dijalankan di dalam kabinet keselamatan biologi. Untuk memperolehi keputusan yang optimum, plat-plat dan reagen-reagen dibawa ke suhu bilik (25 °C) sebelum asai. Forsep telah disterilkan dengan menggunakan 70% etanol dan selitan-selitan plat dikendalikan dengan menggunakan forsep steril. 300 µl media

bebas serum ditambahkan ke dalam bahagian dalam selitan untuk menghidratkan lapisan kolagen selama 15-30 minit pada suhu bilik. Selepas itu, 250 µl media dikeluarkan dengan berhati-hati daripada selitan tanpa mengacau membran kolagen. Ampaian sel disediakan dengan kepekatan sel kira-kira $0.5-1.0 \times 10^6$ sel/ml dalam media bebas serum. 250 µl ampaian sel yang disediakan ditambahkan ke dalam setiap selitan masing-masing. Kemudian, 500 µl media lengkap dalam kehadiran 10 % FBS telah ditambahkan ke dalam kebuk bawah plat. Plat tersebut ditutup dan dieram selama 48 jam pada 37 °C, 5 % CO₂.

Selepas pengeraman, media pada atas selitan migrasi dibuang dengan berhati-hati dengan mempipet keluar ampaian sel yang tinggal. Selitan migrasi kemudian diletakkan ke dalam telaga bersih yang mengandungi 400 µl perwarna sel. Selitan tersebut dieram selama 20 minit pada suhu bilik. Selitan tersebut kemudian dicekup ke dalam bikar air beberapa kali untuk dibilas. Sementara selitan tersebut masih lembap, sebatang putik kapas digunakan secara berhati-hati untuk mengeluarkan lapisan sel bukan migrasi daripada bahagian dalaman selitan. Semua sel dalam perimeter dalaman dipastikan telah dibuang dengan bersih kerana sel-sel yang tinggal dalam bahagian dalam selitan boleh menyumbang kepada perwarna latar belakang. Protokol ini diulangi dengan putik kapas kedua yang bersih. Selitan tersebut dibiarkan kering dalam suhu bilik. Selitan yang diwarna dipindahkan ke telaga bersih yang mengandungi 200 µl penimbal pengestrakan dan dieram selama 15 minit pada suhu bilik. Perwarna diekstrakkan daripada bahagian bawah selitan dengan *tilt* selitan ke depan dan belakang secara lembut beberapa kali semasa pengeraman. Selitan tersebut dikeluarkan daripada telaga. 100 µl campuran perwarna dipindahkan ke plat mikrotiter 96 telaga yang sesuai dengan pengukuran kolorimetrik. Penyerapan diukur dengan menggunakan *Variouskan Flash microplate reader* (Thermo Scientific) pada saiz gelombang 560 nm.

3.10 ASAI APOPTOSIS SEL

Asai apoptosis sel dibuat dengan menggunakan kit asai aktiviti kolorimetrik *Caspase-3* (Millipore). Sebanyak $0.5-2 \times 10^6$ sel atau pelet dikira. Sel-sel kemudian diampai dalam 50-500 µl 1X penimbal lisis sel. Sel-sel tersebut dieram dalam ais

selama 10 minit. Sampel-sampel sel diempar selama 5 minit pada kelajuan 10,000 x g. Aliran terus dipindah ke tiub baru dan diletakkan dalam ais. Campuran asai disediakan dalam plat 96-telaga seperti yang ditunjukkan dalam jadual bawah. Sampel dieramkan selama satu jam pada suhu 37 °C. Sampel-sampel dibaca dengan menggunakan *Variouskan Flash microplate reader* (Thermo Scientific) pada saiz gelombang pada penyerapan 405 nm.

Jadual 3.3 Campuran sampel untuk asai aktiviti *Caspase 3*

Sampel	Campuran asai			Substrat <i>Caspase-3</i>	Jumlah isipadu
	5X Penimbang asai	Sampel <i>Caspase-3</i>	DH ₂ O		
Pengosong penimbang	20µl	0µl	80µl	0µl	100µl
Pengosong substrat	20µl	0µl	70µl	10µl	100µl
Sampel asai	20µl	X µl	70-X µl	10µl	100µl

3.11 RAWATAN 5-FU

Rawatan 5-FU (Sigma-Aldrich) dijalankan ke atas sel-sel selepas 48 jam tempoh transfeksi. 5-FU dilarutkan dalam 100% dimetilsulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich) dan kemudian dicairkan dengan menggunakan media untuk kajian eksperimen yang selanjutnya. Kawalan sel ialah sel yang dieram dengan DMSO sahaja. Kepekatan akhir DMSO dalam media adalah 0.2%. Dos 5-FU yang dikaji bermula dengan 0 µM sehingga 200 µM selama 24, 48 dan 72 jam. Nilai perencatan kepekatan separa (IC₅₀) bagi sel-sel ditentukan dengan menggunakan asai viabiliti sel. Dos 5-FU yang digunakan dalam kombinasi rawatan 5-FU bersama siRNA dalam asai fungsi yang selanjutnya adalah 1/10 daripada IC₅₀ sel-sel tersebut (Whitehurst et al. 2007).

3.12 ANALISIS KITARAN SEL

Analisis kitaran sel dilakukan dengan menggunakan kit *CycleTEST PLUS* reagen DNA (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Ampaian sel disimpan ke dalam tiub 17 x 100-mm dan diemparkan selama 5 minit pada 300 x g pada suhu bilik. Supernatan dibuang dan 1 ml larutan penimbal ditambah ke dalam pelet dan dicampur dengan sekata. Sampel diemparkan selama 5 minit pada kelajuan 300 x g pada suhu bilik. Supernatan dibuang dan 1 ml larutan penimbal ditambah ke dalam pelet dan dicampur dengan sekata. Sampel tersebut kemudian diemparkan selama 5 minit pada kelajuan 300 x g pada suhu bilik. Supernatan dibuang dan 1 ml larutan penimbal ditambah ke dalam pelet dan dicampur dengan sekata. Sampel tersebut kemudian diemparkan selama 5 minit pada kelajuan 300 x g pada suhu bilik. Sampel sel tersebut adalah siap untuk langkah perwarnaan.

Sebanyak 5.0×10^5 sel diperlukan dalam langkah perwarnaan untuk analisis ploidi DNA. Supernatan dibuang dan 250 μ l larutan A (penimbal tripsin) ditambahkan ke dalam setiap tiub dan dicampurkan dengan sekata tanpa vorteks. Larutan A dibenarkan untuk bertindak balas dengan sampel selama 10 minit pada suhu bilik. Selepas itu, larutan B (perencat tripsin dan penimbal RNase) ditambahkan ke dalam larutan sel dan dicampurkan dengan sekata tanpa vorteks. Sampel tersebut dibiarkan bertindak balas dengan larutan B selama 10 minit pada suhu bilik. Kemudian, 200 μ l larutan C (larutan pewarna propidium iodida) yang sejuk ditambahkan ke dalam setiap tiub. Sampel sel dicampur dengan dengan sekata dan dieram selama 10 minit dalam ais dan gelap. Sampel sel dituras menerusi 35- μ m penutup tapisan sel ke dalam tiub 12 x 75-mm. Sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan mesin sitometri aliran *BD FACSAria™ II* yang dikendalikan oleh pekerja UMBI iaitu puan Sheda (BD Bioscience, Oxford, UK). Butiran kitaran sel dianalisis dengan menggunakan perisian *Modfit LT* (version 4.0, Verity Software House).

3.13 PENGEKSTRAKAN PROTEIN

Sebanyak 1.0×10^5 sel ditransfeksi dengan menggunakan siRNA dalam plat 6-telaga. Selepas 72 jam, media kultur sel dikeluarkan. Sel-sel dibilas dengan 1X PBS sejuk sebanyak dua kali. Penimbal RIPA sejuk yang mengandungi 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% natrium deoksikolat, 0.1% natrium dodesil sulfat dan koktail perencat protease lengkap (Thermo Scientific) kemudian ditambahkan kepada sel-sel dan dieram dalam ais selama 5 minit. Kemudian, lisat sel dikumpul dengan menggunakan pengikis sel dan dipindah ke tiub baru. Sampel protein diempar selama 15 minit dengan kelajuan 14,000 x g. Supernatan dipindah ke tiub baru dalam disimpan dalam -20 °C. Kepekatan protein ditentukan dengan menggunakan dengan menggunakan *Variouskan Flash microplate reader* (Thermo Scientific) pada saiz gelombang asai Bradford (Sigma-Aldrich).

3.14 BLOT WESTERN

Sampel yang mengandungi 30 µg protein dicampur dengan penimbal (kepekatan akhir: 62.5 mM Tris, pH 6.8, 10 % gliserol, 2 % natrium dodesil sulfat (SDS), 0.01% bromofenol biru, 2.5% β-merkaptotanol). Campuran sampel dieramkan pada 96 °C selama 5 minit. Elektroforesis kemudian dilakukan pada 12% gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE) selama 90 minit pada voltan 150 dalam 1X penimbal elektroforesis (25 mM Tris, 250 mM glisina dan 0.1% SDS). Pindahan protein ke membran dijalankan dengan menggunakan kaedah semi-kering. Membran hidrofobik polivinildina fluorida (PVDF) 0.45 µm (Life Science BioTrace, Mexico) digunakan. Selepas elektroforesis, kertas filter dan gel direndam dalam 1X penimbal pindah (kepekatan akhir: 25 mM Tris, 192 mM glisina, 20% metanol). Membran PVDF direndam dalam metanol selama 10 saat, diikuti dengan air suling selama 5 minit dan 1X penimbal pindah selama 10 minit. Gel tersebut kemudian dipindah ke membran PVDF selama 40 minit pada voltan 15. Blot tersebut kemudian dieram dalam larutan sekat, iaitu 5% BSA dalam 1X penimbal salina Tris (TBS), selama satu jam dalam suhu bilik. Membran kemudian dicuci selama 5 minit sebanyak tiga kali dalam 1X TBS yang mengandungi 0.05% Tween-20 (TBST). Membran kemudian

dieram dalam antibodi primer arnab semalaman pada 4 °C: anti-MAC30 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) dengan pencairan 1:100 dalam 5% BSA, anti-DKC1 (pencairan 1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-ZAK (pencairan 1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-NME1 (pencairan 1:100; Santa Cruz Biotechnology) dan anti-CKS2 (pencairan 1 : 200; Sigma-Aldrich).

Pada hari yang berikutnya, membran tersebut dicuci dengan menggunakan 1X TBST selama 5 minit sebanyak tiga kali. Selepas pencucian, membran tersebut dieram dengan antibodi sekunder tikus terhadap antibodi primer (Santa Cruz Biotechnology) dengan pencairan 1:5000 dalam 5% BSA selama satu jam pada suhu bilik dengan pengocakan lembut. Membran tersebut dicuci dengan menggunakan 1X TBST selama 5 minit sebanyak tiga kali dan dieram dengan substrat *chemiluminescent* (Pierce/Thermo Fisher Scientific Rockford, IL) yang mengandungi 1X reagen LumiGLO dan 1X Peroksida (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) dalam sir suling selama satu minit. Membran tersebut dialihkan ke kaset dan dibina dengan menggunakan filem *kodak bioMax light* (Carestream Health, Woodbridge, CT).

3.15 ANALISIS STATISTIK

Semua eksperimen dijalankan dalam duplikasi atau triplikasi. *Two-tailed Student's t test* digunakan untuk analisis statistik. Nilai $P < 0.05$ dianggap sebagai nilai signifikan.

3.15.1 PENGEKSPRESAN GEN RELATIF

Kaedah $\Delta\Delta C_t$ digunakan untuk mengira pengekspresan gen relatif daripada nilai ambang kitaran (C_t). Gen beta-aktin digunakan sebagai gen rujukan endogenus. Cara-cara kiraan pengekspresan gen relatif dengan menggunakan kaedah $\Delta\Delta C_t$ ditunjukkan seperti dalam jadual bawah. Sebagai contoh, pengekspresan sasaran *GAPDH* selepas trasnfeksi siRNA dinormalkan kepada pengekspresan gen rujukan endogenus untuk menentukan ΔC_t (Langkah 1, Jadual 4.1). Langkah ini bertujuan untuk membetulkan

variasi seperti potensi perbezaan dalam bilangan sel. Selepas itu, ΔCt bagi setiap sampel ditransformasikan kepada pengekspresan ΔCt (Langkah 2) dan diikuti dengan pengiraan purata dan sisihan piawai (Langkah 3). Purata tersebut kemudian dinormalkan kepada kawalan untuk menentukan pengekspresan $\Delta\Delta Ct$ (Langkah 4). Jadual berikut menunjukkan cara pengiraan data-data bagi pengekspresan gen *GAPDH*, siRNA bebas RISC, transfeksi *mock* dan kawalan selepas transfeksi siRNA dalam sel HT-29.

Jadual 4.1 Langkah pengiraan pengekspresan gen relatif daripada nilai ambang kitaran (Ct) dengan menggunakan kaedah $\Delta\Delta Ct$.

	Langkah 1		Langkah 2		Langkah 3		Langkah 4		Langkah 5
	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>GAPDH</i>	ΔCt	Pengekspresan ΔCt	Purata ΔCt	Sisihan piawai ΔCt	Pengekspresan $\Delta\Delta Ct$		% Transfeksi
			$(Ct_{GAPDH} - Ct_{ACTB})$	$2^{-\Delta Ct}$	Purata replikasi	Sisihan piawai replikasi	Peraturan kepada kawalan		$(1 - \Delta\Delta Ct)^*100$
GAPDH	27	32.97	5.97	0.016	0.018	0.003	0.020	0.003	98
	27.1	32.7	5.60	0.021					
	27.03	32.95	5.92	0.017					
siRNA	26.81	27.02	0.21	0.865	0.892	0.064	1.021	0.074	
Bebas	26.91	26.96	0.05	0.966					
RISC	26.62	26.86	0.24	0.847					
Transfeksi	27.06	27.39	0.33	0.796	0.808	0.063	0.924	0.072	
mock	26.91	27.32	0.41	0.753					
	26.74	26.93	0.19	0.877					
Kawalan	27.12	27.21	0.09	0.940	0.874	0.195	1.000	0.223	
	27.34	27.3	-0.04	1.028					
	27.16	27.77	0.61	0.655					

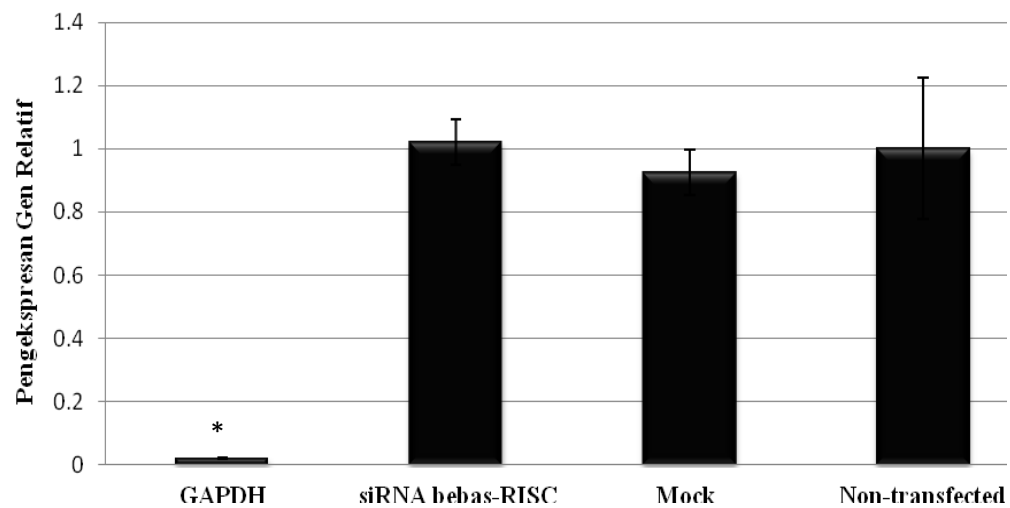
BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 PENGEKSPRESAN GEN

4.1.1 Pengekspresan Gen Kawalan Pada Titisan Sel HT-29 Selepas Transfeksi siRNA

Pengekspresan gen kawalan pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA dikaji. Titisan sel yang ditransfeksi dengan kawalan negatif, siRNA bebas-RISC, menghasilkan pengekspresan gen relatif sebanyak 1.02 ± 0.07 manakala sel yang ditransfeksi dengan reagen transfeksi sahaja (transfeksi *mock*) menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.92 ± 0.07 . Sel yang ditransfeksi dengan kawalan positif, *GAPDH* siRNA, menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai sebanyak 0.02 ± 0.003 ($P < 0.05$).

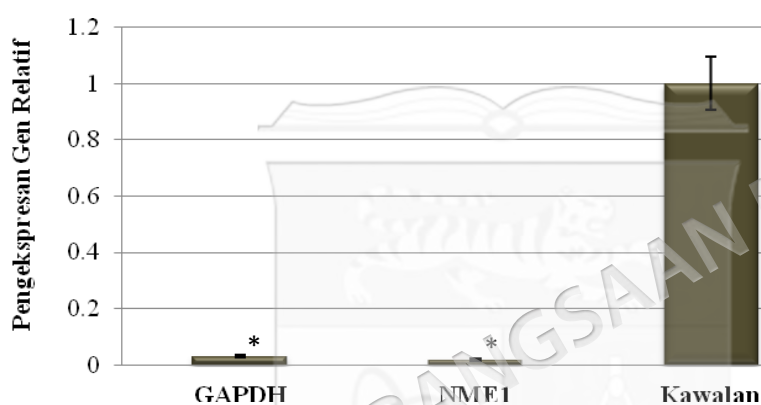


Rajah 4.1

Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen kawalan positif (*GAPDH*), kawalan negatif (siRNA bebas-RISC), transfeksi *mock* dan *non-transfected* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA dengan beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

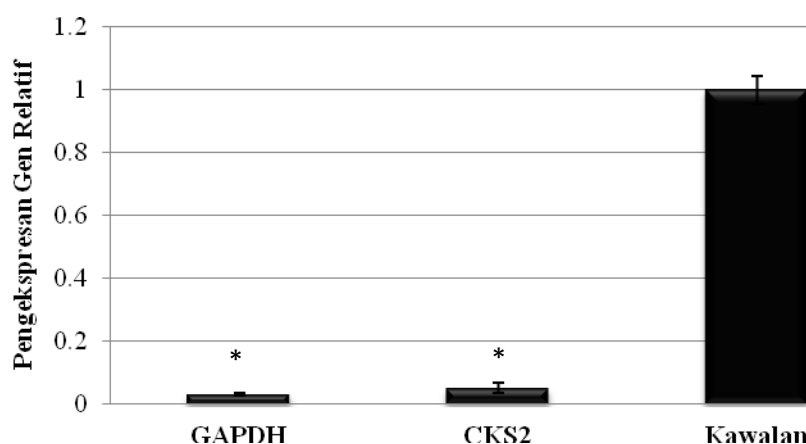
4.1.2 Pengekspresan 20 Gen Pada Titisan Sel HT-29 Selepas Transfeksi siRNA

Daripada 20 gen yang dikaji, hanya lapan gen iaitu *NME1*, *CKS2*, *ZAK*, *TMEM97*, *DKC1*, *TPX2*, *RRM1*, dan *ENO1* menunjukkan pengurangan aras mRNA lebih daripada 70 % berbanding kawalan ‘*non-transfected*’ dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA yang spesifik pada titisan sel HT-29. Gen *NME1* menunjukkan penurunan pengekspresan gen secara signifikan berbanding kawalan dengan nilai sebanyak 0.02 ± 0.005 ($P < 0.05$).



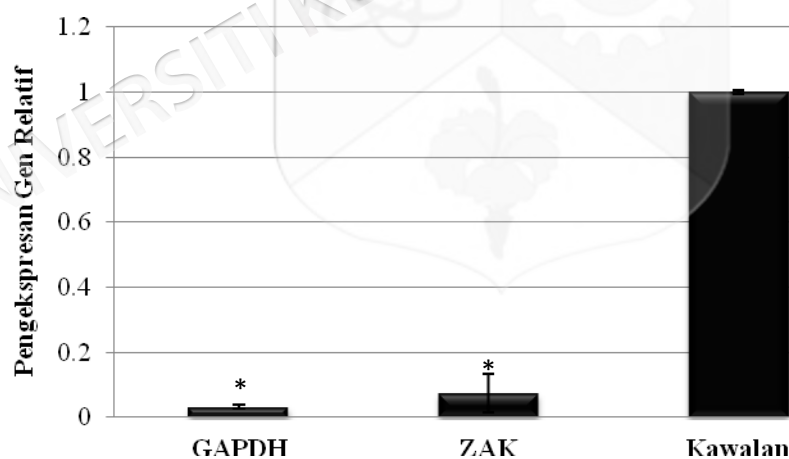
Rajah 4.2 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *NME1* pada sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Gen *CKS2* menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai sebanyak 0.05 ± 0.02 berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HT-29 seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.3.

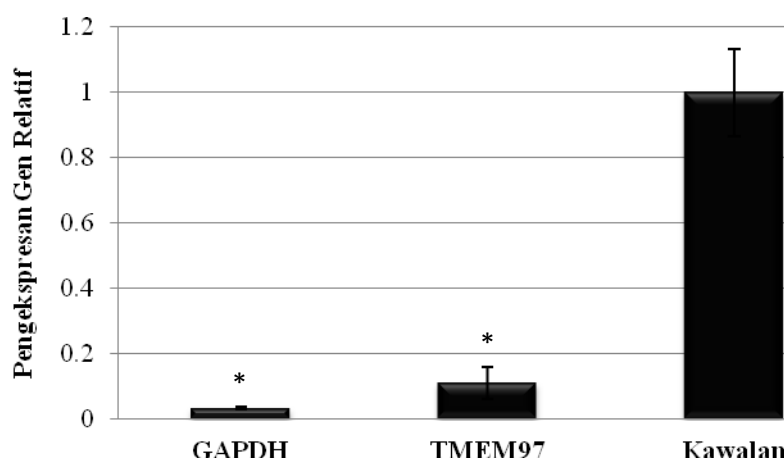


Rajah 4.3 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CKS2* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Gen *ZAK* juga menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan, dengan nilai 0.07 ± 0.06 selepas transfeksi siRNA (Rajah 4.4) dan nilai pengekspresan gen relatif bagi gen *TMEM97* ialah 0.11 ± 0.05 selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HT-29 (Rajah 4.5).

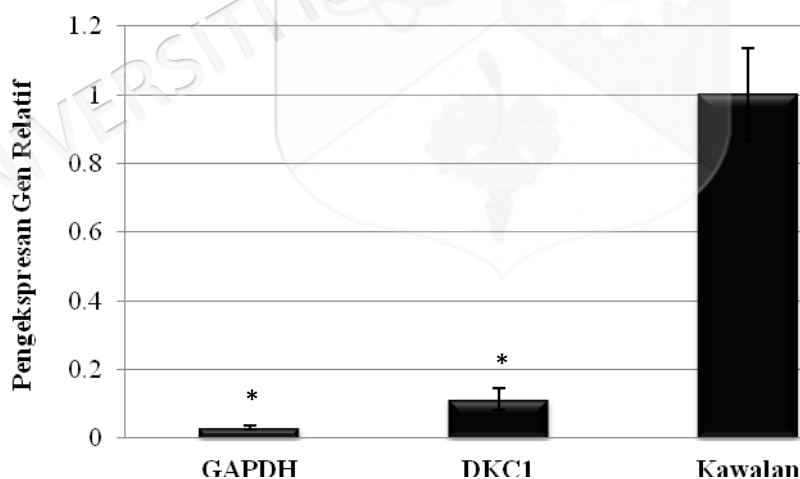


Rajah 4.4 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ZAK* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) dianggap sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

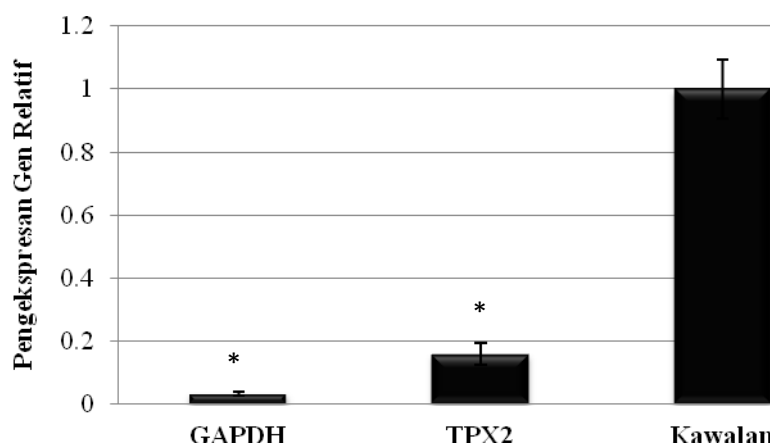


Rajah 4.5 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TMEM97* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Merujuk kepada Rajah 4.6 dan Rajah 4.7, gen *DKC1* dan *TPX2* masing-masing menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai 0.11 ± 0.03 dan 0.16 ± 0.04 berbanding kawalan sel dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA yang spesifik.

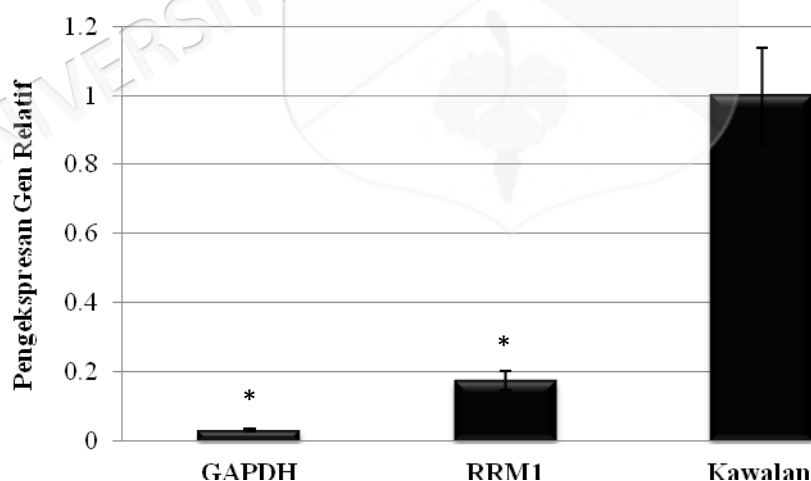


Rajah 4.6 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *DKC1* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

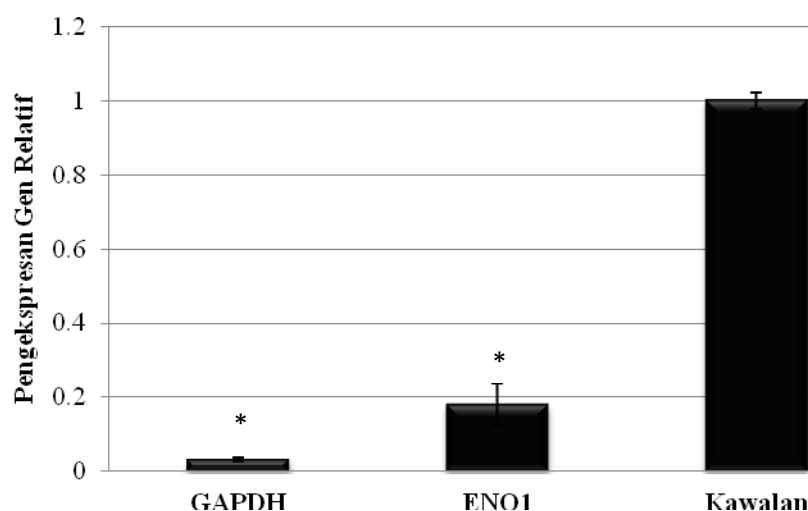


Rajah 4.7 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TPX2* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Gen-gen *RRM1* dan *ENO1* menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai masing-masing 0.18 ± 0.03 dan 0.18 ± 0.07 berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.8 dan Rajah 4.9.

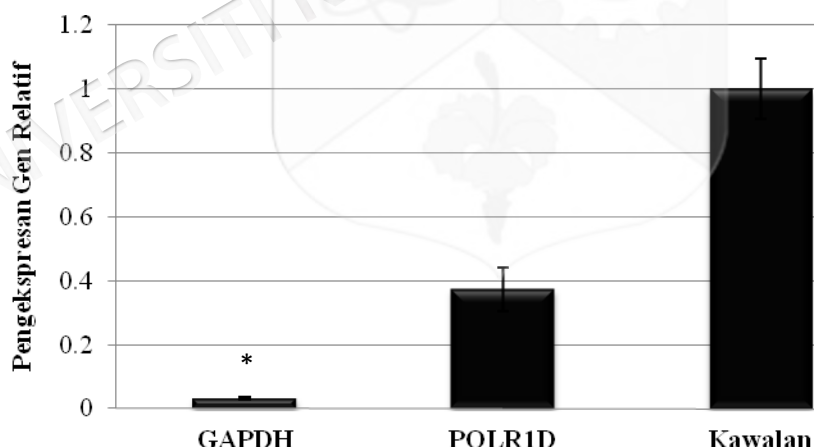


Rajah 4.8 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *RRM1* pada sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

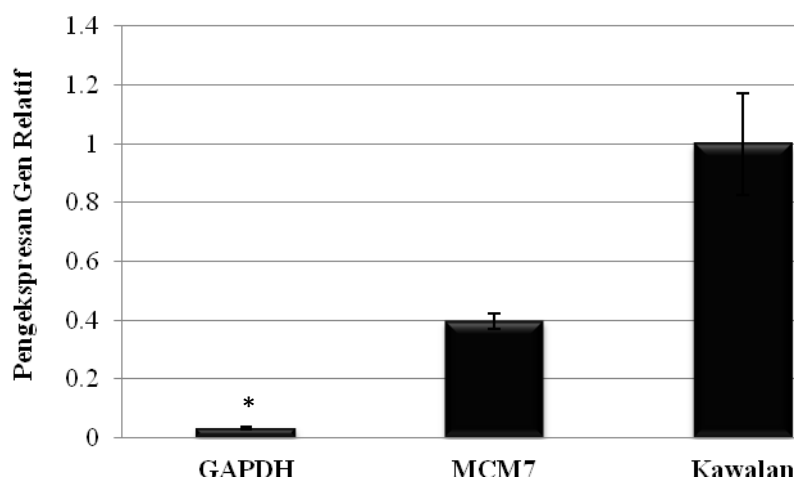


Rajah 4.9 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ENO1* pada sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Tiada penurunan pengekspresan gen yang signifikan bagi gen *POLR1D* dan *MCM7* selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HT-29 dengan nilai 0.38 ± 0.07 bagi gen *POLR1D* dan 0.4 ± 0.03 bagi gen *MCM7* (Rajah 4.10 dan Rajah 4.11).

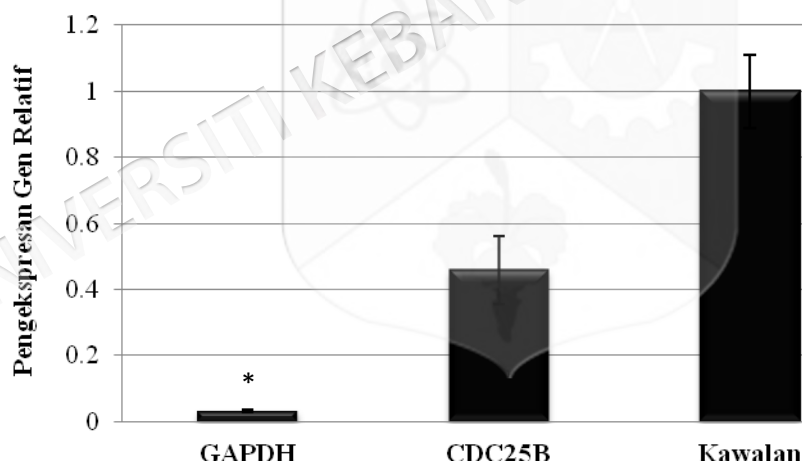


Rajah 4.10 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *POLR1D* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).



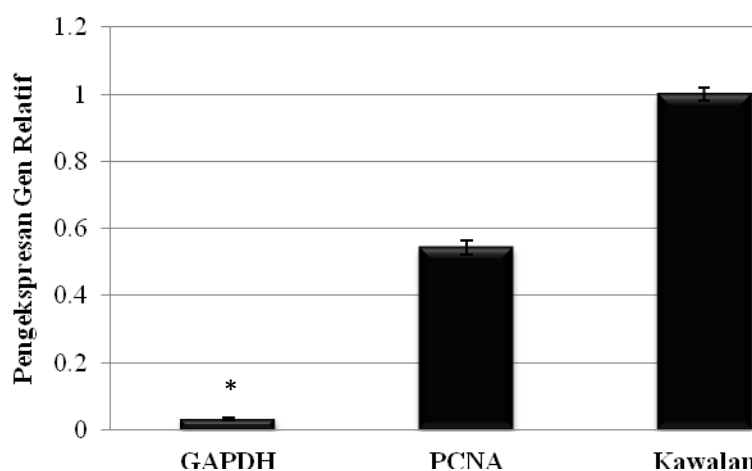
Rajah 4.11 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *MCM7* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Pengekspresan gen relatif bagi gen *CDC25B* pada titisan sel HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA ialah 0.46 ± 0.10 (Rajah 4.12).



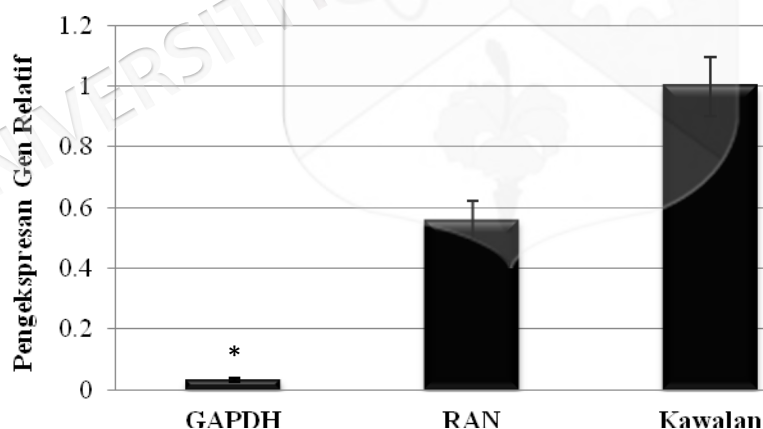
Rajah 4.12 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CDC25B* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Merujuk kepada Rajah 4.13, penyenyapan gen *PCNA* pada titisan sel HT-29 tidak menunjukkan penurunan pengekspresan gen signifikan dengan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.54 ± 0.02 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA.

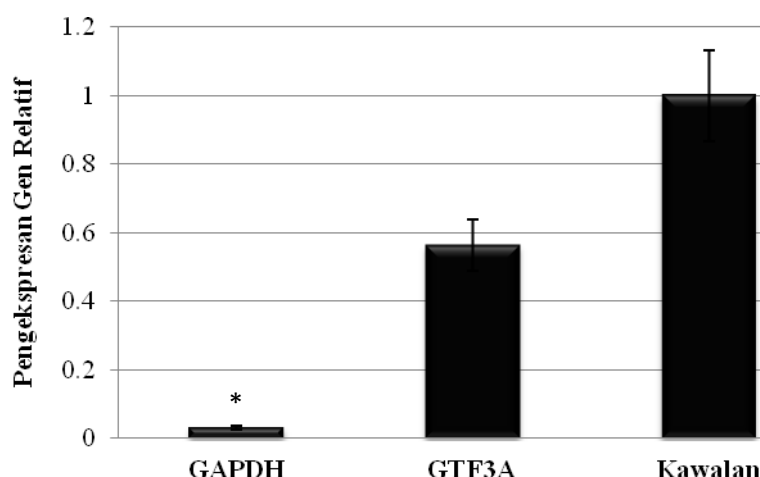


Rajah 4.13 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *PCNA* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (*P < 0.05).

Penyenyapan gen *RAN* menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.56 ± 0.06 (Rajah 4.14) manakala penyenyapan *GTF3A* adalah sebanyak 0.56 ± 0.07 (Rajah 4.15) dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HT-29.

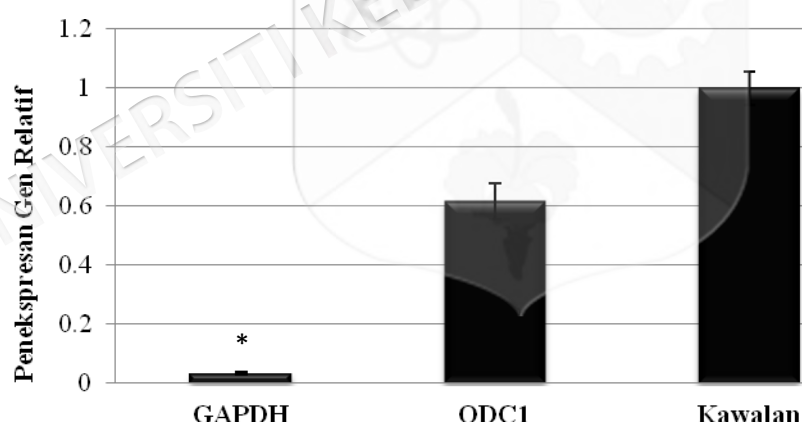


Rajah 4.14 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *RAN* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (*P < 0.05).

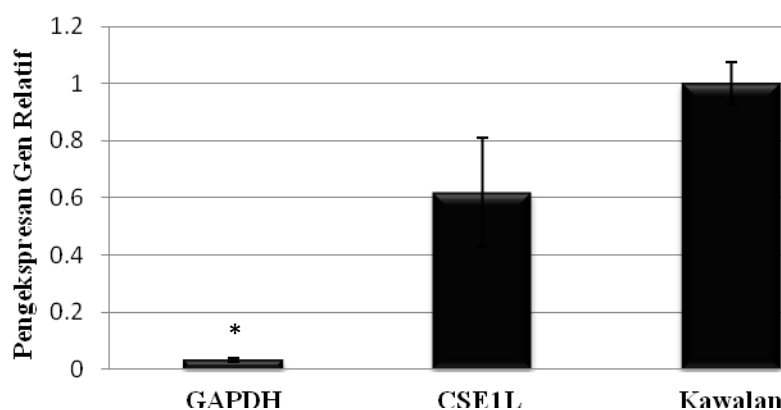


Rajah 4.15 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *GTF3A* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Pengekspresan gen relatif pada titisan sel HT-29 bagi gen *ODC1* adalah 0.62 ± 0.06 dan bagi gen *CSE1L* adalah 0.62 ± 0.2 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA spesifik (Rajah 4.16 dan Rajah 4.17).

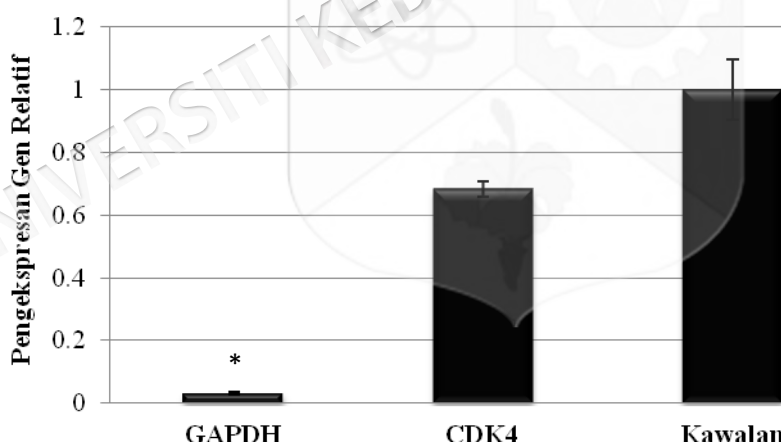


Rajah 4.16 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ODC1* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

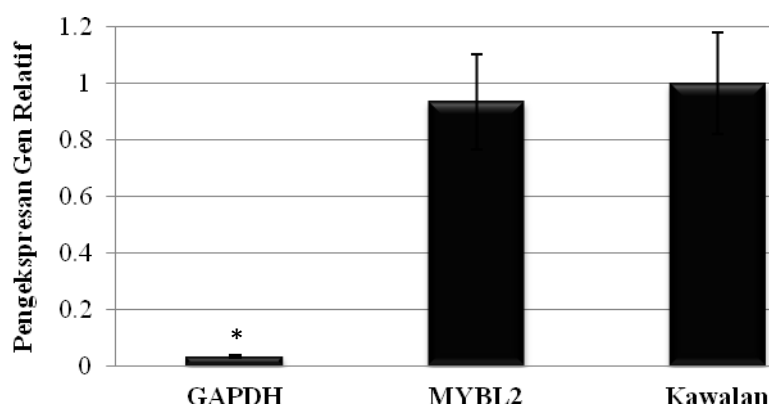


Rajah 4.17 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CSE1L* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Tiada penurunan pengekspresan gen yang signifikan bagi gen *CDK4* dan *MYBL2* selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HT-29 dengan nilai 0.68 ± 0.02 bagi gen *CDK4* dan 0.94 ± 0.17 bagi gen *MYBL2* (Rajah 4.18 dan Rajah 4.19).

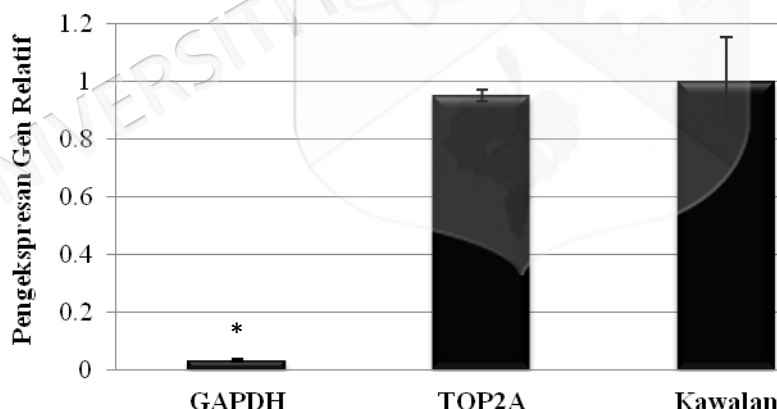


Rajah 4.18 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CDK4* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

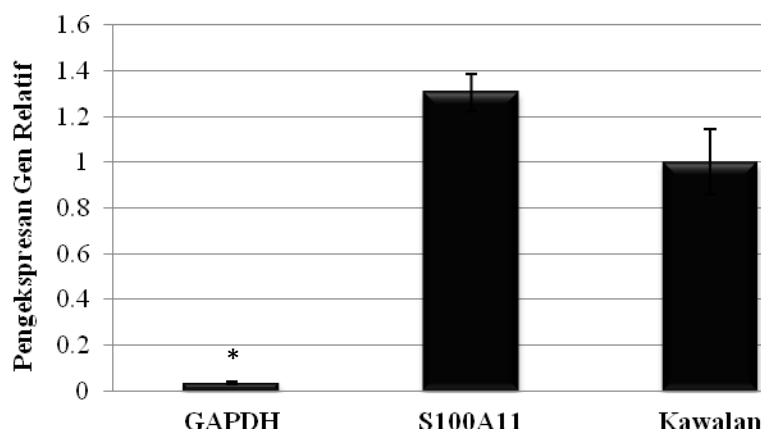


Rajah 4.19 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *MYBL2* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Penyenyapan gen *TOP2A* pada titisan sel HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA spesifik pula menunjukkan nilai pengekspresan gen relatif sebanyak 0.95 ± 0.02 (Rajah 4.20) manakala penyenyapan gen *S100A11* adalah sebanyak 1.31 ± 0.08 (Rajah 4.21).



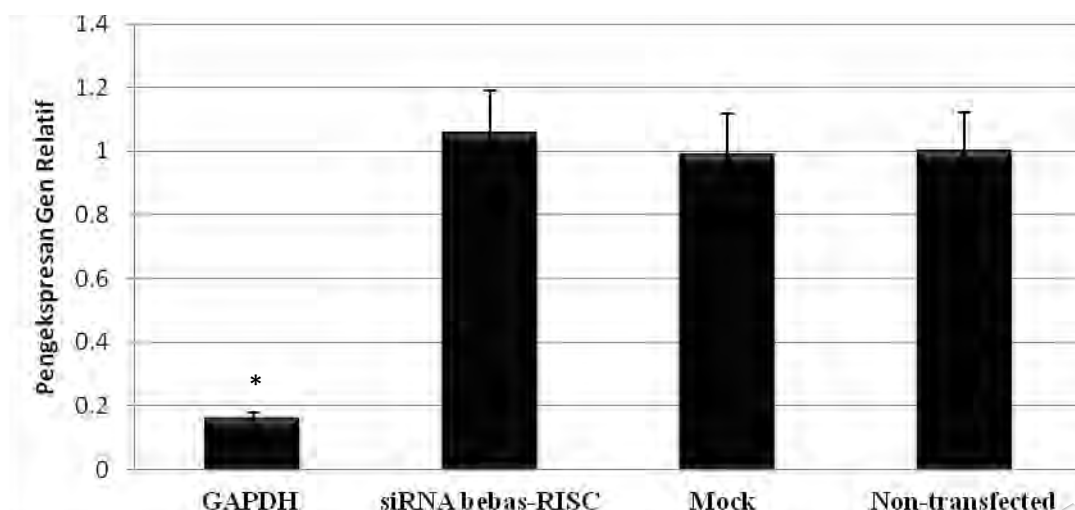
Rajah 4.20 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TOP2A* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).



Rajah 4.21 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *S100A11* pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

4.1.3 Pengekspresan Gen Kawalan Pada Titisan Sel HCT116 Selepas Transfeksi siRNA

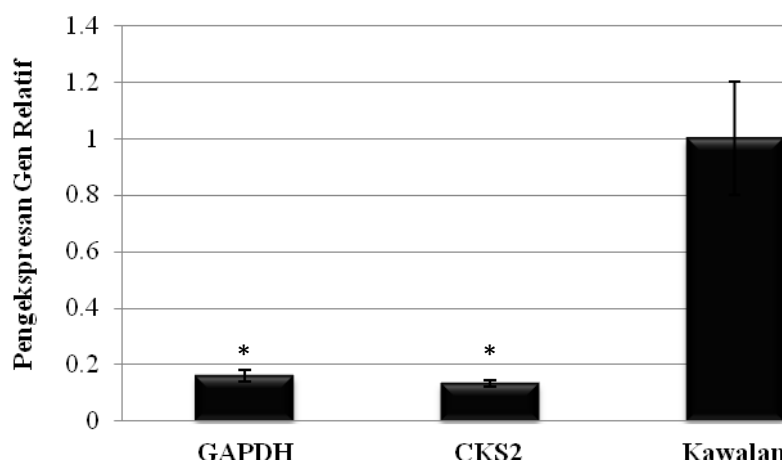
Pengekspresan gen kawalan pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA dikaji. Titisan sel HCT116 yang ditransfeksi dengan kawalan negatif, siRNA bebas-RISC, menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 1.06 ± 0.13 manakala sel yang ditransfeksi dengan reagen transfeksi sahaja, *mock*, menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.99 ± 0.13 . Kawalan positif, iaitu titisan sel HCT116 yang ditransfeksi dengan *GAPDH* siRNA menunjukkan penurunan pengekspresan gen sebanyak 0.16 ± 0.02 ($P < 0.05$).



Rajah 4.22 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi kawalan positif (gen *GAPDH*), kawalan negatif (siRNA bebas-RISC), transfeksi *mock* dan *non-transfected* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA dengan beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

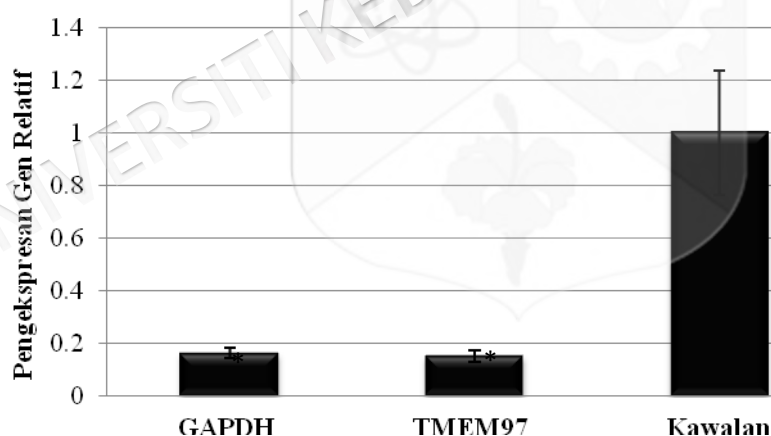
4.1.4 Pengekspresan 20 Gen Pada Titisan Sel HCT116 Selepas Transfeksi siRNA

Daripada 20 gen yang dikaji, hanya lapan gen iaitu *CKS2*, *TMEM97*, *NME1*, *DKC1*, *PCNA*, *ODC1*, *ZAK* dan *GTF3A* menunjukkan pengurangan aras mRNA lebih daripada 70 % dengan signifikan berbanding kawalan *non-transfected* dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Gen *CKS2* menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.13 ± 0.01 berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA (Rajah 4.23).



Rajah 4.23 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CKS2* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

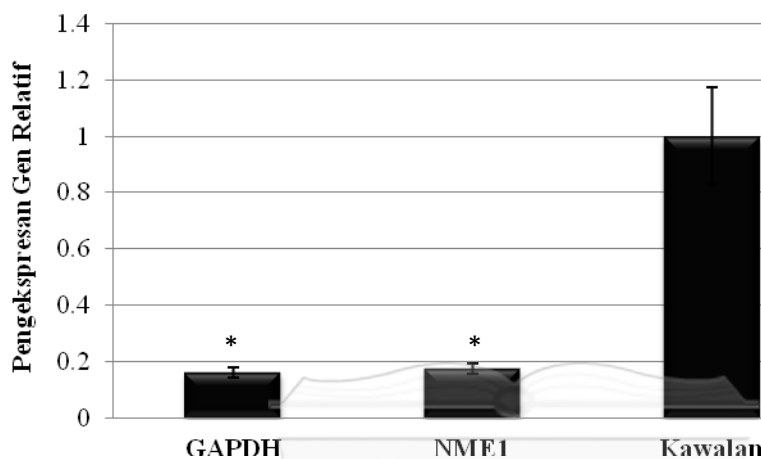
Merujuk kepada Rajah 4.24, transfeksi siRNA bagi gen *TMEM97* menurun pengekspresan gen secara signifikan dengan nilai 0.15 ± 0.02 berbanding kawalan pada titisan sel HCT116.



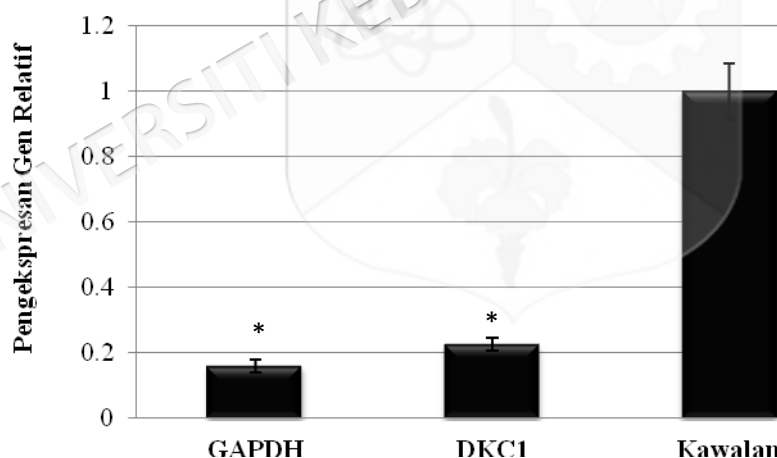
Rajah 4.24 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TMEM97* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Gen *NME1* menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai sebanyak 0.17 ± 0.02 (Rajah 4.25) dan gen *DKC1* menunjukkan penurunan pengekspresan yang signifikan sebanyak 0.23 ± 0.02 (Rajah 4.26) dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA yang spesifik pada titisan sel HCT116. Gen

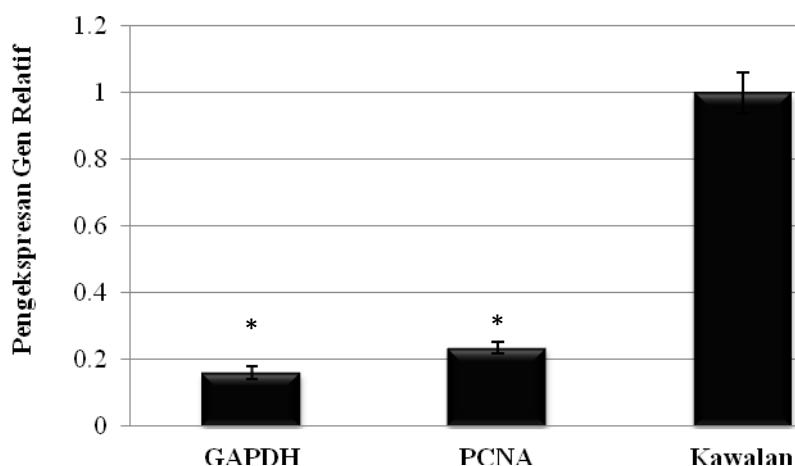
PCNA pula menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai 0.236 ± 0.016 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA yang spesifik (Rajah 4.27).



Rajah 4.25 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *NME1* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

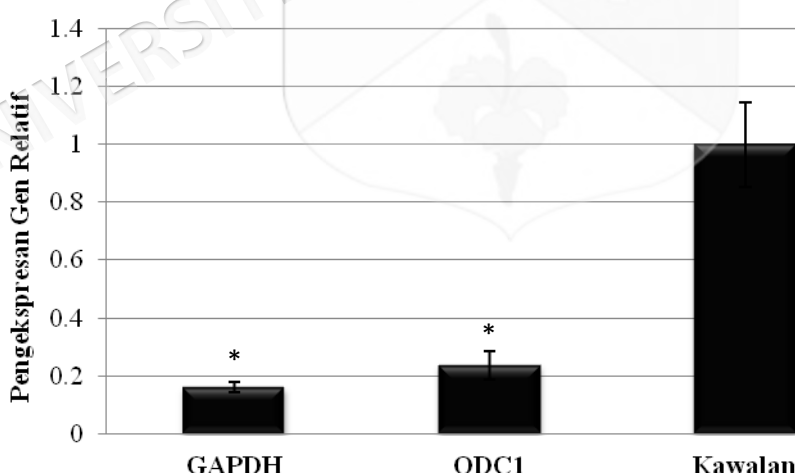


Rajah 4.26 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *DKC1* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

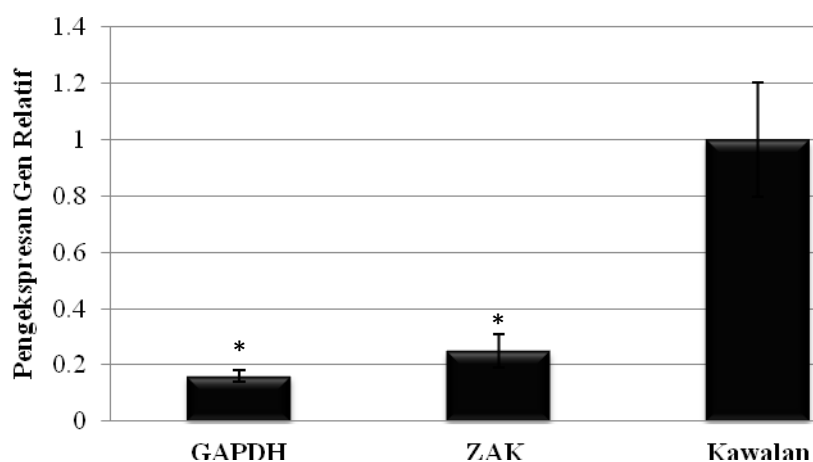


Rajah 4.27 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *PCNA* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Merujuk kepada Rajah 4.28 dan Rajah 4.29, gen *ODCI* menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan dengan nilai 0.24 ± 0.05 manakala *ZAK* menunjukkan penurunan pengekspresan yang signifikan sebanyak 0.25 ± 0.06 pada titisan sel HCT116 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA.

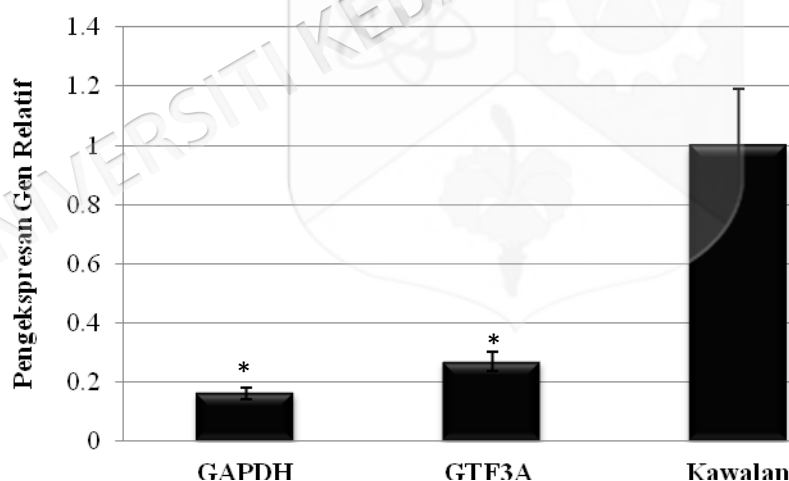


Rajah 4.28 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ODCI* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).



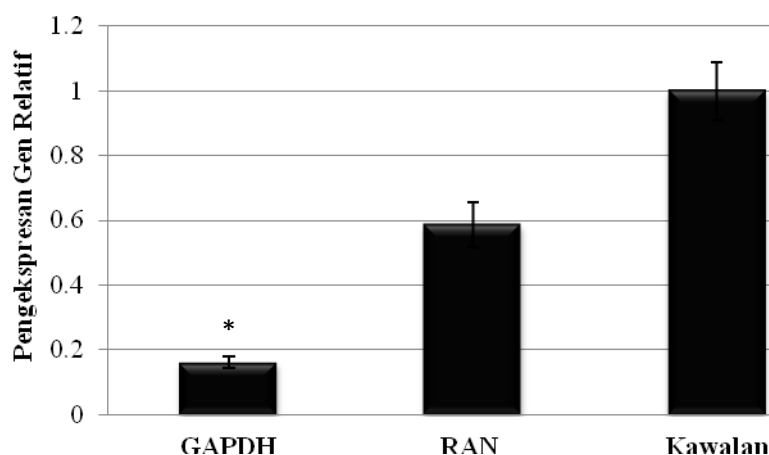
Rajah 4.29 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ZAK* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Penyenyapan gen *GTF3A* menurun pengekspresan gen secara signifikan dengan nilai 0.27 ± 0.03 pada titisan sel HCT116 berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA (Rajah 4.30).



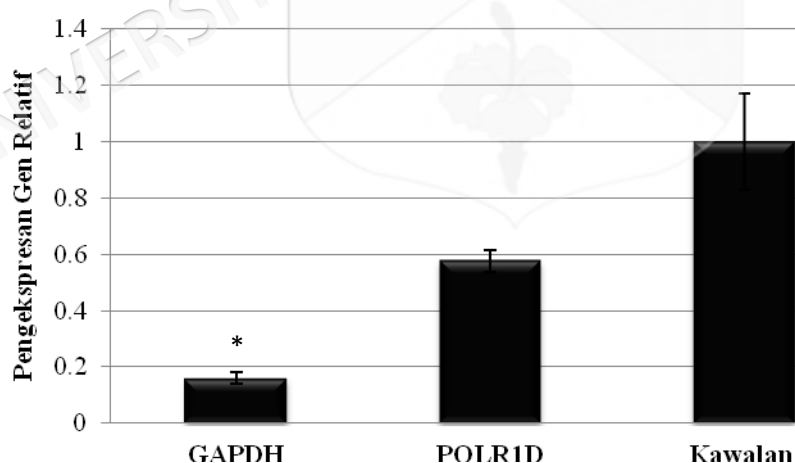
Rajah 4.30 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *GTF3A* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Pengekspresan gen relatif bagi gen *RAN* adalah tidak signifikan dengan nilai 0.59 ± 0.07 berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HCT116 (Rajah 4.31).

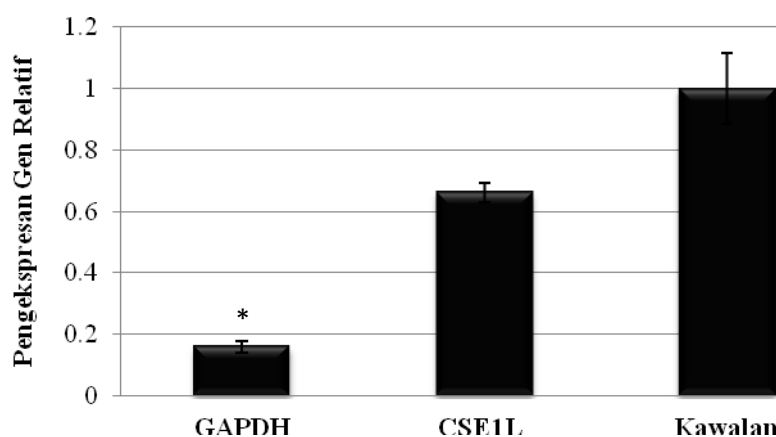


Rajah 4.31 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *RAN* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Pengekspresan gen relatif adalah tidak signifikan bagi gen *POLR1D*, dengan nilai 0.58 ± 0.04 (Rajah 4.32), dan nilai 0.66 ± 0.03 (Rajah 4.33) bagi gen *CSE1L*, berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HCT116.

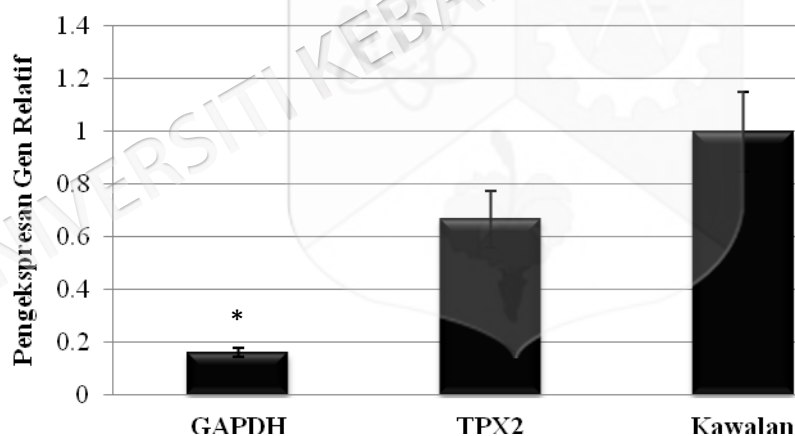


Rajah 4.32 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *POLR1D* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

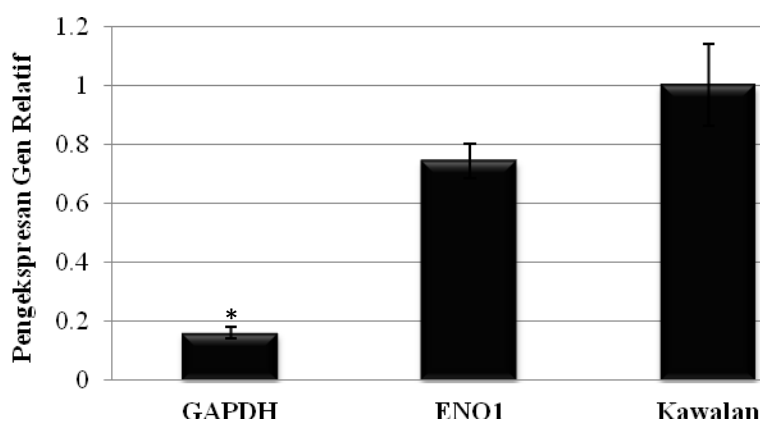


Rajah 4.33 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CSE1L* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Rajah 4.34 dan Rajah 4.35 pula menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TPX2* dan *ENO1*: iaitu 0.67 ± 0.11 dan 0.74 ± 0.06 , berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HCT116.

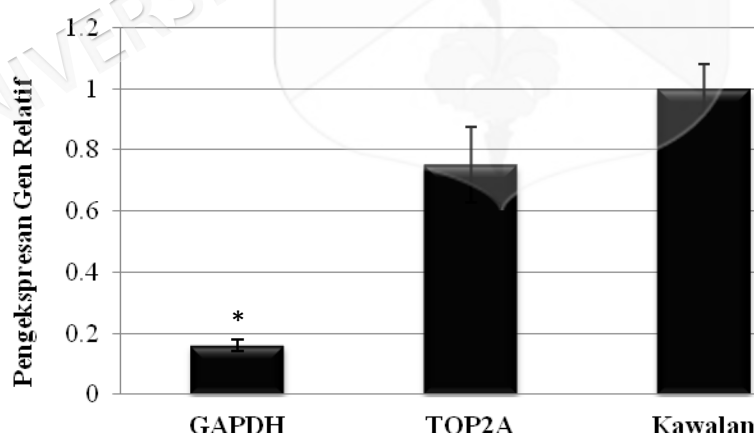


Rajah 4.34 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TPX2* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

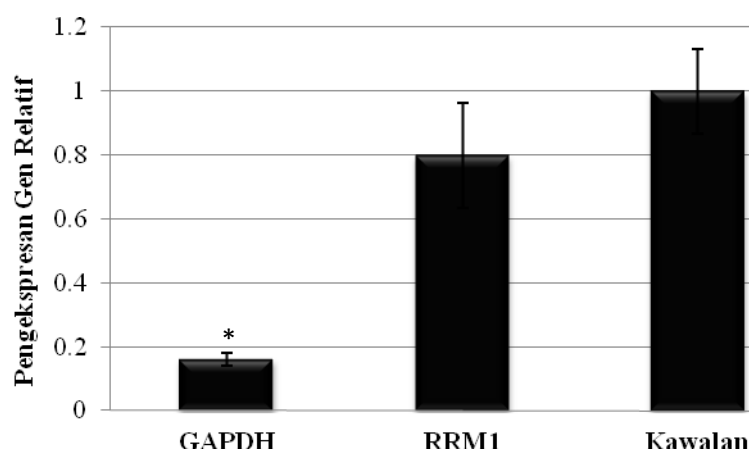


Rajah 4.35 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *ENO1* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

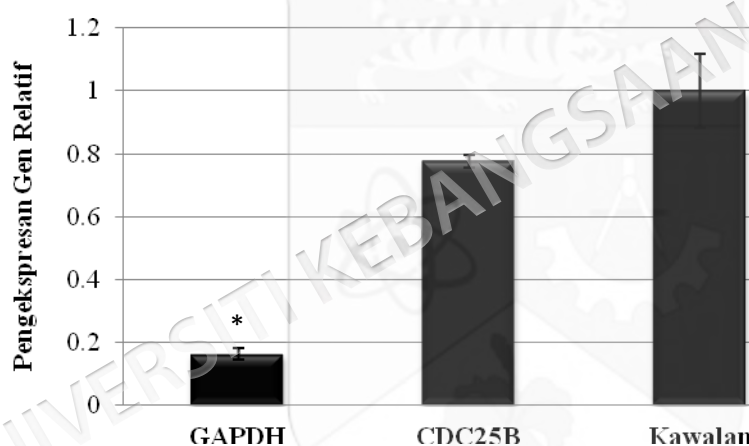
Gen *TOP2A* menunjukkan pengekspresan gen relatif yang tidak signifikan dengan nilai 0.75 ± 0.13 (Rajah 4.36) manakala gen *RRM1* menunjukkan nilai sebanyak 0.80 ± 0.17 (Rajah 4.37). Gen *CDC25B* juga menunjukkan pengekspresan gen relatif yang tidak signifikan dengan nilai 0.78 ± 0.02 (Rajah 4.38) berbanding dengan kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HCT116.



Rajah 4.36 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *TOP2A* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

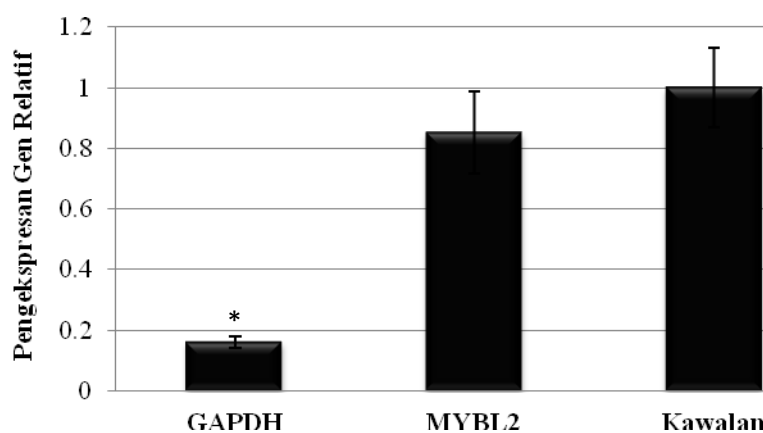


Rajah 4.37 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *RRM1* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (*P < 0.05).

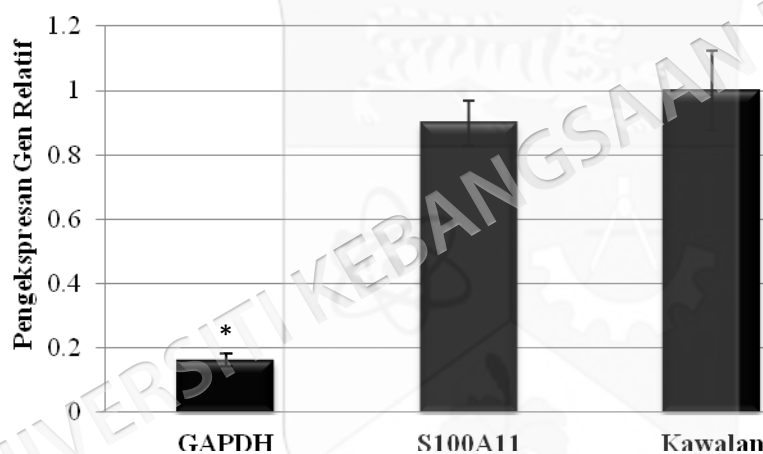


Rajah 4.38 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CDC25B* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (*P < 0.05).

Pengekspresan gen relatif bagi gen *MYBL2* ialah 0.85 ± 0.14 (Rajah 4.39) manakala gen *S100A11* pula menunjukkan pengekspresan gen relatif sebanyak 0.90 ± 0.07 (Rajah 4.40) berbanding kawalan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA pada titisan sel HCT116.

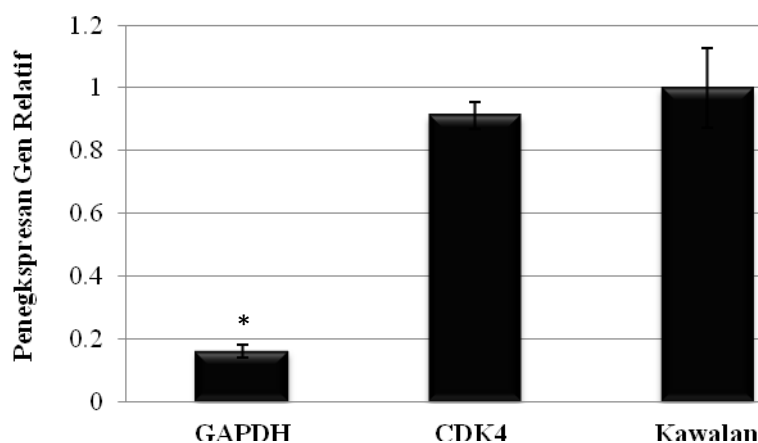


Rajah 4.39 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *MYBL2* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

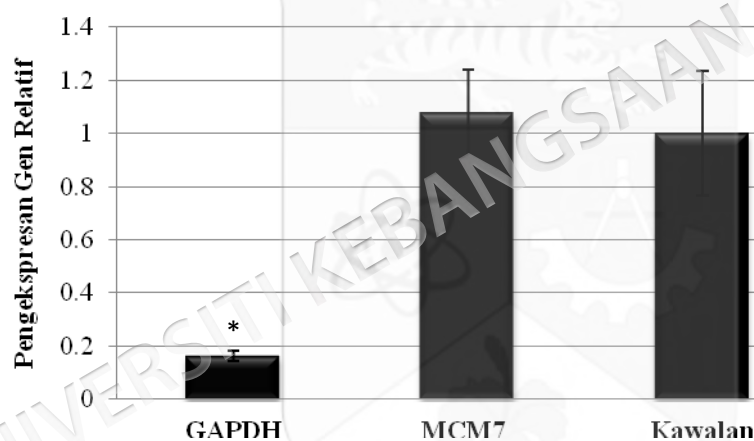


Rajah 4.40 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *S100A11* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

Selain itu, transfeksi siRNA bagi gen *CDK4* menunjukkan nilai pengekspresan gen sebanyak 0.91 ± 0.04 (Rajah 4.41) dan bagi gen *MCM7* adalah sebanyak 1.07 ± 0.17 (Rajah 4.42) berbanding kawalan pada titisan sel HCT116.



Rajah 4.41 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *CDK4* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

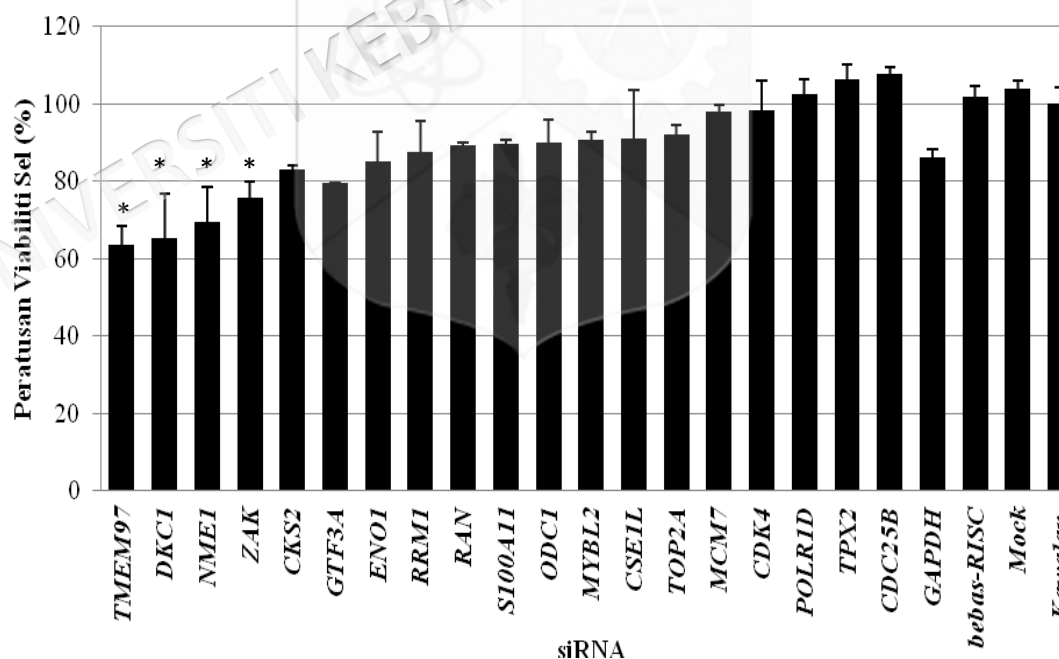


Rajah 4.42 Histogram menunjukkan pengekspresan gen relatif bagi gen *MCM7* pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Gen *GAPDH* dianggap sebagai kawalan positif manakala gen beta-aktin (*ACTB*) sebagai gen rujukan endogenus (* $P < 0.05$).

4.2 ASAI VIABILITI SEL

4.2.1 Viabiliti Titisan Sel HT-29 Selepas Transfeksi siRNA

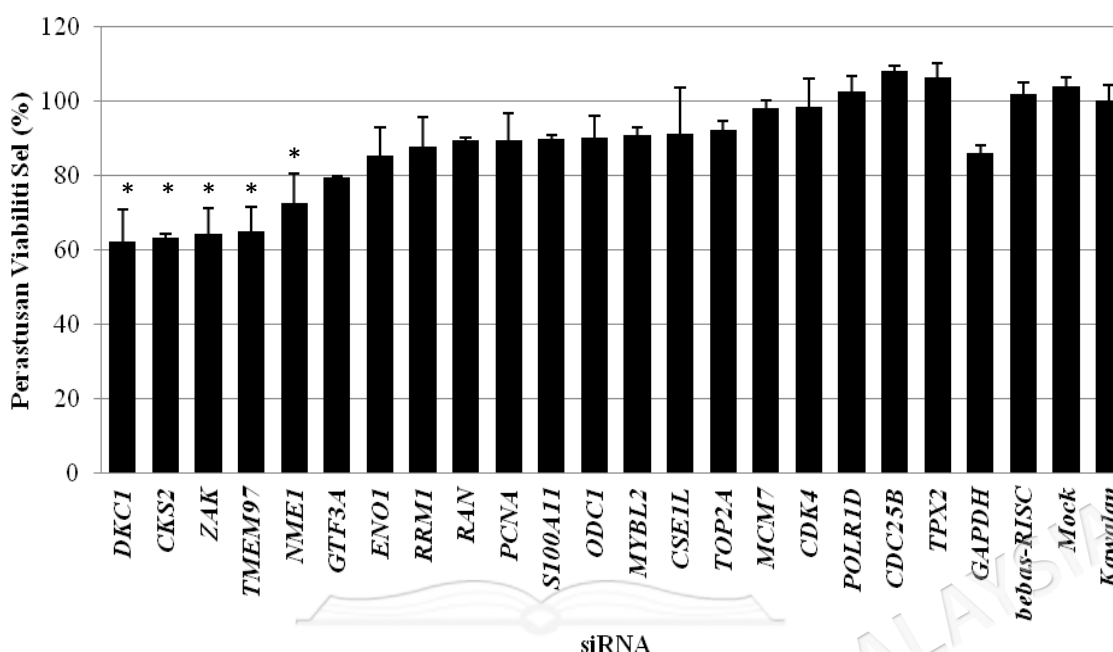
Merujuk kepada Rajah 4.43, daripada 20 gen yang dikaji, sebanyak empat gen iaitu *TMEM97*, *DKC1*, *NME1* dan *ZAK* yang dapat mengurangkan viabiliti titisan sel HT-29 secara signifikan berbanding kawalan (*non-transfected*) berikutan transfeksi siRNA. Penenyapan gen *TMEM97* menghasilkan nilai viabiliti sebanyak $63.6 \pm 4.9\%$ manakala penenyapan gen *DKC1* pula menunjukkan viabiliti sel sebanyak $65.2 \pm 11.6\%$ dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Titisan sel HT-29 yang ditransfeksi dengan siRNA *NME1* menunjukkan peratusan viabiliti sel sebanyak $65.6 \pm 9.0\%$ manakala sel yang ditransfeksi dengan siRNA *ZAK* menunjukkan viabiliti sel sebanyak $75.8 \pm 4.3\%$. Penenyapan gen lain tidak menurunkan viabiliti titisan sel HT-29 secara signifikan dengan menghasilkan peratusan viabiliti sel melebihi 80 % dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA (Rajah 4.43).



Rajah 4.43 Histogram menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HT-29 bagi penenyapan 20 gen yang terpilih. Peratusan viabiliti titisan sel HT-29 dikaji dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Data yang ditunjukkan adalah purata bagi peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen yang berbeza (*P < 0.05).

4.2.2 Viabiliti Titisan Sel HCT116 Selepas Transfeksi siRNA

Bagi titisan sel HCT116, daripada 20 gen yang dikaji, didapati lima gen iaitu *DKC1*, *CKS2*, *ZAK*, *TMEM97* dan *NME1* mengalami pengurangan peratusan viabiliti sel secara signifikan berikutan transfeksi siRNA spesifik terhadap gen tersebut (Rajah 4.44). Penenyapan gen *DKC1* pada titisan HCT116 menunjukkan viabiliti sel sebanyak $62.1 \pm 8.6\%$ manakala penenyapan gen *CKS2* menunjukkan viabiliti sel sebanyak $63.3 \pm 1.0\%$ dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Penenyapan gen *ZAK* juga menurunkan viabiliti sel HCT116 secara signifikan dengan menunjukkan nilai sebanyak $64.2 \pm 6.9\%$ manakala penenyapan gen *TMEM97* menunjukkan nilai sebanyak $64.7 \pm 6.9\%$. Penenyapan gen *NME1* pula menunjukkan viabiliti sel HCT116 sebanyak $72.6 \pm 7.7\%$ dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Penenyapan gen-gen lain tidak menurunkan viabiliti titisan sel HCT116 secara signifikan seperti yang ditunjukkan pada Rajah 4.44.



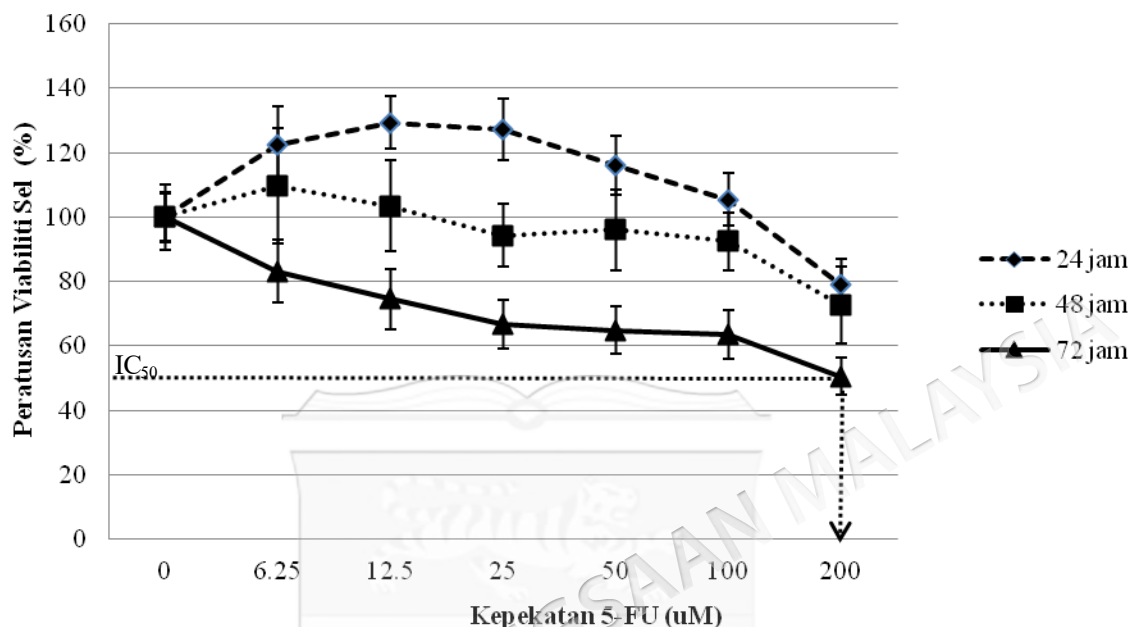
Rajah 4.44 Histogram menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HCT116 bagi penyenyapan 20 gen yang terpilih. Peratusan viabiliti titisan sel HCT116 dikaji dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Data yang ditunjukkan adalah purata bagi peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen yang berbeza (* $P < 0.05$).

4.2.3 Viabiliti Titisan Sel HT-29 Selepas Pentitratan 5-FU

Viabiliti titisan sel HT-29 masih tinggi dalam tempoh 24 jam selepas rawatan 5-FU, dengan nilai peratusan sebanyak $100 \pm 10.2\%$ (0 μM), $122.6 \pm 11.6\%$ (6.25 μM), $129.3 \pm 8.1\%$ (12.5 μM), $127.3 \pm 9.6\%$ (25 μM), $116.0 \pm 9.2\%$ (50 μM), $105.5 \pm 8.0\%$ (100 μM) dan $79.2 \pm 7.7\%$ (200 μM). Viabiliti titisan sel HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas rawatan 5-FU ialah $100 \pm 7.9\%$ (0 μM), $109.7 \pm 17.8\%$ (6.25 μM), $103.5 \pm 14.1\%$ (12.5 μM), $94.3 \pm 9.7\%$ (25 μM), $96.1 \pm 12.6\%$ (50 μM), $92.5 \pm 8.9\%$ (100 μM) dan $72.8 \pm 12.0\%$ (200 μM).

IC₅₀ bagi titisan sel HT-29 tidak dapat diperolehi bagi tempoh 24 jam dan 48 jam selepas rawatan 5-FU. Dalam tempoh 72 jam selepas rawatan 5-FU, titisan sel HT-29 menunjukkan viabiliti sel sebanyak $100 \pm 7.2\%$ (0 μM), $83.2 \pm 9.6\%$ (6.25 μM), $74.5 \pm 9.3\%$ (12.5 μM), $66.9 \pm 7.6\%$ (25 μM), $64.8 \pm 7.4\%$ (50 μM), $63.7 \pm$

7.5% (100 μ M) dan $50.5 \pm 5.7\%$ (200 μ M). IC_{50} bagi titisan sel HT-29 dalam tempoh 72 jam selepas rawatan 5-FU adalah kira-kira 200 μ M (Rajah 4.45).

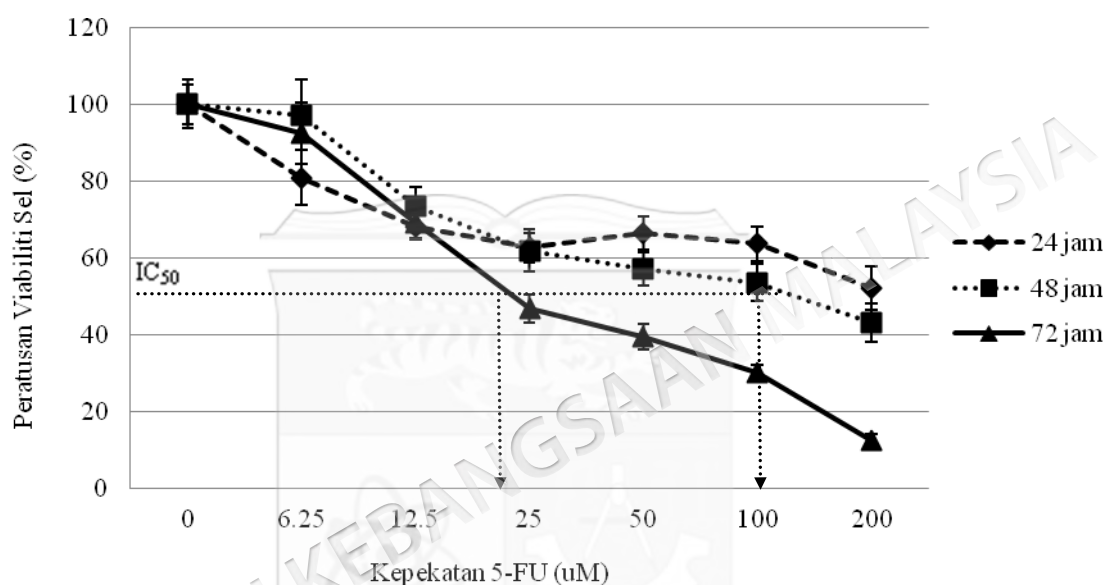


Rajah 4.45 Graf menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HT-29 selepas 24 jam, 48 jam dan 72 jam rawatan 5-FU. Anak panah bertitik menunjukkan IC_{50} pada titisan sel HT-29 selepas rawatan 5-FU. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.2.4 Viabiliti Titisan Sel HCT116 Selepas Pentitratan 5-FU

Bagi titisan sel HCT116, viabiliti sel dalam tempoh 24 jam selepas rawatan 5-FU ialah $100 \pm 5.3\%$ (0 μ M), $80.9 \pm 7.2\%$ (6.25 μ M), $68.1 \pm 3.1\%$ (12.5 μ M), $62.7 \pm 3.9\%$ (25 μ M), $66.3 \pm 4.3\%$ (50 μ M), $63.7 \pm 4.5\%$ (100 μ M) dan $52.1 \pm 5.7\%$ (200 μ M). Dalam tempoh 48 jam selepas rawatan 5-FU, titisan sel HCT116 menunjukkan viabiliti sebanyak $100 \pm 6.3\%$ (0 μ M), $97.3 \pm 9.1\%$ (6.25 μ M), $73.4 \pm 5.0\%$ (12.5 μ M), $61.9 \pm 5.5\%$ (25 μ M), $57.2 \pm 4.3\%$ (50 μ M), $53.5 \pm 4.9\%$ (100 μ M) dan $43.1 \pm 4.9\%$ (200 μ M). IC_{50} bagi titisan sel HCT116 dalam tempoh 48 jam selepas rawatan 5-FU adalah kira-kira 100 μ M (Rajah 4.46).

Peratusan viabiliti titisan sel HCT116 dalam tempoh 72 jam selepas rawatan 5-FU ialah $100 \pm 5.1\%$ ($0 \mu\text{M}$), $92.4 \pm 8.0\%$ ($6.25 \mu\text{M}$), $69.1 \pm 4.2\%$ ($12.5 \mu\text{M}$), $46.8 \pm 3.6\%$ ($25 \mu\text{M}$), $39.4 \pm 3.2\%$ ($50 \mu\text{M}$), $30.0 \pm 1.9\%$ ($100 \mu\text{M}$) dan $12.4 \pm 1.7\%$ ($200 \mu\text{M}$). IC_{50} bagi sel HCT116 dalam tempoh 72 jam selepas rawatan 5-FU adalah kira-kira $20 \mu\text{M}$ (Rajah 4.46).

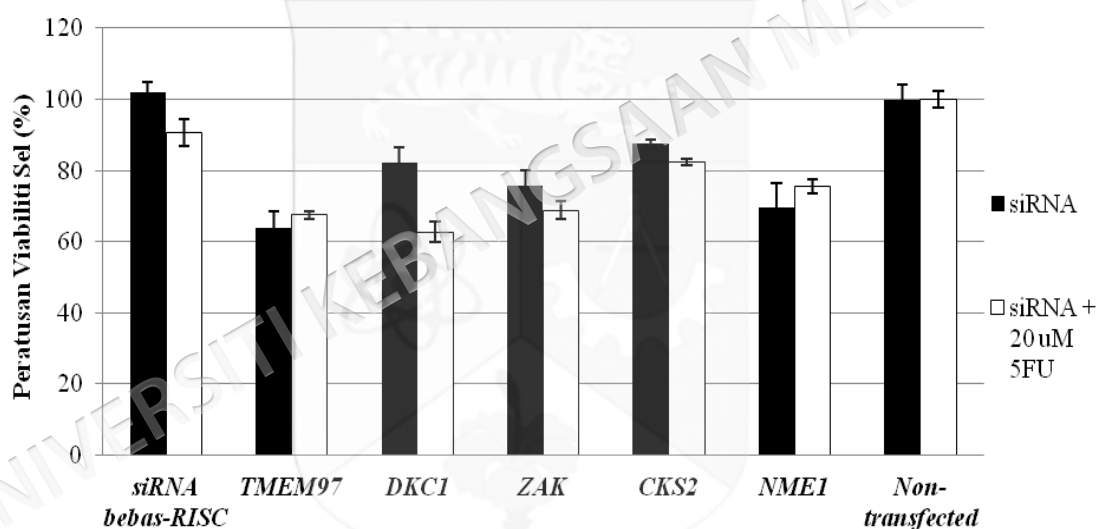


Rajah 4.46 Graf menunjukkan peratusan viabiliti titisan sel HCT116 selepas 24 jam, 48 jam dan 72 jam rawatan 5-FU. Anak panah bertitik menunjukkan IC_{50} pada titisan sel HCT116 selepas rawatan 5-FU. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.2.5 Viabiliti Titisan Sel HT-29 Selepas Transfeksi siRNA Spesifik Bagi Gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* Diikuti Dengan Rawatan 5-FU

Merujuk kepada Rajah 4.47, kawalan negatif titisan sel HT-29 selepas gabungan rawatan siRNA bebas-RISC diikuti 5-FU menunjukkan viabiliti sel sebanyak $90.8 \pm 3.7\%$. Titisan sel HT-29 yang ditransfeksi dengan siRNA *TMEM97* sahaja menunjukkan viabiliti sebanyak $63.6 \pm 5.0\%$. Rawatan gabungan siRNA *TMEM97* dan 5-FU pada titisan sel HT-29 tidak menurunkan viabiliti sel dengan signifikan berbanding transfeksi siRNA sahaja, dengan nilai viabiliti sel sebanyak $67.4 \pm 1.2\%$. Titisan sel HT-29 yang ditransfeksi dengan siRNA *DKC1* sahaja menunjukkan

viabiliti sel sebanyak $82.1 \pm 4.4\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *DKC1* diikuti 5-FU menurunkan lagi viabiliti sel HT-29 kepada $62.7 \pm 2.9\%$. Titisan sel HT-29 yang ditransfeksi dengan siRNA *ZAK* menunjukkan viabiliti sel sebanyak $75.7 \pm 4.3\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *ZAK* diikuti 5-FU menunjukkan viabiliti sel sebanyak $68.8 \pm 2.4\%$. Titisan sel HT-29 menunjukkan viabiliti sel sebanyak $87.5 \pm 1.0\%$ selepas transfeksi siRNA *CKS2* sahaja dan $82.4 \pm 0.81\%$ selepas rawatan gabungan siRNA *CKS2* dan 5-FU. Titisan sel HT-29 yang ditransfeksi dengan siRNA *NME1* sahaja menunjukkan viabiliti sel sebanyak $69.7 \pm 6.8\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *NME1* dan 5-FU menunjukkan viabiliti sel sebanyak $75.6 \pm 1.9\%$ (Rajah 4.47).



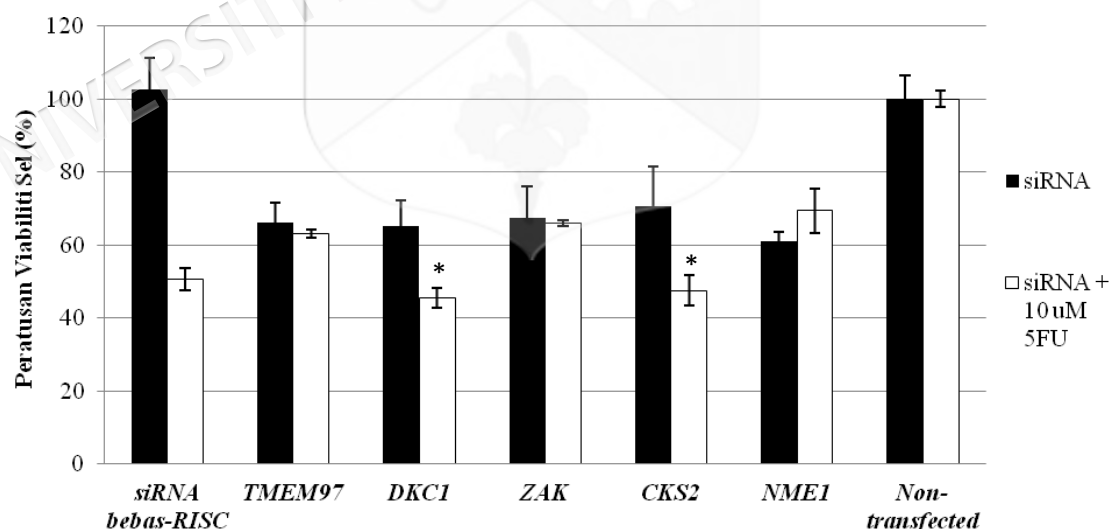
Rajah 4.47 Histogram menunjukkan peratusan viabiliti sel HT-29 bagi transfeksi siRNA 5 gen yang terpilih dan gabungan siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.2.6 Viabiliti Titisan Sel HCT116 Selepas Transfeksi siRNA Spesifik Bagi Gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* Diikuti Dengan Rawatan 5-FU

Peratusan viabiliti titisan sel HCT116 bagi kawalan negatif, siRNA bebas-RISC, ialah $102.6 \pm 8.7\%$ dan ia menurun sehingga $50.6 \pm 3.0\%$ secara signifikan selepas rawatan 5-FU. Daripada lima gen yang dikaji, hanya gen *DKC1* dan *CKS2* menunjukkan

kesan pengurangan viabiliti sel yang signifikan selepas gabungan rawatan siRNA spesifik dan 5-FU (Rajah 4.48). Titis sel HCT116 yang ditransfeksi dengan siRNA *DKC1* sahaja menunjukkan viabiliti sel sebanyak $65.1 \pm 7.2\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *DKC1* dan 5-FU menurunkan lagi viabiliti sel secara signifikan kepada $45.5 \pm 2.8\%$. Titis sel HCT116 yang ditransfeksi dengan siRNA *CKS2* sahaja menunjukkan viabiliti sel sebanyak $70.8 \pm 10.7\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *CKS2* dan 5-FU menurunkan lagi viabiliti sel secara signifikan kepada $47.5 \pm 4.2\%$.

Bagi tiga gen yang selebihnya, tiada perubahan peratusan viabiliti titisan sel HCT116 selepas gabungan rawatan siRNA dan 5-FU. Sel yang ditransfeksi dengan siRNA *TMEM97* menunjukkan viabiliti sel sebanyak $66.1 \pm 5.5\%$ manakala rawatan gabungan siRNA *TMEM97* dan 5-FU menunjukkan viabiliti sel sebanyak $63.1 \pm 1.2\%$. Bagi gen *ZAK*, viabiliti sel tidak berubah secara signifikan iaitu $67.4 \pm 8.5\%$ selepas transfeksi siRNA dan $65.9 \pm 0.84\%$ selepas rawatan gabungan siRNA *ZAK* dan 5-FU. Begitu juga dengan gen *NME1*, viabiliti sel tidak berubah secara signifikan iaitu daripada $61.1 \pm 2.5\%$ menjadi $69.4 \pm 6.1\%$ selepas rawatan yang sama dilakukan.



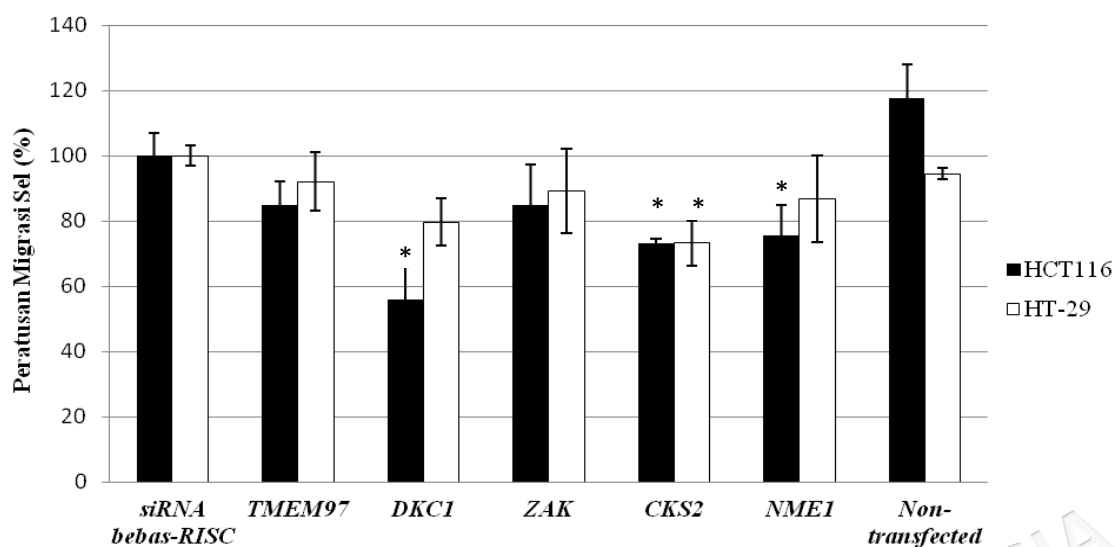
Rajah 4.48 Histogram menunjukkan peratusan viabiliti sel HCT116 bagi transfeksi siRNA lima gen yang terpilih dan gabungan siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan viabiliti sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.3 ASAI MIGRASI SEL

4.3.1 Kesan Penenyapan Gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* Atas Migrasi Titisan Sel HT-29 dan HCT116

Merujuk kepada Rajah 4.49, daripada lima gen yang dikaji, hanya satu gen, iaitu gen *CKS2*, menunjukkan penurunan migrasi sel yang signifikan selepas penenyapan gen dilakukan iaitu sebanyak $73.4 \pm 6.9\%$, dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA berbanding kawalan negatif pada titisan sel HT-29. Gen yang lain menunjukkan peratusan migrasi sel yang melebihi 80%. Peratusan migrasi titisan sel HT-29 selepas penenyapan gen *TMEM97* ialah $92.1 \pm 9.0\%$, gen *DKC1* adalah sebanyak $79.6 \pm 7.2\%$, gen *ZAK* ialah $89.3 \pm 12.9\%$ dan gen *NME1* adalah sebanyak $86.8 \pm 13.3\%$.

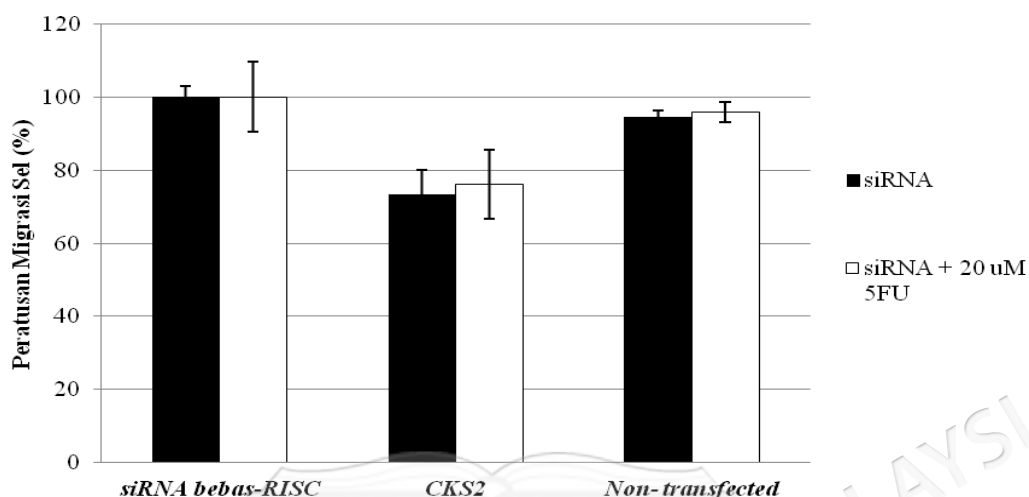
Bagi titisan sel HCT116, daripada lima gen yang dikaji, penenyapan gen *DKC1* menurunkan migrasi sel HCT116 secara signifikan dengan nilai $55.9 \pm 10.0\%$ manakala penenyapan gen *CKS2* adalah sebanyak $73.3 \pm 1.2\%$. Penenyapan gen *NME1* juga menurunkan migrasi sel secara signifikan dengan nilai $75.6 \pm 9.2\%$ pada titisan sel HCT116. Penenyapan gen *TMEM97* dan *ZAK* tidak menurunkan migrasi sel dengan signifikan selepas transfeksi siRNA berbanding kawalan negatif. Penenyapan gen *TMEM97* menunjukkan nilai $84.7 \pm 7.4\%$ manakala penenyapan gen *ZAK* menunjukkan nilai $85.0 \pm 12.4\%$ (Rajah 4.49).



Rajah 4.49 Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel bagi titisan sel HCT116 dan HT-29 selepas 48 jam tempoh transfeksi siRNA. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan migrasi sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.3.2 Kesan Gabungan Penenyapan Gen *CKS2* dan Rawatan 5-FU Atas Migrasi Titisan Sel HT-29

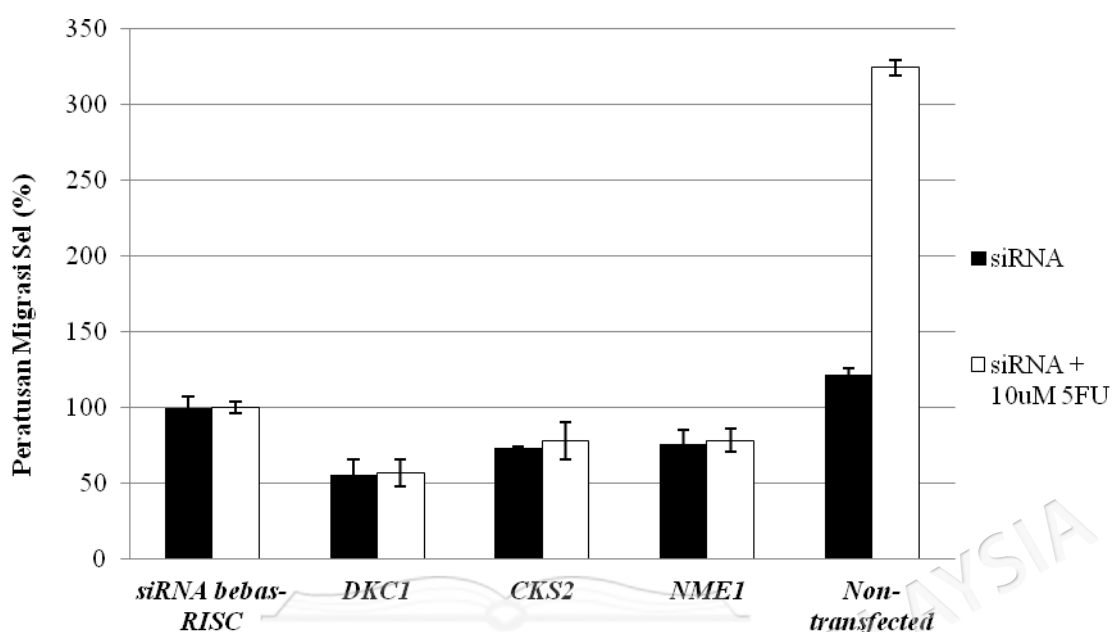
Gabungan rawatan siRNA dan 5-FU tidak menunjukkan kesan penurunan migrasi sel yang signifikan berbanding sel yang ditransfeksi dengan siRNA sahaja pada titisan sel HT-29 (Rajah 4.50). Peratusan migrasi sel selepas gabungan rawatan siRNA *CKS2* diikuti 5-FU ialah $76.2 \pm 9.4\%$, di mana peratusan migrasi sel selepas penenyapan gen *CKS2* tanpa rawatan 5-FU ialah $73.4 \pm 6.9\%$ pada titisan sel HT-29.



Rajah 4.50 Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel pada titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA dan gabungan transfeksi siRNA *CKS2* diikuti rawatan 5-FU. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan migrasi sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.3.3 Kesan Gabungan Penyenyapan Gen *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* Diikuti Rawatan 5-FU Atas Migrasi Titisan Sel HCT116

Merujuk kepada Rajah 4.51, gabungan transfeksi bagi gen siRNA *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* diikuti rawatan 5-FU tidak menunjukkan pengurangan migrasi sel yang signifikan pada titisan sel HCT116 berbanding sel transfeksi siRNA sahaja. Penyenyapan gen *DKC1* menunjukkan migrasi sel sebanyak $55.9 \pm 10.0\%$ manakala gabungan transfeksi siRNA diikuti rawatan 5-FU menunjukkan migrasi sel sebanyak $57.1 \pm 8.8\%$. Penyenyapan gen *CKS2* menunjukkan penurunan migrasi sel sebanyak $73.3 \pm 1.2\%$ manakala gabungan transfeksi siRNA diikuti rawatan bagi gen *CKS2* ialah $78.2 \pm 12.5\%$ pada titisan sel HCT116. Penyenyapan gen *NME1* menurunkan migrasi sel HCT116 sebanyak $75.6 \pm 9.2\%$ dan gabungan transfeksi siRNA *NME1* diikuti rawatan 5-FU ialah $78.4 \pm 7.6\%$.



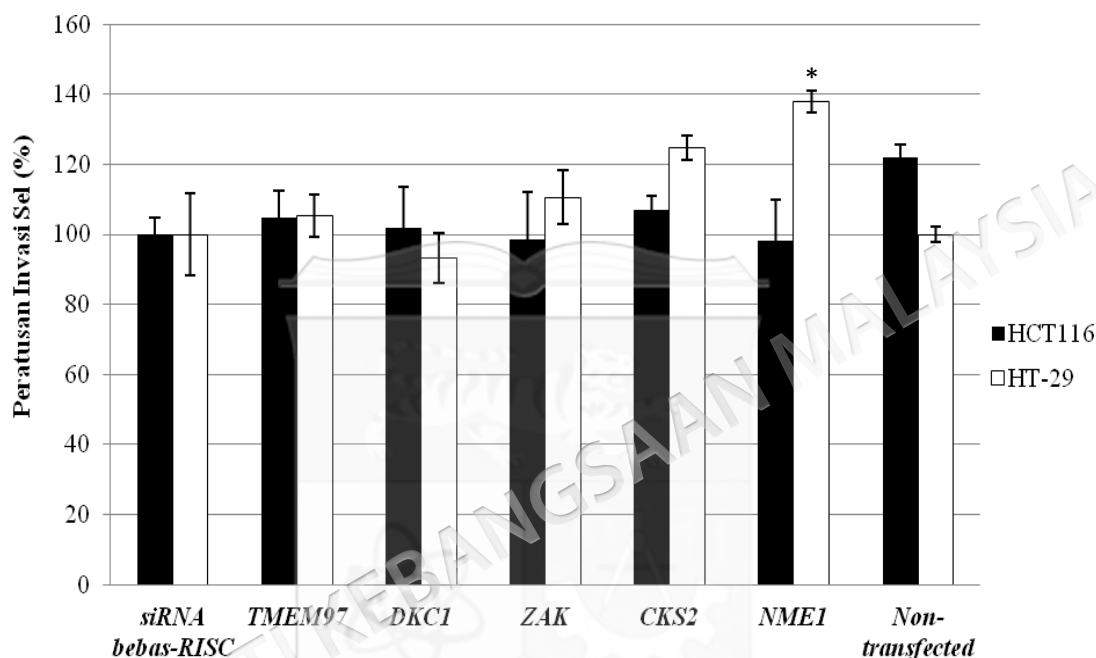
Rajah 4.51 Histogram menunjukkan peratusan migrasi sel pada titisan sel HCT116 selepas transfeksi siRNA *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* dan gabungan transfeksi siRNA spesifik diikuti rawatan 5-FU. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan migrasi sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.4 ASAI INVASI SEL

4.4.1 Kesan Penyenyapan Gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* Atas Invasi Titisan Sel HT-29 dan HCT116

Pada titisan sel HT-29, penyenyapan gen *NME1* tidak menurun malah meningkatkan invasi sel HT-29 dengan signifikan, iaitu sebanyak $137.8 \pm 3.1\%$, berbanding kawalan negatif. Tiada penurunan invasi sel yang signifikan pada titisan sel HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA bagi gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, dan *CKS2*. Penyenyapan gen *TMEM97* menunjukkan peratusan invasi sel sebanyak $105.3 \pm 6.2\%$ dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Penyenyapan gen *DKC1* menunjukkan peratusan invasi sel sebanyak $93.1 \pm 7.1\%$ manakala penyenyapan gen *ZAK* menunjukkan peratusan invasi sel sebanyak $110.5 \pm 7.7\%$ selepas transfeksi siRNA. Peratusan invasi sel selepas penyenyapan gen *CKS2* ialah $124.6 \pm 3.5\%$.

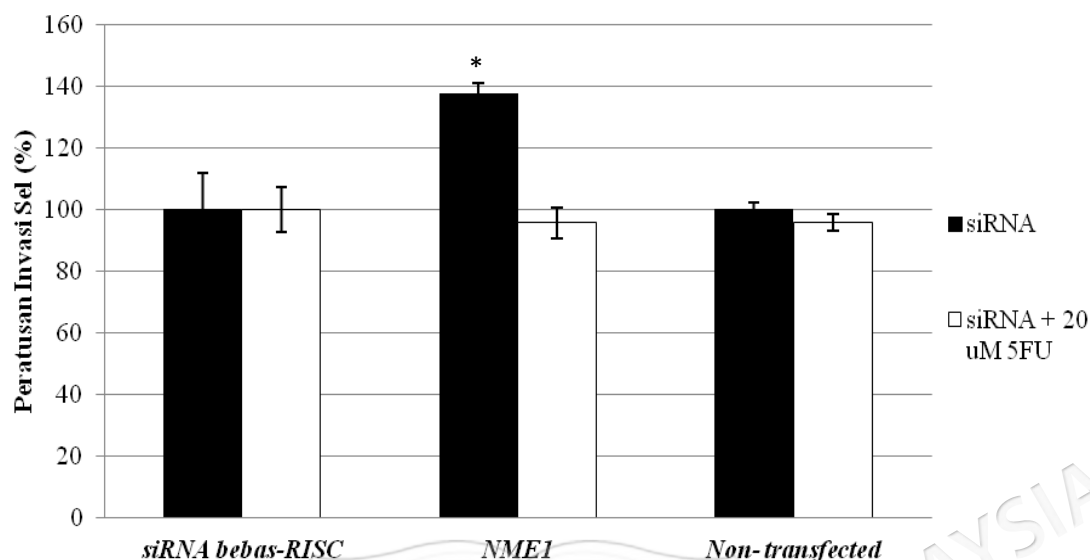
Transfeksi siRNA bagi gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* pada titisan sel HCT116 tidak menunjukkan perubahan yang signifikan dalam invasi sel. Nilai peratusan invasi sel HCT116 selepas penyenyapan gen-gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* adalah seperti berikut: $104.7 \pm 7.7\%$, $102 \pm 11.7\%$, $98.4 \pm 13.5\%$, $107.1 \pm 3.9\%$ dan $98.3 \pm 11.4\%$ (Rajah 4.52).



Rajah 4.52 Histogram menunjukkan peratusan invasi sel pada titisan sel HCT116 dan HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan invasi sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.4.2 Kesan Gabungan Penyenyapan Gen *NME1* Diikuti Rawatan 5-FU Atas Invasi Titisan Sel HT-29

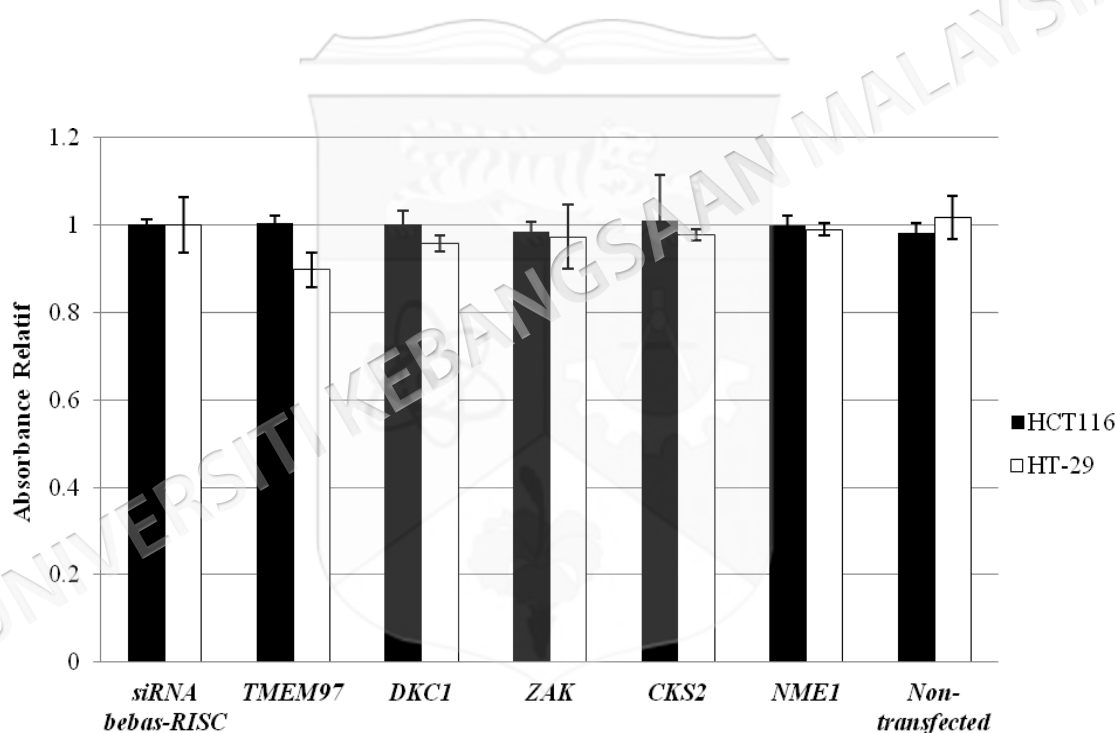
Penyenyapan gen *NME1* sahaja meningkatkan invasi sel HT-29 dengan signifikan, iaitu $137.8 \pm 3.1\%$. Gabungan penyenyapan gen *NME1* diikuti rawatan 5-FU tidak menurunkan invasi sel HT-29 dengan signifikan, dengan nilai $95.7 \pm 4.9\%$ berbanding kawalan negatif, siRNA bebas-RISC (Rajah 4.53).



Rajah 4.53 Histogram menunjukkan peratusan invasi titisan sel HT-29 selepas transfeksi siRNA *NME1* dan gabungan transfeksi siRNA *NME1* diikuti rawatan 5-FU. Sel transfeksi siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan invasi sel $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.5 APOPTOSIS TITISAN SEL HCT116 DAN HT-29 SELEPAS TRANSFEKSI siRNA

Merujuk kepada Rajah 4.54, titisan sel HCT116 dan HT-29 tidak menunjukkan perubahan *absorbance Caspase 3* relatif yang signifikan selepas 48 jam transfeksi siRNA. Nilai *absorbance* relatif selepas penyenyapan gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* pada titisan sel HCT116 adalah berikut: 1.0 ± 0.02 , 1.0 ± 0.03 , 0.98 ± 0.02 , 1.0 ± 0.1 dan 1.0 ± 0.03 . Bagi titisan sel HT-29, nilai *absorbance* relative bagi penyenyapan gen *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1* adalah berikut: 0.90 ± 0.04 , 0.96 ± 0.02 , 0.97 ± 0.07 , 0.98 ± 0.01 dan 0.99 ± 0.02 (Rajah 4.54).



Rajah 4.54 Histogram menunjukkan *absorbance* relatif *Caspase 3* bagi titisan sel HCT116 dan HT-29 dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA. Data yang ditunjukkan adalah purata nilai *absorbance* relatif $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

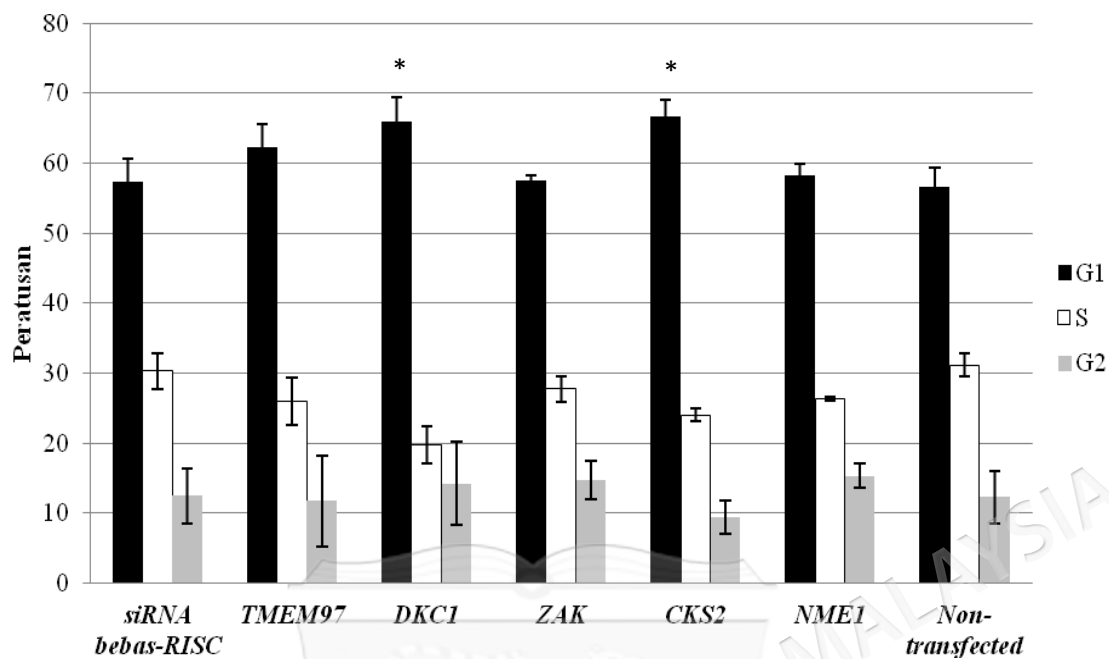
4.6 ANALISIS KITARAN SEL

4.6.1 Analisis Kitaran Sel HCT116 Selepas Penyenyapan Gen *DKC1*, *CKS2*, *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1*

Bagi titisan sel HCT116, penyenyapan gen *DKC1* meningkatkan peratusan fasa G1 kepada $66.0 \pm 3.4\%$ secara signifikan berbanding sel kawalan negatif. Sel kawalan negatif, siRNA bebas RISC, memberikan peratusan fasa G1 sebanyak $57.3 \pm 3.3\%$ dan sel *non-transfected* memberikan nilai sebanyak $56.6 \pm 2.7\%$. Peratusan fasa S dalam sel yang ditransfeksi oleh siRNA *DKC1* ialah $19.8 \pm 2.7\%$. Sel kawalan negatif dan sel *non-transfected* pula memberikan peratusan fasa S sebanyak $30.3 \pm 2.5\%$ dan $31.2 \pm 1.6\%$. Peratusan G2 bagi sel yang ditransfeksi oleh siRNA *DKC1* ialah $14.2 \pm 5.9\%$ di mana sel kawalan negatif dan sel *non-transfected* pula memberikan peratusan fasa G2 sebanyak $12.4 \pm 3.9\%$ dan $12.3 \pm 3.7\%$.

Selain itu, penyenyapan gen *CKS2* meningkatkan peratusan fasa G1 dengan signifikan, iaitu sebanyak $66.6 \pm 2.6\%$, berbanding sel kawalan negatif, iaitu $57.3 \pm 3.3\%$. Peratusan fasa S dalam sel selepas transfeksi siRNA *CKS2* ialah $24.0 \pm 0.9\%$ di mana sel kawalan negatif ialah $30.3 \pm 2.5\%$. Peratusan G2 bagi sel yang ditransfeksi oleh siRNA *CKS2* ialah $9.4 \pm 2.4\%$ dan $12.4 \pm 3.9\%$ dalam sel kawalan negatif.

Daripada Rajah 4.55, penyenyapan gen *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1* tidak menunjukkan kesan perubahan yang signifikan dalam kitaran sel HCT116 selepas transfeksi siRNA. Peratusan fasa G1 bagi siRNA *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1* adalah berikut: $62.4 \pm 3.2\%$, $57.5 \pm 0.85\%$ dan $58.3 \pm 2.7\%$ manakala peratusan fasa S bagi siRNA *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1* adalah berikut: $25.9 \pm 3.4\%$, $27.7 \pm 1.9\%$ dan $26.4 \pm 0.24\%$. Peratusan fasa G2 bagi siRNA *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1* adalah berikut: $11.7 \pm 6.4\%$, $14.8 \pm 2.7\%$ dan $15.4 \pm 1.8\%$.

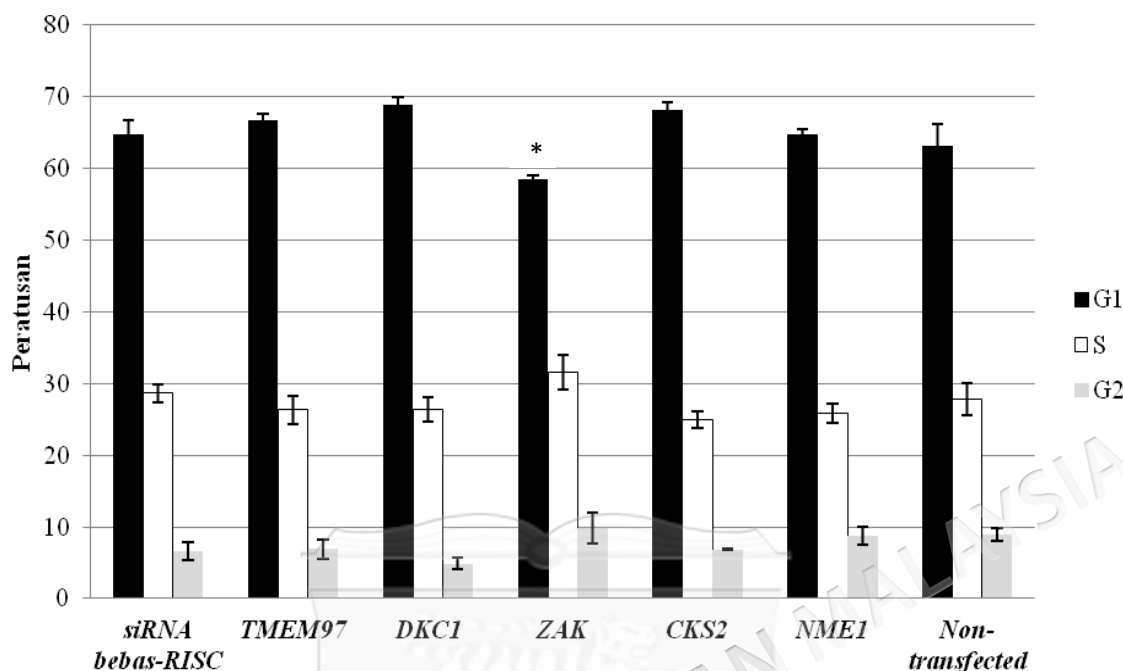


Rajah 4.55 Histogram menunjukkan peratusan populasi kitaran sel HCT116 selepas transfeksi siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1*. Sel siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.6.2 Analisis Kitaran Sel HT-29 Selepas Penenyapan Gen *DKC1*, *CKS2*, *TMEM97*, *ZAK*, dan *NME1*

Bagi titisan sel HT-29, tiada penahanan kitaran sel yang signifikan diperhatikan dalam tempoh 48 jam selepas transfeksi siRNA bagi gen yang terpilih (Rajah 4.56). Penenyapan gen *ZAK* tidak meningkatkan peratusan fasa kitaran sel malah ia mengurangkan peratusan fasa G1 iaitu $58.5 \pm 0.51\%$ dengan signifikan berbanding sel kawalan negatif, siRNA bebas RISC, dan *non-transfected*, iaitu $64.8 \pm 2.0\%$ dan $63.2 \pm 3.0\%$. Peratusan fasa S dalam sel yang ditransfeksi oleh siRNA *ZAK* ialah $31.6 \pm 2.4\%$ manakala sel kawalan negatif dan *non-transfected* memberikan peratusan fasa S sebanyak $28.6 \pm 1.3\%$ dan $27.8 \pm 2.3\%$. Peratusan G2 bagi sel yang ditransfeksi oleh siRNA *ZAK* ialah $9.9 \pm 2.1\%$ manakala sel kawalan negatif dan *non-transfected* memberikan peratusan fasa G2 sebanyak $6.6 \pm 1.2\%$ dan $8.8 \pm 0.9\%$.

Penenyapan gen *TMEM97*, *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* pula tidak menunjukkan kesan yang signifikan dalam kitaran sel HT-29 selepas transfeksi siRNA. Peratusan fasa G1 bagi siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* adalah berikut: $66.8 \pm 0.9\%$, $68.8 \pm 1.1\%$, $68.2 \pm 1.1\%$ dan $64.9 \pm 0.63\%$ manakala peratusan fasa S bagi siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* adalah berikut: $26.3 \pm 1.9\%$, $26.3 \pm 1.7\%$, $25.0 \pm 1.2\%$ dan $25.8 \pm 1.4\%$. Peratusan fasa G2 selepas transfeksi siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *CKS2* dan *NME1* adalah berikut: $6.9 \pm 1.4\%$, $4.8 \pm 0.8\%$, $6.9 \pm 0.1\%$ dan $8.7 \pm 1.3\%$.

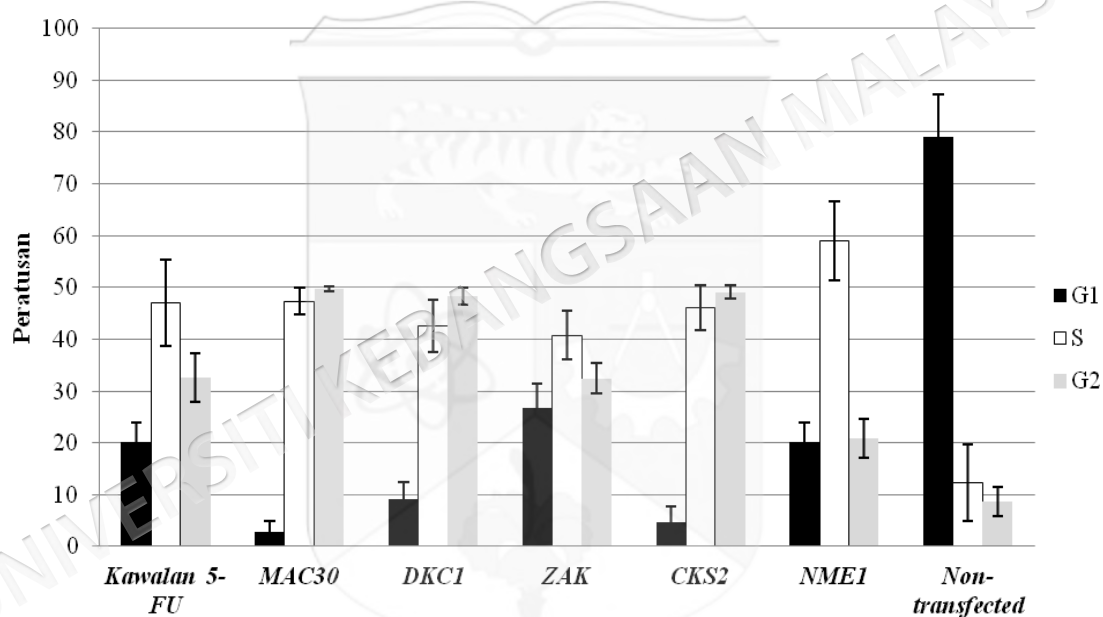


Rajah 4.56 Histogram menunjukkan peratusan populasi kitaran sel HT-29 selepas transfeksi siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *ZAK*, *CKS2* dan *NME1*. Sel siRNA bebas-RISC bertindak sebagai kawalan negatif. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza (* $P < 0.05$).

4.6.3 Analisis Kitaran Sel HCT116 Selepas Gabungan Penyenyapan Gen Dan Rawatan 5-FU

Sel kawalan 5-FU menunjukkan peratusan fasa S dan fasa G2 yang tinggi selepas 48 jam rawatan 5-FU, dengan fasa S sebanyak $47.0 \pm 8.4\%$ dan fasa G2 sebanyak $32.7 \pm 4.7\%$ pada titisan sel HCT116. Peratusan fasa G1 bagi kawalan 5-FU ialah $20.3 \pm 3.7\%$ dalam tempoh 48 jam selepas rawatan 5-FU pada titisan sel HCT116. Peratusan fasa S dan G2 titisan sel HCT116 meningkat dalam gabungan sel yang dirawat dengan siRNA dan 5-FU. Titisan sel HCT116 yang dirawat dengan siRNA *TMEM97* diikuti 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak $2.9 \pm 2.1\%$, fasa S sebanyak $47.3 \pm 2.6\%$ dan fasa G2 sebanyak 49.8 ± 0.5 . Titisan sel HCT116 yang dirawat dengan siRNA *DKC1* diikuti 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak $9.1 \pm 3.4\%$, fasa S sebanyak $42.6 \pm 5.1\%$ dan fasa G2 sebanyak $48.3 \pm 1.7\%$.

Gabungan rawatan siRNA *ZAK* dan 5-FU pula memberi peratusan fasa G1 sebanyak $26.8 \pm 4.6\%$, fasa S sebanyak $40.8 \pm 4.7\%$ dan fasa G2 sebanyak $32.5 \pm 2.9\%$ manakala gabungan rawatan siRNA *CKS2* dan 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak 4.8 ± 3.0 , fasa S sebanyak $46.2 \pm 4.3\%$ dan fasa G2 sebanyak $49.1 \pm 1.3\%$ pada titisan sel HCT116. Sel HCT116 yang dirawat dengan siRNA *NME1* diikuti 5-FU pula memberi peratusan fasa G1 sebanyak $20.1 \pm 3.8\%$, fasa S sebanyak $59.0 \pm 7.6\%$ dan fasa G2 sebanyak $20.9 \pm 3.7\%$. Bagi titisan sel HCT116 tanpa rawatan 5-FU dan siRNA, peratusan fasa G1 ialah sebanyak $79.0 \pm 8.2\%$, fasa S sebanyak $12.4 \pm 7.4\%$ dan fasa G2 sebanyak $8.7 \pm 2.7\%$.

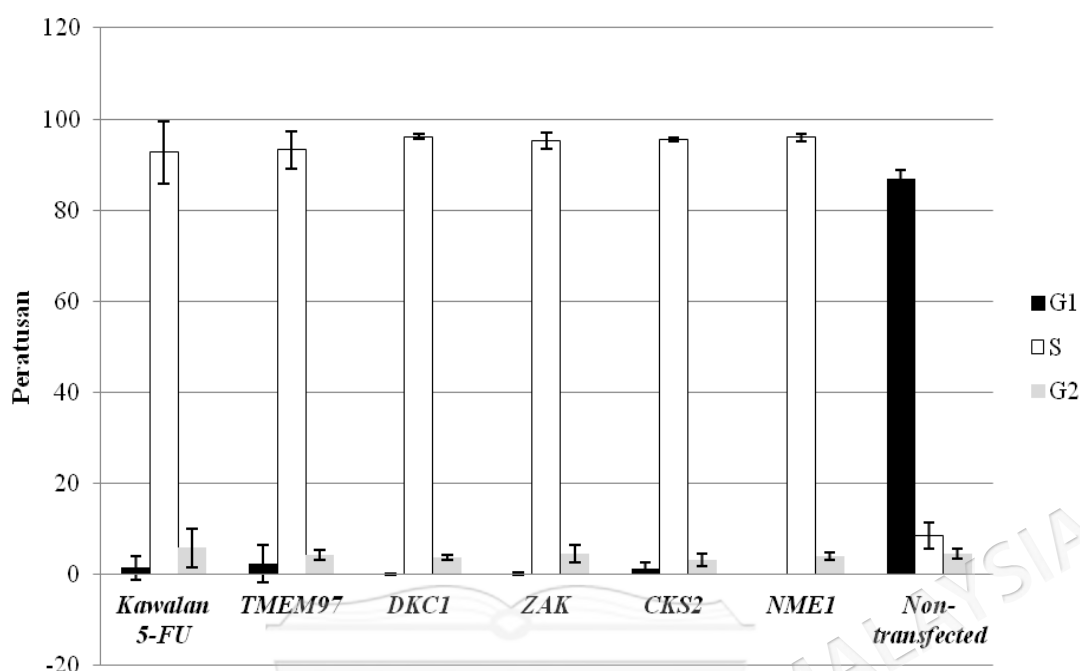


Rajah 4.57 Histogram menunjukkan peratusan populasi sel HCT116 dalam kitaran sel selepas gabungan rawatan siRNA dan 5-FU. Kawalan 5-FU merujuk kepada sel yang dirawat dengan 5-FU sahaja. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.6.4 Analisis Kitaran Sel HT-29 Selepas Gabungan Penyenyapan Gen Dan Rawatan 5-FU

Kawalan 5-FU bagi titisan sel HT-29 menunjukkan peratusan fasa G1 sebanyak $1.5 \pm 2.6\%$, fasa S sebanyak $92.7 \pm 6.8\%$ dan fasa G2 sebanyak $5.8 \pm 4.2\%$ dalam tempoh 48 jam selepas rawatan 5-FU. Peratusan fasa S titisan sel HCT116 juga meningkat selepas gabungan rawatan 5-FU dan siRNA. Titisan sel HT-29 yang dirawat dengan siRNA *TMEM97* dan 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak 2.4 ± 4.2 , fasa S sebanyak $93.3 \pm 4.1\%$ dan fasa G2 sebanyak $4.3 \pm 1.1\%$. Titisan sel HT-29 yang dirawat dengan siRNA *DKC1* dan 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak $0.03 \pm 0.04 \%$, fasa S sebanyak $96.2 \pm 0.6\%$ dan fasa G2 sebanyak $3.8 \pm 0.6\%$.

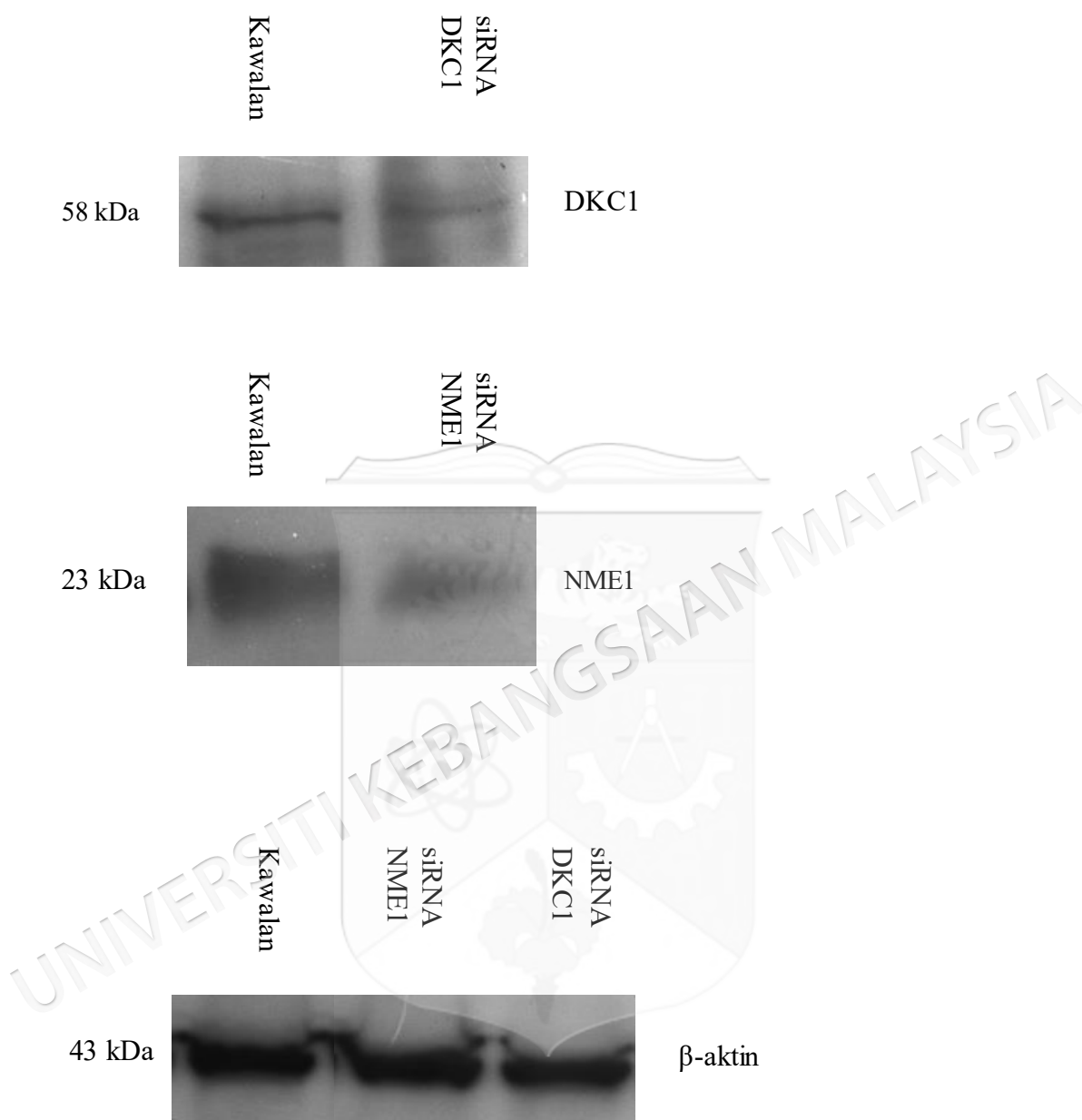
Gabungan siRNA *ZAK* dan 5-FU dalam sel HT-29 pula memberi peratusan fasa G1 sebanyak $0.2 \pm 0.3\%$, fasa S sebanyak $95.3 \pm 1.8\%$ dan fasa G2 sebanyak $4.5 \pm 1.9\%$ manakala sel yang dirawat dengan siRNA *CKS2* dan 5-FU memberi peratusan fasa G1 sebanyak $1.4 \pm 1.2\%$, fasa S sebanyak $95.5 \pm 0.5\%$ dan fasa G2 sebanyak $3.1 \pm 1.3\%$. Gabungan siRNA *NME1* dan 5-FU dalam titisan sel HT-29 pula menunjukkan peratusan fasa G1 sebanyak 0% , fasa S sebanyak $95.9 \pm 0.8\%$ dan fasa G2 sebanyak $4.0 \pm 0.8\%$ (Rajah 4.58).



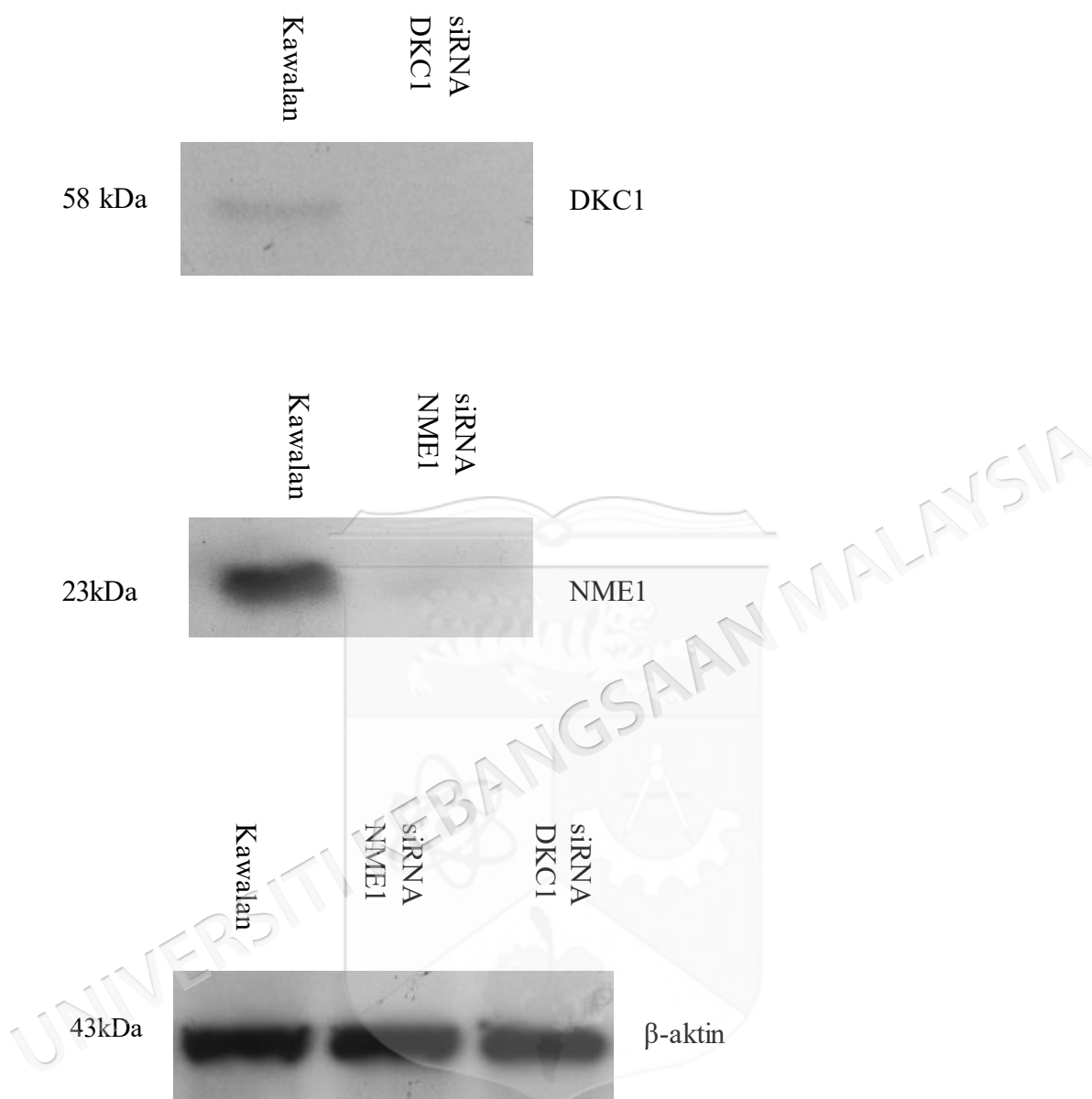
Rajah 4.58 Histogram menunjukkan peratusan populasi sel HT-29 dalam kitaran sel selepas gabungan rawatan siRNA dan 5-FU. Kawalan 5-FU merujuk kepada sel yang dirawat dengan 5-FU sahaja. Data yang ditunjukkan adalah purata peratusan $\pm$ sisihan piawai bagi tiga eksperimen berbeza.

4.7 PENGEKSPRESAN PROTEIN DKC1 DAN NME1 DALAM TITISAN SEL HT-29 DAN HCT116 SELEPAS TRANSFEKSI siRNA

Hanya dua protein berjaya didemonstrasikan dalam blot Western, iaitu protein DKC1 dan NME1, dalam titisan sel HT-29 dan HCT116 dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA. DKC1 dan NME1 menunjukkan pengurangan pengekspressan protein berbanding kawalan dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA. Jalur protein TMEM97, ZAK dan CKS2 tidak dapat dikesan dalam kedua-dua sampel kawalan dan sampel transfeksi siRNA dalam eksperimen ini (data tidak ditunjukkan).



Rajah 4.59 Gambar menunjukkan pengurangan pengekspresan protein DKC1 dan NME1 dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HT-29, di mana protein beta-aktin bertindak sebagai kawalan dalaman.



Rajah 4.60 Gambar menunjukkan pengurangan pengekspresan protein DKC1 dan NME1 dalam tempoh 72 jam selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HCT116, di mana protein beta-aktin bertindak sebagai kawalan dalaman.

BAB V

PERBINCANGAN

Gen-gen yang mempunyai perubahan pengekspresan berlainan dalam sampel kanser kolorektal berbanding sampel normal dikaji untuk mengenalpasti penanda diagnostik atau prognostik baru yang berpotensi (Bertucci et al. 2004). Untuk mengkaji gen yang terlibat dalam patogenesis kanser kolorektal, satu senarai gen diperolehi daripada analisis meta yang menggunakan data mikroatur terdahulu (Alon et al. 1999; Notterman et al. 2001; Kaiser et al. 2007; Ki et al. 2007). Dua puluh gen berpengekspresan tinggi yang terlibat dalam regulasi kitaran sel telah dipilih untuk kajian siRNA, iaitu *CDK4*, *TOP2A*, *NME1*, *RAN*, *PCNA*, *CSE1L/CAS*, *ENO1*, *GTF3A*, *POLR1D*, *TMEM97*, *ZAK*, *CDC25B*, *TPX2*, *MYBL2*, *CKS2*, *MCM7*, *S100A11*, *RRM1*, *ODC1* dan *DKC1*.

Dua jenis gred bagi titisan sel kolorektal telah dipilih dalam kajian ini. HCT116 ialah titisan sel gred 3 yang membahagi secara lemah manakala HT-29 ialah titisan sel gred 2 yang membahagi secara sederhana (Flatmark et al. 2004). Di antara 20 gen yang dikaji, lima gen termasuk gen *TMEM97*, *DKC1*, *NME1*, *ZAK*, dan *CKS2* menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan ($P < 0.05$) selepas 48 jam transfeksi siRNA berbanding sampel tanpa siRNA bagi titisan sel HCT116 dan titisan sel HT-29. Kajian asai fungsi sel dilakukan ke atas lima gen yang terpilih selepas penyenyapan gen.

Thesis ini seterusnya membincangkan keputusan asai tersebut untuk setiap satu gen yang terpilih. Viabiliti sel dengan gen *TMEM97* yang disenyapkan menurun dalam kedua-dua titisan sel HCT116 dan HT-29 selepas 48 jam transfeksi siRNA. Keputusan ini adalah konsisten dengan kajian terdahulu yang menunjukkan bahawa gen *TMEM97* terlibat dalam aktiviti *insulin-like growth factor* (IGF) yang mempengaruhi pembahagian sel (LeRoith & Roberts 2003). *TMEM97*, juga dikenali sebagai MAC30, adalah keluarga protein IGF (Yan et al. 2010). IGF memainkan peranan yang penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tisu, terutamanya pertumbuhan pranal (LeRoith & Roberts 2003) serta dalam tumorigenesis (Khandwala et al. 2000). Kajian terdahulu menunjukkan bahawa aras IGF-I yang tinggi dalam badan meningkatkan faktor risiko kanser payudara dalam golongan wanita *premenopausal* (Hankinson et al. 1998), prostat (Wolk et al. 1998), kolorektal (Palmqvist et al. 2002) dan paru-paru (Yu et al. 1999). Murphy et al melaporkan bahawa gen tersebut terlibat dalam mekanisme pengawalan pertumbuhan dan pembezaan sel (Murphy et al. 1993).

Gen *TMEM97* berkemungkinan tidak terlibat dalam proses apoptosis dalam titisan sel HT-29 dan HCT116 berdasarkan keputusan negatif pada asai *caspase 3*. Begitu juga keputusan negatif diperolehi daripada asai migrasi dan invasi sel di mana motiliti sel HT-29 dan HCT116 tidak berubah dengan signifikan selepas penyenyapan gen *TMEM97*. Setakat ini, tiada kajian menunjukkan penyenyapan *TMEM97* memberi kesan terhadap motiliti sel di dalam titisan sel kolorektal. Akan tetapi, terdapat kajian yang berjaya menunjukkan bahawa siRNA *TMEM97* menghalang migrasi dan invasi sel glioma (Qiu et al. 2015) dan sel kanser gastrik manusia (Xu et

al. 2014). Keputusan motiliti sel selepas penyenyapan siRNA *TMEM97* adalah berlainan dalam jenis kanser sel yang berlainan.

Penyenyapan gen *TMEM97* juga tidak menyekat kitaran sel titisan sel HT-29 dan HCT116 dengan signifikan. Kajian tedahulu menunjukkan bahawa siRNA *TMEM97* menyekat peralihan G1/S dalam sel glioma, U87 dan U373, (Qiu et al. 2015) serta menyekat peralihan G2/M dalam sel gastrik (Xu et al. 2014). Akan tetapi, tiada kajian yang menunjukkan kesan siRNA *TMEM97* ke atas kitaran sel dalam sel kolorektal. Keputusan kitaran sel selepas penyenyapan siRNA *TMEM97* adalah berlainan dalam jenis kanser sel yang berlainan. Sebagai contoh, terdapat kajian tedahulu menunjukkan penyenyapan gen *LAP2 β* (*lamina-associated polypeptides 2 β*) mengganggu pembahagian sel kanser pankreas, MIA-PaCa2 dan PANC1, dengan 74% dan 46% masing-masing berbanding sel kawalan (Kim et al. 2012). Penyenyapan gen tersebut tidak mengganggu pembahagian sel kanser lain seperti gastrik (SNU216, SNU638), sel *cholangiocarcinoma* (SNU1079, HuCCT1) dan sel hepatokarsinoma (Huh7, HepG2) (Kim et al. 2012).

Gen kedua yang menunjukkan penurunan pengekspresan gen dan protein selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HT-29 dan HCT116 ialah gen *DKC1*. Penyenyapan gen *DKC1* mengurangkan viabiliti titisan sel HT-29 dan HCT116 secara signifikan berbanding sel kawalan selepas 48 jam transfeksi siRNA. *DKC1* terlibat di dalam biosintesis protein di mana ia memberi kesan utama terhadap perkembangan dan viabiliti sel kanser prostat (Sieron et al. 2009). Dalam kajian tersebut, penyenyapan *DKC1* oleh siRNA mengakibatkan kerencatan pembahagian

sel, penurunan saiz sel dan ketidakupayaan sel untuk melekat semula selepas *trypsinisation* (Sieron et al. 2009).

Gen *DKC1* berkemungkinan tidak terlibat dalam proses apoptosis berdasarkan keputusan negatif pada asai *caspase 3* dalam titisan sel HT-29 dan HCT116. Tiada kajian yang menunjukkan kesan siRNA *DKC1* ke atas apoptosis sel dalam sel kolorektal. Kajian terdahulu menunjukkan penenyapan gen *DKC1* tidak menyebabkan kejadian apoptosis dalam sel kanser prostat (Sieron et al. 2009) dan kanser serviks (Alawi & Lin 2013).

Gen *DKC1* terlibat dalam proses migrasi sel berdasarkan peratusan migrasi titisan sel HCT116. Tiada data dilaporkan mengenai peranan *DKC1* dalam proses migrasi sel selepas penenyapan gen. Oleh itu, ini merupakan penemuan baru mengenai peranan *DKC1* dalam migrasi sel. Sebaliknya, penenyapan gen *DKC1* tidak menjejaskan migrasi sel HT-29 (Ting et al. 2015).

Gen *DKC1* berkemungkinan tidak terlibat dalam proses invasi sel berikutan keputusan negatif dalam asai invasi sel bagi kedua-dua titisan sel HT-29 dan HCT116. Setakat ini, peranan *DKC1* dalam invasi sel masih tidak jelas.

Penenyapan gen *DKC1* meningkatkan peratusan fasa G1 dalam kitaran sel HCT116 tetapi tidak menunjuk kesan signifikan dalam kitaran sel HT-29. Dyskerin, protein *DKC1*, merupakan komponen yang penting dalam kompleks ribonukleoprotein telomerase yang diperlukan untuk aktiviti telomerase normal dan penyelenggaraan telomere (Mitchell et al. 1999; Cohen et al. 2007). *DKC1* terlibat

dalam pembahagian sel (Alawi et al. 2011). Setakat ini, peranan *DKC1* dalam kitaran sel kanser kolorektal masih belum dilaporkan. Kajian ke atas model *in-vitro* kanser serviks menunjukkan pengurangan protein dyskerin mengganggu pembentukan *mitotic spindle* dan melambatkan proses mitosis dengan pengumpulan G2/M dalam kitaran sel (Alawi & Lin 2013).

Gen ketiga yang menunjukkan penurunan pengekspresan mRNA dan protein selepas transfeksi siRNA dalam sel HT-29 dan HCT116 ialah *NME1*. Gen *NME1* ialah gen penindas metastasis utama yang mengekod protein NME1 atau nukleosida difosfat kinase A (*NDPK-A*) (Lee et al. 2009).

Penyenyapan gen *NME1* mengurangkan viabiliti sel secara signifikan dalam sel HT-29 dan HCT116. Peranan *NME1* dalam viabiliti sel kolorektal masih belum dilaporkan dalam kajian lain. Kajian terdahulu melaporkan penyenyapan gen *NME1* meningkatkan viabiliti atau proliferasi sel dalam sel stroma endometrium (ESC) (Li et al. 2013). Kajian lain juga menunjukkan penyenyapan gen *NME1* dalam titisan sel HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) manusia, SAS, tidak memberi kesan yang signifikan terhadap viabiliti sel (Wang et al. 2014). Ini menunjukkan bahawa titisan sel yang berlainan memberi keputusan viabiliti sel yang berbeza selepas penyenyapan gen *NME1*. Data mengenai pengekspresan *NME1* adalah konflik dalam kanser kolorektal. Beberapa kajian mengenai pengekspresan *NME1* telah menunjukkan bahawa terdapat: 1) korelasi songsang dengan peringkat tumor dan perebakan metastatik (Lin et al. 2011) atau 2) tidak mempunyai korelasi (Qian et al. 2012) dan 3) malah mempunyai korelasi positif dengan keagresifan (Brenner et al. 2003).

Penyenyapan gen *NME1* tidak memberi kesan yang signifikan dalam peningkatan aktiviti *caspase 3* dalam kedua-dua titisan sel kanser kolorektal. Kajian terdahulu melaporkan bahawa *NME1* mengaktifkan *p53* untuk mengawal pembahagian sel dan kejadian apoptosis (Lombardi 2006). Ada kajian yang menunjukkan bahawa gen ini berinteraksi dengan *migration inhibitory factor (MIF)* untuk menurunkan aktiviti *p53-induced* apoptosis dan sekatan kitaran sel dalam sel kanser payudara, MCF7 (Jung et al. 2008). Kajian apoptosis melalui asai *caspase 3* dalam kanser kolorektal selepas penyenyapan gen *NME1* masih belum pernah dilaporkan.

Penyenyapan gen *NME1* mengurangkan migrasi titisan sel HCT 116. Setakat ini, tiada kajian penyenyapan gen *NME1* dilakukan ke atas sel kanser kolorektal. Kajian terdahulu mengkaji fungsi *NME1* dalam sel kanser kolorektal adalah dengan menggunakan asai transfeksi cDNA *NME1* (Suzuki et al. 2004). Keputusan transfeksi cDNA *NME1* dalam sel HT-29 menunjukkan penyekatan migrasi sel *in vitro* dan penyekatan metastasis hati sel HT-29 dalam tikus (Suzuki et al. 2004). Penyenyapan gen *NME1* dalam kajian ini tidak memberi kesan yang signifikan ke atas migrasi sel HT-29.

Penyenyapan gen *NME1* tidak mempengaruhi migrasi sel HT-29 tetapi meningkatkan invasi titisan sel HT-29 dalam kajian ini. Gen *NME1* bertindak sebagai gen penindas metastasis di dalam badan dan ia memainkan peranan utama dalam metastasis tumor melalui pelbagai laluan (Xie et al. 2010). Sebagai contoh, *NME1* terlibat dalam *cell adhesion-related signalling pathway* untuk menghalang invasi sel

tumor dan metastasis dengan meningkatkan pengekspresan protein β -catenin, E-cadherin dan CD44 di dalam sel *fibrosarcoma* manusia (Kim & Kim 2006). Kajian terdahulu melaporkan penyenyapan *NME1* menggalakkan invasi sel plasenta, BeWo (Xie et al. 2010). Kajian terdahulu juga melaporkan penyenyapan gen *NME1* meningkatkan invasi sel dalam sel stroma endometrium (ESC) melalui pengaktifan laluan signal *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) / *extracellular signal-regulated kinases* (ERK 1/2) dan Akt (Li et al. 2013). Walau bagaimanapun, tiada perubahan signifikan ke atas invasi sel HCT116 selepas penyenyapan gen *NME1*.

Perbezaan antara titisan sel HCT116 dan HT-29 ialah sel HCT116 mengandungi mutasi pada 13 kodon dalam gen *KRAS* manakala sel HT-29 mengandungi *KRAS* jenis liar (Ahmed et al. 2013). *KRAS* mutan menjejaskan aktiviti intrinsik GTPase, menyebabkan pengumpulan *guanosine triphosphate* (GTP) aktif dan mengaktifkan laluan isyarat *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Tan & Du 2012). EGFR memainkan peranan penting dalam pertumbuhan tumor, invasi dan metastasis dalam kejadian kanser (Normanno et al. 2006). Ciri mutasi *KRAS* tersebut berkemungkinan menyebabkan kesan penyenyapan gen terhadap invasi sel HCT116 menjadi tidak signifikan dan berbeza dengan HT-29.

Penyenyapan gen *NME1* tidak memberi kesan yang signifikan dalam penyekatan kitaran sel dalam kedua-dua titisan sel. Kajian terdahulu menunjukkan bahawa gen ini berinteraksi dengan *migration inhibitory factor* (*MIF*) untuk menyekat fasa G0/G1 kitaran sel dalam sel kanser payudara, MCF7 (Jung et al. 2008). Penyenyapan gen *NME1* dengan menggunakan siRNA tidak menyekat fasa G0/G1 kitaran sel secara signifikan berbanding kawalan (Jung et al. 2008).

Gen keempat yang menunjukkan pengekspresan mRNA rendah selepas transfeksi siRNA dalam kajian ini ialah *ZAK*. Protein *ZAK* tergolong dalam keluarga *mixed lineage kinase* (MLK), di mana ianya terdiri daripada sekumpulan kinase serina/treonina yang berfungsi sebagai *mitogen-activated protein kinase kinases* (MAP3K) untuk mengaktifkan pelbagai laluan MAPK (Gallo & Johnson 2002). MAPK mengawal pelbagai proses fisiologi seperti pembahagian sel, perbezaan sel, kematian sel dan gerak balas aruhan tekanan (Lewis et al. 1998; Schaeffer & Weber 1999; Widmann et al. 1999). Jalur protein *ZAK* tidak dikesan dalam blot Western dalam kajian ini. Ini boleh dikaitkan bahawa protein ini merupakan komponen *stress-activated* bagi laluan transduksi isyarat kinase protein (Johnson et al. 1996). Protein ini hanya diaktifkan dalam sel apabila terdedah kepada tekanan ekstrasel seperti sinaran UV, kejutan osmotik, kejutan haba (Johnson et al. 1996) dan rawatan dengan faktor- α nekrosis tumor (Leo et al. 1999), interleukin-1 (Ip & Davis 1998) atau antibiotik yang dikenali sebagai perencat sintesis protein eukariotik (Johnson et al. 1996).

Penyenyapan *ZAK* mengurangkan viabiliti titisan sel HT-29 dan HCT116. Kajian terdahulu yang melaporkan pengekspresan *ZAK* yang tinggi dalam sel epidermis JB6 C141 mengakibatkan peningkatan pembahagian sel, menggalakkan perubahan sel dan pembentukan tumor *in vivo* (Cho et al. 2004). Penyenyapan gen *ZAK* juga menyekat perubahan sel dan pembentukan kanser kulit *in vitro* dan *in vivo* (Cho et al. 2004). Sebaliknya, penyenyapan gen *ZAK* oleh shRNA pula meningkatkan pembahagian sel berbanding kawalan dalam sel kanser paru-paru manusia, A549 (Yang et al. 2010). Kajian tersebut melaporkan *ZAK* terlibat dalam laluan

extracellular signal-regulated kinase (ERK) dan *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) untuk mengawal pembahagian sel kanser paru-paru (Yang et al. 2010). Merujuk kepada data yang dibincangkan di atas, penyenyapan gen yang sama menghasilkan keputusan yang bercanggah dalam sel yang berlainan, iaitu sel kanser paru-paru, epidermis dan kolorektal. Ini mungkin disebabkan mekanisme tindakan *ZAK* adalah berlainan dalam jenis sel yang berbeza.

Penyenyapan gen *ZAK* tidak meningkatkan aktiviti *caspase 3* dalam kedua-dua titisan sel HT-29 dan HCT116. Kajian terdahulu telah melaporkan protein *ZAK* mempunyai aktiviti pro-apoptosis di mana pengekspresan *ZAK* yang tinggi menggalakkan kejadian apoptosis sel hepatoma, Hep3B (Liu et al. 2000). Kajian lain juga menunjukkan bahawa *ZAK* berinteraksi dengan *long non-coding RNA* dalam aktiviti apoptosis dalam sel karsinoma hepatosel (Xu et al. 2014). Penyenyapan gen *ZAK* menghalang kejadian apoptosis dalam sel karsinoma hepatosel, SMMC7221 (Xu et al. 2014).

Dalam asai migrasi sel, penyenyapan *ZAK* tidak memberi keputusan yang signifikan dalam sel kanser kolorektal. Setakat ini, tiada data yang melaporkan peranan *ZAK* dalam migrasi sel. Namun begitu, ada kajian yang menunjukkan *ZAK* terlibat secara tidak langsung dalam proses migrasi sel. Kajian tersebut melaporkan aktiviti kinase *ZAK* mempunyai regulasi negatif dengan *Rho GDP dissociation inhibitor beta* (*RhoGDIβ*) dalam migrasi sel (Huang et al. 2009). *RhoGDIβ* merangsang migrasi sel jantung tikus, H9c2, melalui pengekspresan *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (*Rac1*) (Huang et al. 2009). Penyenyapan gen *Rho GDP* dengan menggunakan siRNA telah menurun migrasi sel H9c2 manakala penyenyapan

ZAK mampu mengembalikan aktiviti *RhoGDI β* , di mana migrasi sel tidak terjejas (Huang et al. 2009).

Dalam asai invasi sel, penyenyapan *ZAK* juga tidak memberikan kesan yang signifikan dalam sel kanser kolorektal. Setakat ini, peranan *ZAK* dalam invasi sel masih tidak jelas dan tiada data mengenai penyenyapan gen tersebut atas kesan invasi sel dilaporkan.

Tiada kesan yang signifikan terhadap kitaran sel bagi kedua-dua titisan sel HT-29 dan HCT116 berbanding kumpulan kawalan. *ZAK* terlibat dalam pengawalaturan organisasi aktin dan kitaran sel (Yang 2002). Kajian terdahulu menunjukkan pengekspresan *ZAK* jenis liar dalam embrio tikus, 10T1/2, meningkatkan populasi sel dalam fasa G2/M dalam kitaran sel, di mana menyebabkan penyekatan kitaran sel pada fasa G2 (Yang 2002). Setakat ini, kajian kitaran sel selepas penyenyapan gen *ZAK* dalam kanser kolorektal masih belum pernah dilaporkan.

Gen kelima, iaitu *CKS2*, juga menunjukkan pengekspresan mRNA rendah selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HT-29 dan HCT116. Pengekspresan gen *CKS2* menurun tetapi pengekspresan protein *CKS2* tidak dapat dikesan dalam blot *Western* selepas penyenyapan gen. Keputusan negatif tersebut mungkin disebabkan penggunaan saiz membran pindah yang tidak sesuai (0.45 μ m) pada protein *CKS2* yang bersaiz 10kDa.

Asai fungsi sel menunjukkan penenyapan gen *CKS2* mengurangkan viabiliti sel HCT116 sahaja. *CKS2* terlibat dalam proses pertumbuhan dan pembahagian sel (Martinsson-Ahlzen et al. 2008). Hasil kajian terdahulu menunjukkan bahawa penenyapan *CKS2* menurun pembahagian sel dalam *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) dan sel serviks, HeLa (Martinsson-Ahlzen et al. 2008). Kang et al. juga melaporkan bahawa ekspresi *CKS2* yang tinggi meningkatkan pertumbuhan sel dalam kanser gastrik (Kang et al. 2009). Dalam kajian tersebut, penenyapan *CKS2* dengan menggunakan siRNA berjaya menurunkan pertumbuhan sel kanser gastrik (Kang et al. 2009). Akan tetapi, penenyapan gen *CKS2* tidak memberi kesan yang signifikan ke atas viabiliti sel HT-29 dalam kajian ini. Kajian penenyapan gen *CKS2* dalam sel kanser kolorektal masih belum dilaporkan.

Penenyapan *CKS2* tidak mengubah aktiviti *caspase 3* secara signifikan dalam kedua-dua titisan sel HT-29 dan HCT116. Peranan *CKS2* dalam kejadian apoptosis dalam sel-sel kanser kolorektal masih tidak jelas. Kajian terdahulu melaporkan bahawa penenyapan gen *CKS2* mengaruh kejadian apoptosis dan meningkat aktiviti *caspase 3* dalam sel kanser prostat, AT3 (Lan et al. 2008). Penenyapan gen *CKS2* oleh siRNA meningkatkan aktiviti *caspase 3* dalam sel kanser gastrik, MKN74 (Tanaka et al. 2011).

Penenyapan gen *CKS2* menyekat migrasi titisan sel HT-29 dan HCT116 dalam kajian ini. Ini merupakan kajian pertama yang menunjukkan peranan *CKS2* dalam migrasi sel kolorektal kanser. Kajian terdahulu menunjukkan penenyapan gen *CKS2* oleh siRNA menurun migrasi sel berbanding kawalan dalam sel kanser gastrik, MKN74 (Tanaka et al. 2011).

Akan tetapi, penenyapan *CKS2* tidak memberi kesan yang signifikan ke atas invasi titisan sel HT-29 dan HCT116. Kajian *CKS2* dalam invasi sel kanser kolorektal masih tidak jelas. Kajian terdahulu menunjukkan penenyapan gen *CKS2* oleh siRNA menurun invasi sel berbanding kawalan dalam sel kanser gastrik, MKN74 (Tanaka et al. 2011). Tanaka et al juga melaporkan bahawa daripada 40 kes kanser gastrik yang mempunyai pengekspresan *CKS2* yang tinggi, 31 kes menunjukkan invasi lapisan serosa (Tanaka et al. 2011). Ini menunjukkan pengekspresan *CKS2* yang tinggi menyebabkan kejadian metastasis limfa (Gendreau & Whalen 1999). Kajian terdahulu juga menunjukkan *CKS2* menggalak invasi kanser dan metastasis kanser payudara, di mana pengekspresan *CKS2* meningkat dalam kanser payudara invasif berbanding kanser payudara biasa melalui asai RT-qPCR ke atas 21 sampel tisu yang dikaji (Kawakami et al. 2006). Kajian Lyng et al juga melaporkan bahawa pengekspresan *CKS2* yang tinggi menunjukkan fenotip invasif dalam kanser serviks (Lyng et al. 2006).

Penenyapan *CKS2* menyekat fasa G1 kitaran sel HCT116. Dalam sel kanser, pengekspresan *CKS2* yang tinggi boleh mempercepatkan kitaran sel dan menggalakkan pertumbuhan sel (Lan et al. 2008; Kang et al. 2009). *CKS2* diperlukan oleh sel germa untuk memasuki metafasa meiotik pertama dan anafasa (Spruck et al. 2003). Kajian terdahulu juga melaporkan penenyapan gen *CKS* menyekat fasa G2 kitaran sel dalam *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) (Martinsson-Ahlzen et al. 2008). Penenyapan gen *CKS2* dalam sel cholangiocarcinoma, QBC939, juga menyekat kitaran sel pada fasa G2 melalui penurunan pengekspresan *cyclin A* dan *cyclin B1* (Shen et al. 2013). Akan tetapi, penenyapan gen *CKS2* tidak memberi

kesan yang signifikan ke atas kitaran sel HT-29 dalam kajian ini. Seperti dalam kajian gen lain, penenyapan gen *CKS1* menyekat fasa G2 dalam kitaran sel kanser paru-paru, H358, tetapi penenyapan gen yang sama tidak menjejaskan kitaran sel dalam sel fibroblasta paru-paru, MRC-5.

Untuk mengkaji kemosensitiviti sel, asai sel dijalankan selepas transfeksi siRNA selama 48 jam dan diikuti dengan rawatan 5-FU. Ini bertujuan untuk mengurangkan dos anti-kanser apabila bergabung dengan siRNA supaya sel kanser dapat dibunuh secara berkesan dengan kesan sampingan yang minimum. Daripada lima gen yang dikaji, hanya gabungan siRNA *DKC1* dengan rawatan 5-FU dan gabungan siRNA *CKS2* dengan rawatan 5-FU berjaya menyekat pertumbuhan titisan sel HCT116 dengan signifikan. Ini mencadangkan bahawa penenyapan gen tersebut oleh siRNA meningkatkan kemosensitiviti titisan sel HCT116 terhadap 5-FU. Walau bagaimanapun, gabungan siRNA dengan rawatan 5-FU bagi kelima-lima gen, *TEME97*, *DKC1*, *NME1*, *ZAK* dan *CKS2*, tidak memberi kesan penyekatan yang signifikan terhadap viabiliti sel HT-29. Ini disebabkan oleh HT-29 mempunyai mutasi pada kodon 273 dalam gen penindas tumor, *p53*, (Ahmed et al. 2013) menyebabkan sel tersebut lebih resistan terhadap kesan 5-FU (Boyer et al. 2004). Kajian terdahulu menunjukkan sel HCT116 yang mempunyai *p53* jenis liar lebih sensitif terhadap rawatan 5-FU berbanding sel HT-29 (Ng et al. 2014).

Selain itu, gabungan rawatan 5-FU dan siRNA bagi kesemua lima gen, *TEME97*, *DKC1*, *NME1*, *ZAK* dan *CKS2*, tidak mengurangkan migrasi dan invasi sel secara signifikan berbanding sel transfeksi siRNA sahaja dalam kedua-dua titisan sel. Peranan 5-FU dalam motiliti sel kanser kolorektal masih tidak jelas.

Kajian ini tidak menunjukkan kesan penyekatan kitaran sel yang signifikan antara kumpulan gabungan siRNA bagi kesemua lima gen dengan rawatan 5-FU berbanding kumpulan kawalan negatif, iaitu kumpulan rawatan 5-FU sahaja. Daripada keputusan kajian ini, rawatan 5-FU menyebabkan pengumpulan sel pada fasa S dan G2 dalam titisan sel HCT116 untuk kesemua lima siRNA *TMEM97*, *DKC1*, *NME1*, *ZAK*, dan *CKS2* dengan rawatan 5-FU serta kawalan negatif. Bagi titisan sel HT-29, gabungan siRNA bagi kesemua lima gen tersebut dengan rawatan 5-FU serta kawalan negatif menunjukkan pengumpulan sel yang signifikan dalam fasa S kitaran sel. Pengumpulan sel pada fasa S dan G2 dalam HCT116 dan pengumpulan sel pada fasa S dalam HT-29 menunjukkan bahawa rawatan 5-FU sahaja mampu mengaruh perubahan kitaran sel dalam sel kanser kolorektal.

Mekanisme 5-FU adalah melalui perencatan *thymidylate synthase* dan penyekatan kitaran sel (Longley et al. 2003). 5-FU merupakan agen kemoterapeutik fasa S aktif dan tidak mempunyai aktiviti apabila sel-sel berada dalam fasa G0 (Shah & Schwartz 2001). 5-FU menyebabkan kerosakan DNA dengan mengurai rantaian berganda atau rantaian tunggal DNA dan mengganggu penggabungan FdUTP ke dalam DNA pada fasa S (Curtin et al. 1991; Peters et al. 2000). Walau bagaimanapun, kerosakan DNA juga boleh berlaku dalam semua fasa kitaran sel dan mekanisme pembaikan yang terlibat adalah berbeza dalam setiap fasa kitaran sel (Kastan & Bartek 2004). Dalam kajian terdahulu, 5-FU menyebabkan pengurangan sel dalam fasa S awal atau pengumpulan sel pada fasa G1/S dalam sel-sel kanser kolorektal manusia (Pizzorno et al. 1995).

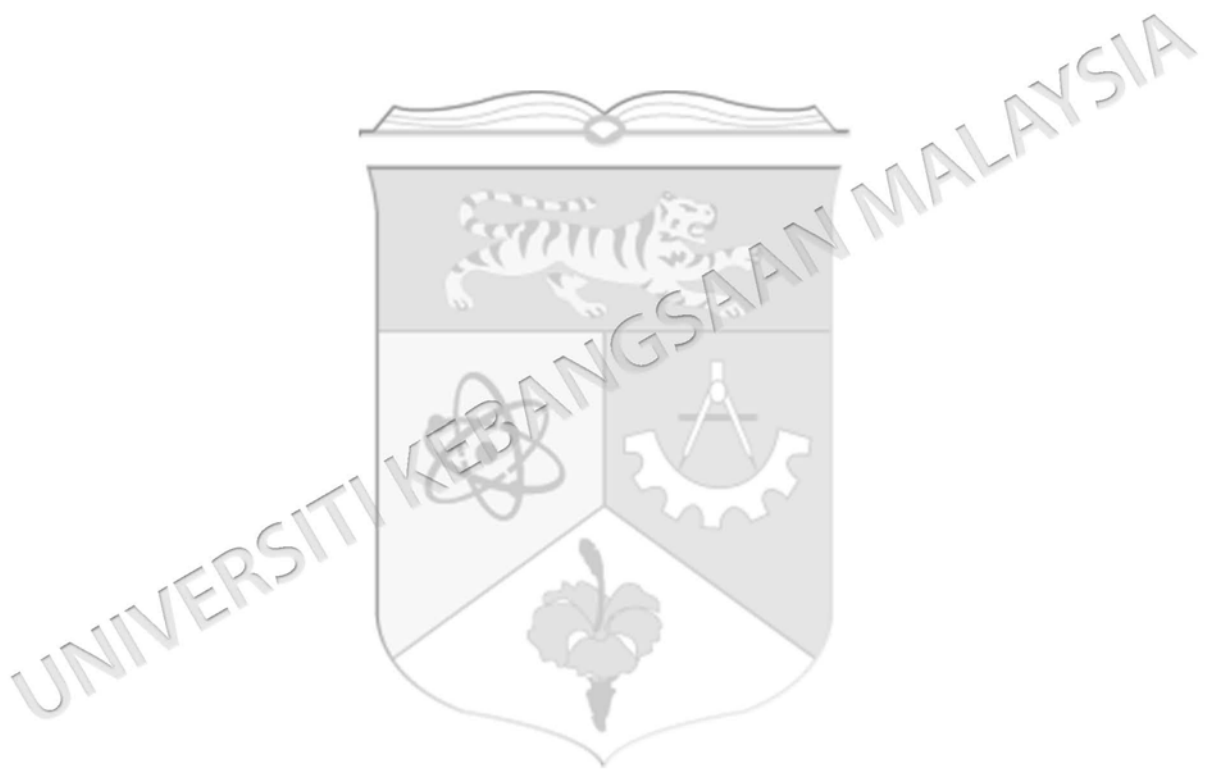
BAB VI

KESIMPULAN

Secara ringkasnya, RNAi menyediakan sistem yang baik dan berguna untuk menentukan fungsi gen-gen yang mempunyai pengekspresan tinggi dalam kanser dan peranannya tersebut dalam pertumbuhan sel kanser *in vitro*. Walaupun 20 gen yang mempunyai pengekspresan tinggi dalam data mikroatur dipilih, hanya lima gen iaitu *DKC1*, *TMEM97*, *NME1*, *ZAK*, dan *CKS2* menunjukkan ekepresi rendah selepas transfeksi siRNA dalam titisan sel HT-29 dan HCT116. Penenyapan gen *DKC1*, *TMEM97*, *ZAK* dan *NME1* menurun viabiliti sel HT-29 dan HCT116 dengan signifikan. Penenyapan *DKC1* mengurangkan peratusan migrasi sel HCT116 dan menyekat fasa G1 dalam kitaran titisan sel HCT116 berbanding kawalan negatif. Penenyapan *DKC1* juga meningkatkan kemosisitiviti dalam sel HCT116 dengan menyekat pertumbuhan sel dan menyekat fasa S kitaran sel. Penenyapan *DKC1* dengan gabungan rawatan kemoterapi merupakan strategi yang baik untuk menyekat perkembangan kanser kolorektal.

Limitasi kajian ini ialah kesan penenyapan gen-gen yang tidak konsisten pada titisan sel yang dikaji. Penenyapan pada laluan isyarat dan bukannya gen-gen individu haruslah dikaji untuk memastikan kesan penenyapan yang lebih konsisten.

Kajian *in vivo* yang selanjutnya juga perlu dilakukan untuk membawa langkah lebih dekat kepada utiliti klinikal.



RUJUKAN

- Ades, S. 2009. Adjuvant chemotherapy for colon cancer in the elderly: moving from evidence to practice. *Oncology* 23(2): 162-7.
- Ahlquist, D. A., J. E. Skoletsy, K. A. Boynton, J. J. Harrington, D. W. Mahoney, W. E. Pierceall, S. N. Thibodeau & A. P. Shuber 2000. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119(5): 1219-27.
- Ahlquist, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296(5571): 1270-3.
- Ahmed, D., P. W. Eide, I. A. Eilertsen, S. A. Danielsen, M. Eknaes, M. Hektoen, G. E. Lind & R. A. Lothe 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2:e71.
- Alawi, F. & P. Lin 2013. Dyskerin localizes to the mitotic apparatus and is required for orderly mitosis in human cells. *PloS one* 8(11): e80805.
- Alawi, F., P. Lin, B. Ziober & R. Patel 2011. Correlation of dyskerin expression with active proliferation independent of telomerase. *Head & neck* 33(7): 1041-51.
- Alon, U., N. Barkai, D. A. Notterman, K. Gish, S. Ybarra, D. Mack & A. J. Levine 1999. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 6745-50.
- Aravin, A. A., G. J. Hannon & J. Brennecke 2007. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318(5851): 761-4.
- Astler, V. B. & F. A. Collier 1954. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of surgery* 139(6): 846-52.
- Atkin, W. S., R. Edwards, I. Kralj-Hans, K. Wooldrage, A. R. Hart, J. M. Northover, D. M. Parkin, J. Wardle, S. W. Duffy & J. Cuzick 2010. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 375(9726): 1624-33.
- Awwad, R. A., N. Sergina, H. Yang, B. Ziober, J. K. Willson, E. Zborowska, L. E. Humphrey, R. Fan, T. C. Ko, M. G. Brattain & G. M. Howell 2003. The role of transforming growth factor alpha in determining growth factor independence. *Cancer research* 63(15): 4731-8.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-97.

- Baulcombe, D. 1999. Viruses and gene silencing in plants. *Archives of virology. Supplementum* 15: 189-201.
- Baxter, N. N., M. A. Goldwasser, L. F. Paszat, R. Saskin, D. R. Urbach & L. Rabeneck 2009. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Annals of internal medicine* 150(1): 1-8.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond & G. J. Hannon 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818): 363-6.
- Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson & G. J. Hannon 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* 35(3): 215-7.
- Bertrand, V., M. H. Couturier-Turpin, A. Louvel, Y. Panis & D. Couturier 1999. Relation between cytogenetic characteristics of two human colonic adenocarcinoma cell lines and their ability to grow locally or metastasize or both: an experimental study in the nude mouse. *Cancer genetics and cytogenetics* 113(1): 36-44.
- Bertucci, F., S. Salas, S. Eysteries, V. Nasser, P. Finetti, C. Ginestier, E. Charafe-Jauffret, B. Lloriod, L. Bachelart, J. Montfort, G. Victorero, F. Viret, V. Ollendorff, V. Fert, M. Giovaninni, J. R. Delperro, C. Nguyen, P. Viens, G. Monges, D. Birnbaum & R. Houlgatte 2004. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 23(7): 1377-91.
- Bi, X., Q. Lin, T. W. Foo, S. Joshi, T. You, H. M. Shen, C. N. Ong, P. Y. Cheah, K. W. Eu & C. L. Hew 2006. Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways: mechanism of tumorigenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5(6): 1119-30.
- Birkenkamp-Demtroder, K., L. L. Christensen, S. H. Olesen, C. M. Frederiksen, P. Laiho, L. A. Aaltonen, S. Laurberg, F. B. Sorensen, R. Hagemann & O. R. TF 2002. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer research* 62(15): 4352-63.
- Blevins, T., R. Rajeswaran, P. V. Shivaprasad, D. Beknazariants, A. Si-Ammour, H. S. Park, F. Vazquez, D. Robertson, F. Meins, Jr., T. Hohn & M. M. Pooggin 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic acids research* 34(21): 6233-46.
- Boyer, J., E. G. McLean, S. Aroori, P. Wilson, A. McCulla, P. D. Carey, D. B. Longley & P. G. Johnston 2004. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(6): 2158-67.

- Boyle, P. & M. E. Leon 2002. Epidemiology of colorectal cancer. *British medical bulletin* 64: 1-25.
- Brattain, M. G., W. D. Fine, F. M. Khaled, J. Thompson & D. E. Brattain 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer research* 41(5): 1751-6.
- Breivik, J., G. I. Meling, A. Spurkland, T. O. Rognum & G. Gaudernack 1994. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *British journal of cancer* 69(2): 367-71.
- Brenner, A. S., J. S. Thebo, A. J. Senagore, H. J. Duepree, T. Gramlich, A. Ormsby, I. C. Lavery & V. W. Fazio 2003. Analysis of both NM23-h1 and NM23-H2 expression identifies "at-risk" patients with colorectal cancer. *The American surgeon* 69(3): 203-8; discussion 208.
- Brink, M., A. F. de Goeij, M. P. Weijenberg, G. M. Roemen, M. H. Lentjes, M. M. Pachen, K. M. Smits, A. P. de Bruine, R. A. Goldbohm & P. A. van den Brandt 2003. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24(4): 703-10.
- Byers, T., S. Graham & M. Swanson 1982. Parity and colorectal cancer risk in women. *Journal of the National Cancer Institute* 69(5): 1059-62.
- Cao, M. Y., Y. Lee, N. P. Feng, K. Xiong, H. Jin, M. Wang, A. Vassilakos, S. Viau, J. A. Wright & A. H. Young 2003. Adenovirus-mediated ribonucleotide reductase R1 gene therapy of human colon adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(12): 4553-61.
- Cardoso, J., J. Boer, H. Morreau & R. Fodde 2007. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1775(1): 103-37.
- Carmell, M. A., A. Girard, H. J. van de Kant, D. Bourc'his, T. H. Bestor, D. G. de Rooij & G. J. Hannon 2007. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell* 12(4): 503-14.
- Carrington, J. C. & V. Ambros 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301(5631): 336-8.
- Chao, A., M. J. Thun, C. J. Connell, M. L. McCullough, E. J. Jacobs, W. D. Flanders, C. Rodriguez, R. Sinha & E. E. Calle 2005. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 293(2): 172-82.
- Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak

- & K. J. Guegler 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 33(20): e179.
- Cho, Y. Y., A. M. Bode, H. Mizuno, B. Y. Choi, H. S. Choi & Z. Dong 2004. A novel role for mixed-lineage kinase-like mitogen-activated protein triple kinase alpha in neoplastic cell transformation and tumor development. *Cancer research* 64(11): 3855-64.
- Cogoni, C., J. T. Irelan, M. Schumacher, T. J. Schmidhauser, E. U. Selker & G. Macino 1996. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO journal* 15(12): 3153-63.
- Cogoni, C. & G. Macino 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399(6732): 166-9.
- Cogoni, C. & G. Macino 1999. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286(5448): 2342-4.
- Cohen, S. B., M. E. Graham, G. O. Lovrecz, N. Bache, P. J. Robinson & R. R. Reddel 2007. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315(5820): 1850-3.
- Cooper, S. 2000. The continuum model and G1-control of the mammalian cell cycle. *Progress in cell cycle research* 4: 27-39.
- Cummings, B. J. 1993. Radiation therapy for colorectal cancer. *The Surgical clinics of North America* 73(1): 167-81.
- Curtin, N. J., A. L. Harris & G. W. Aherne 1991. Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer research* 51(9): 2346-52.
- de Gramont, A., A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, H. Cortes-Funes, A. Cervantes, G. Freyer, D. Papamichael, N. Le Bail, C. Louvet, D. Hendler, F. de Braud, C. Wilson, F. Morvan & A. Bonetti 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(16): 2938-47.
- de la Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer* 4(10): 769-80.
- DeCosse, J. J., G. J. Tsioulis & J. S. Jacobson 1994. Colorectal cancer: detection, treatment, and rehabilitation. *CA: a cancer journal for clinicians* 44(1): 27-42.

- Diasio, R. B. & B. E. Harris 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical pharmacokinetics* 16(4): 215-37.
- Doench, J. G., C. P. Petersen & P. A. Sharp 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development* 17(4): 438-42.
- Douglas, E. J., H. Fiegler, A. Rowan, S. Halford, D. C. Bicknell, W. Bodmer, I. P. Tomlinson & N. P. Carter 2004. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer research* 64(14): 4817-25.
- Edelstein, L. C. & P. F. Bray 2011. MicroRNAs in platelet production and activation. *Blood* 117(20): 5289-96.
- Edwards, B. K., H. L. Howe, L. A. Ries, M. J. Thun, H. M. Rosenberg, R. Yancik, P. A. Wingo, A. Jemal & E. G. Feigal 2002. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer* 94(10): 2766-92.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel & T. Tuschl 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development* 15(2): 188-200.
- Eppert, K., S. W. Scherer, H. Ozelik, R. Pirone, P. Hoodless, H. Kim, L. C. Tsui, B. Bapat, S. Gallinger, I. L. Andrulis, G. H. Thomsen, J. L. Wrana & L. Attisano 1996. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86(4): 543-52.
- Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends in genetics : TIG* 15(9): 358-63.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver & C. C. Mello 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11.
- Flatmark, K., G. M. Maelandsmo, M. Martinsen, H. Rasmussen & O. Fodstad 2004. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European journal of cancer* 40(10): 1593-8.
- Fogh, J. 1975. Human tumor cells in vitro Ed. New York: Plenum Press.
- Gallo, K. A. & G. L. Johnson 2002. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3(9): 663-72.
- Gendreau, K. M. & G. F. Whalen 1999. What can we learn from the phenomenon of preferential lymph node metastasis in carcinoma? *Journal of surgical oncology* 70(3): 199-204.

- Ghoshal, K. & S. T. Jacob 1997. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochemical pharmacology* 53(11): 1569-75.
- Giardiello, F. M., S. R. Hamilton, L. M. Hyland, V. W. Yang, P. Tamez & R. A. Casero, Jr. 1997. Ornithine decarboxylase and polyamines in familial adenomatous polyposis. *Cancer research* 57(2): 199-201.
- Giovannucci, E. 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 10(7): 725-31.
- Gitlin, L., S. Karelsky & R. Andino 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418(6896): 430-4.
- Golden, T. A., S. E. Schauer, J. D. Lang, S. Pien, A. R. Mushegian, U. Grossniklaus, D. W. Meinke & A. Ray 2002. SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in Arabidopsis. *Plant physiology* 130(2): 808-22.
- Grazzini, G., C. B. Visioli, M. Zorzi, S. Ciatto, F. Banovich, A. G. Bonanomi, A. Bortoli, G. Castiglione, L. Cazzola, M. Confortini, P. Mantellini, T. Rubeca & M. Zappa 2009. Immunochemical faecal occult blood test: number of samples and positivity cutoff. What is the best strategy for colorectal cancer screening? *British journal of cancer* 100(2): 259-65.
- Grosshans, H. & W. Filipowicz 2008. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* 451(7177): 414-6.
- Hankinson, S. E., W. C. Willett, G. A. Colditz, D. J. Hunter, D. S. Michaud, B. Deroo, B. Rosner, F. E. Speizer & M. Pollak 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351(9113): 1393-6.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418(6894): 244-51.
- Honeycutt, K. A., Z. Chen, M. I. Koster, M. Miers, J. Nuchtern, J. Hicks, D. R. Roop & J. M. Shohet 2006. Dereglated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. *Oncogene* 25(29): 4027-32.
- Howell, G. M., L. E. Humphrey, R. A. Awwad, D. Wang, A. Koterba, B. Periyasamy, J. Yang, W. Li, J. K. Willson, B. L. Ziober, K. Coleman, J. Carboni, M. Lynch & M. G. Brattain 1998. Aberrant regulation of transforming growth factor- α during the establishment of growth arrest and quiescence of growth

- factor independent cells. *The Journal of biological chemistry* 273(15): 9214-23.
- Huang, C. Y., L. C. Yang, K. Y. Liu, I. C. Chang, P. H. Liao, J. I. Chou, M. Y. Chou, W. W. Lin & J. J. Yang 2009. ZAK negatively regulates RhoGDI β -induced Rac1-mediated hypertrophic growth and cell migration. *Journal of biomedical science* 16: 56.
- Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier & D. Louvard 1987. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *The Journal of cell biology* 105(1): 345-57.
- Ikeda, K., T. Monden, M. Tsujie, H. Izawa, H. Yamamoto, T. Ohnishi, M. Ohue, M. Sekimoto, N. Tomita & M. Monden 1996. [Cyclin D, CDK4 and p16 expression in colorectal cancer]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 54(4): 1054-9.
- Ip, Y. T. & R. J. Davis 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current opinion in cell biology* 10(2): 205-19.
- Janowski, B. A., S. T. Younger, D. B. Hardy, R. Ram, K. E. Huffman & D. R. Corey 2007. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nature chemical biology* 3(3): 166-73.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward & D. Forman 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61(2): 69-90.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray & M. J. Thun 2008. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 58(2): 71-96.
- Jiang, L., Y. Bao, C. Luo, G. Hu, C. Huang, X. Ding, K. Sun & Y. Lu 2010. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136(2): 211-7.
- Johnson, N. L., A. M. Gardner, K. M. Diener, C. A. Lange-Carter, J. Gleavy, M. B. Jarpe, A. Minden, M. Karin, L. I. Zon & G. L. Johnson 1996. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *The Journal of biological chemistry* 271(6): 3229-37.
- Jones-Rhoades, M. W. & D. P. Bartel 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell* 14(6): 787-99.

- Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel & B. Bartel 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology* 57: 19-53.
- Jones, D. V., Jr., R. J. Winn, B. W. Brown, L. B. Levy, R. P. Pugh, J. L. Wade, 3rd, H. M. Gross, K. B. Pendergrass, B. Levin & J. L. Abbruzzese 1995. Randomized phase III study of 5-fluorouracil plus high dose folinic acid versus 5-fluorouracil plus folinic acid plus methyl-lomustine for patients with advanced colorectal cancer. *Cancer* 76(10): 1709-14.
- Jover, R., P. Zapater, A. Castells, X. Llor, M. Andreu, J. Cubiella, F. Balaguer, L. Sempere, R. M. Xicola, L. Bujanda, J. M. Rene, J. Clofent, X. Bessa, J. D. Morillas, D. Nicolas-Perez, E. Pons, A. Paya & C. Alenda 2009. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *European journal of cancer* 45(3): 365-73.
- Jung, H., H. A. Seong & H. Ha 2008. Direct interaction between NM23-H1 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for alleviation of MIF-mediated suppression of p53 activity. *The Journal of biological chemistry* 283(47): 32669-79.
- Kaiser, S., Y. K. Park, J. L. Franklin, R. B. Halberg, M. Yu, W. J. Jessen, J. Freudenberg, X. Chen, K. Haigis, A. G. Jegga, S. Kong, B. Sakthivel, H. Xu, T. Reichling, M. Azhar, G. P. Boivin, R. B. Roberts, A. C. Bissahoyo, F. Gonzales, G. C. Bloom, S. Eschrich, S. L. Carter, J. E. Aronow, J. Kleimayer, M. Kleimayer, V. Ramaswamy, S. H. Settle, B. Boone, S. Levy, J. M. Graff, T. Doetschman, J. Groden, W. F. Dove, D. W. Threadgill, T. J. Yeatman, R. J. Coffey, Jr. & B. J. Aronow 2007. Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome biology* 8(7): R131.
- Kanasty, R., J. R. Dorkin, A. Vegas & D. Anderson 2013. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature materials* 12(11): 967-77.
- Kang, M. A., J. T. Kim, J. H. Kim, S. Y. Kim, Y. H. Kim, Y. I. Yeom, Y. Lee & H. G. Lee 2009. Upregulation of the cyclin kinase subunit CKS2 increases cell proliferation rate in gastric cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 135(6): 761-9.
- Kastan, M. B. & J. Bartek 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316-23.
- Katiyar-Agarwal, S., R. Morgan, D. Dahlbeck, O. Borsani, A. Villegas, Jr., J. K. Zhu, B. J. Staskawicz & H. Jin 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47): 18002-7.
- Kaulfuss, S., P. Burfeind, J. Gaedcke & J. G. Scharf 2009. Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in

colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 8(4): 821-33.

- Kawakami, K., H. Enokida, T. Tachiwada, T. Gotanda, K. Tsuneyoshi, H. Kubo, K. Nishiyama, M. Takiguchi, M. Nakagawa & N. Seki 2006. Identification of differentially expressed genes in human bladder cancer through genome-wide gene expression profiling. *Oncology reports* 16(3): 521-31.
- Kayed, H., J. Kleeff, J. Ding, J. Hammer, T. Giese, H. Zentgraf, M. W. Buchler & H. Friess 2004. Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histology and histopathology* 19(4): 1021-31.
- Keen, N. & S. Taylor 2004. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature reviews. Cancer* 4(12): 927-36.
- Kennerdell, J. R. & R. W. Carthew 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95(7): 1017-26.
- Keshava, C., N. Keshava, W. Z. Whong, J. Nath & T. M. Ong 1998. Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by folinic acid in V79 cells. *Mutation research* 397(2): 221-8.
- Khandwala, H. M., I. E. McCutcheon, A. Flyvbjerg & K. E. Friend 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine reviews* 21(3): 215-44.
- Ki, D. H., H. C. Jeung, C. H. Park, S. H. Kang, G. Y. Lee, W. S. Lee, N. K. Kim, H. C. Chung & S. Y. Rha 2007. Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 121(9): 2005-12.
- Kim, H. J., S. H. Hwang, M. E. Han, S. Baek, H. E. Sim, S. Yoon, S. Y. Baek, B. S. Kim, J. H. Kim, S. Y. Kim & S. O. Oh 2012. LAP2 is widely overexpressed in diverse digestive tract cancers and regulates motility of cancer cells. *PloS one* 7(6): e39482.
- Kim, R., Y. Ohi, H. Inoue & T. Toge 1999. Expression and relationship between topoisomerase I and II alpha genes in tumor and normal tissues in esophageal, gastric and colon cancers. *Anticancer research* 19(6B): 5393-8.
- Kim, S. H. & J. Kim 2006. Reduction of invasion in human fibrosarcoma cells by ribosomal protein S3 in conjunction with Nm23-H1 and ERK. *Biochimica et biophysica acta* 1763(8): 823-32.
- Kitahara, O., Y. Furukawa, T. Tanaka, C. Kihara, K. Ono, R. Yanagawa, M. E. Nita, T. Takagi, Y. Nakamura & T. Tsunoda 2001. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-

- capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer research* 61(9): 3544-9.
- Kiunga, G. A., J. Raju, N. Sabljic, G. Bajaj, C. K. Good & R. P. Bird 2004. Elevated insulin receptor protein expression in experimentally induced colonic tumors. *Cancer letters* 211(2): 145-53.
- Klase, Z., P. Kale, R. Winograd, M. V. Gupta, M. Heydarian, R. Berro, T. McCaffrey & F. Kashanchi 2007. HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC molecular biology* 8: 63.
- Knight, S. W. & B. L. Bass 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293(5538): 2269-71.
- Koehler, A., F. Bataille, C. Schmid, P. Rueemle, A. Waldeck, H. Blaszyk, A. Hartmann, F. Hofstaedter & W. Dietmaier 2004. Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage. *The Journal of pathology* 204(1): 65-74.
- Kollareddy, M., P. Dzubak, D. Zheleva & M. Hajdich 2008. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 152(1): 27-33.
- Kressner, U., J. Bjorheim, S. Westring, S. S. Wahlberg, L. Pahlman, B. Glimelius, G. Lindmark, A. Lindblom & A. L. Borresen-Dale 1998. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *European journal of cancer* 34(4): 518-21.
- Kuramitsu, Y. & K. Nakamura 2006. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 6(20): 5650-61.
- Kuramochi-Miyagawa, S., T. Kimura, T. W. Ijiri, T. Isobe, N. Asada, Y. Fujita, M. Ikawa, N. Iwai, M. Okabe, W. Deng, H. Lin, Y. Matsuda & T. Nakano 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131(4): 839-49.
- Labianca, R., G. D. Beretta, B. Kildani, L. Milesi, F. Merlin, S. Mosconi, M. A. Pessi, T. Prochilo, A. Quadri, G. Gatta, F. de Braud & J. Wils 2010. Colon cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 74(2): 106-33.
- Lamlum, H., A. Papadopoulou, M. Ilyas, A. Rowan, C. Gillet, A. Hanby, I. Talbot, W. Bodmer & I. Tomlinson 2000. APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(5): 2225-8.
- Lan, Y., Y. Zhang, J. Wang, C. Lin, M. M. Ittmann & F. Wang 2008. Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by

- promoting proliferation and inhibiting programmed cell death. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 123(3): 543-51.
- Lee, J. H., J. C. Marshall, P. S. Steeg & C. E. Horak 2009. Altered gene and protein expression by Nm23-H1 in metastasis suppression. *Molecular and cellular biochemistry* 329(1-2): 141-8.
- Lee, J. M., T. J. Yoon & Y. S. Cho 2013. Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *BioMed research international* 2013: 782041.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum & V. Ambros 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-54.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim & V. N. Kim 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* 21(17): 4663-70.
- Leo, E., K. Welsh, S. Matsuzawa, J. M. Zapata, S. Kitada, R. S. Mitchell, K. R. Ely & J. C. Reed 1999. Differential requirements for tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins in CD40-mediated induction of NF-kappaB and Jun N-terminal kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 274(32): 22414-22.
- LeRoith, D. & C. T. Roberts, Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters* 195(2): 127-37.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro & N. G. Ahn 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* 74: 49-139.
- Li, L. C., S. T. Okino, H. Zhao, D. Pookot, R. F. Place, S. Urakami, H. Enokida & R. Dahiya 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(46): 17337-42.
- Li, M. Q., J. Shao, Y. H. Meng, J. Mei, Y. Wang, H. Li, L. Zhang, K. K. Chang, X. Q. Wang, X. Y. Zhu & D. J. Li 2013. NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathways in the endometriotic milieu. *Human reproduction* 28(10): 2822-31.
- Liao, C. F., S. F. Luo, L. T. Li, C. Y. Lin, Y. C. Chen & M. C. Jiang 2008. CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 27: 15.
- Lin, M. S., W. C. Chen, J. X. Huang, H. J. Gao, B. F. Zhang, J. Fang, Q. Zhou & Y. Hu 2011. Tissue microarrays in Chinese human rectal cancer: study of

- expressions of the tumor-associated genes. *Hepato-gastroenterology* 58(112): 1937-42.
- Lin, Y. M., Y. Furukawa, T. Tsunoda, C. T. Yue, K. C. Yang & Y. Nakamura 2002. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 21(26): 4120-8.
- Liu, T. C., C. J. Huang, Y. C. Chu, C. C. Wei, C. C. Chou, M. Y. Chou, C. K. Chou & J. J. Yang 2000. Cloning and expression of ZAK, a mixed lineage kinase-like protein containing a leucine-zipper and a sterile-alpha motif. *Biochemical and biophysical research communications* 274(3): 811-6.
- Liu, Y. & W. F. Bodmer 2006. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4): 976-81.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-8.
- Lohmann, J. U., I. Endl & T. C. Bosch 1999. Silencing of developmental genes in Hydra. *Developmental biology* 214(1): 211-4.
- Lombardi, D. 2006. Commentary: nm23, a metastasis suppressor gene with a tumor suppressor gene aptitude? *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38(3-4): 177-80.
- Longley, D. B., D. P. Harkin & P. G. Johnston 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews. Cancer* 3(5):330-8.
- Lyng, H., R. S. Brovig, D. H. Svendsrud, R. Holm, O. Kaalhus, K. Knutstad, H. Oksefjell, K. Sundfor, G. B. Kristensen & T. Stokke 2006. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC genomics* 7: 268.
- Majumdar, S. R., R. H. Fletcher & A. T. Evans 1999. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *The American journal of gastroenterology* 94(10): 3039-45.
- Mallory, A. C. & H. Vaucheret 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics* 38 Suppl: S31-6.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein & et al. 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268(5215): 1336-8.

- Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann & T. Tuschl 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110(5): 563-74.
- Martinez, M. E., R. S. McPherson, J. F. Annegers & B. Levin 1995. Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for colorectal adenomatous polyps. *Journal of the National Cancer Institute* 87(4): 274-9.
- Martinsson-Ahlzen, H. S., V. Liberal, B. Grunenfelder, S. R. Chaves, C. H. Spruck & S. I. Reed 2008. Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Molecular and cellular biology* 28(18): 5698-709.
- Matsubara, N., O. A. Hietala, S. K. Gilmour, K. Y. Yum, S. Litwin, P. Watts, Brennan & O'Brien 1995. Association between high levels of ornithine decarboxylase activity and favorable prognosis in human colorectal carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1(6): 665-71.
- Mauro, D. J., J. K. De Riel, R. J. Tallarida & M. A. Sirover 1993. Mechanisms of excision of 5-fluorouracil by uracil DNA glycosylase in normal human cells. *Molecular pharmacology* 43(6): 854-7.
- Melle, C., G. Ernst, B. Schimmel, A. Bleul, H. Mothes, R. Kaufmann, U. Settmacher & F. Von Eggeling 2006. Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *International journal of oncology* 28(1): 195-200.
- Misquitta, L. & B. M. Paterson 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(4): 1451-6.
- Mitchell, J. R., E. Wood & K. Collins 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402(6761): 551-5.
- Montgomery, M. K., S. Xu & A. Fire 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26): 15502-7.
- Murphy, M., M. J. Pykett, P. Harnish, K. D. Zang & D. L. George 1993. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 4(9): 715-22.
- Navarro, L., P. Dunoyer, F. Jay, B. Arnold, N. Dharmasiri, M. Estelle, O. Voinnet & J. D. Jones 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312(5772): 436-9.

- Nelson, H., N. Petrelli, A. Carlin, J. Couture, J. Fleshman, J. Guillem, B. Miedema, D. Ota & D. Sargent 2001. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *Journal of the National Cancer Institute* 93(8): 583-96.
- Ng, P. L., N. F. Rajab, S. M. Then, Y. A. Mohd Yusof, W. Z. Wan Ngah, K. Y. Pin & M. L. Looi 2014. Piper betle leaf extract enhances the cytotoxicity effect of 5-fluorouracil in inhibiting the growth of HT29 and HCT116 colon cancer cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 15(8): 692-700.
- Ngo, H., C. Tschudi, K. Gull & E. Ullu 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(25): 14687-92.
- Nilsen, T. I. & L. J. Vatten 2001. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *British journal of cancer* 84(3): 417-22.
- Noordhuis, P., U. Holwerda, C. L. Van der Wilt, C. J. Van Groenigen, K. Smid, S. Meijer, H. M. Pinedo & G. J. Peters 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 15(7): 1025-32.
- Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro & D. S. Salomon 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366(1): 2-16.
- Notterman, D. A., U. Alon, A. J. Sierk & A. J. Levine 2001. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer research* 61(7): 3124-30.
- Nucci, M. R., C. R. Robinson, P. Longo, P. Campbell & S. R. Hamilton 1997. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Human pathology* 28(12): 1396-407.
- O'Dwyer, P. J. & R. B. Catalano 2006. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(28): 4534-8.
- Palatnik, J. F., E. Allen, X. Wu, C. Schommer, R. Schwab, J. C. Carrington & D. Weigel 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425(6955): 257-63.
- Palmqvist, R., G. Hallmans, S. Rinaldi, C. Biessy, R. Stenling, E. Riboli & R. Kaaks 2002. Plasma insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Gut* 50(5): 642-6.

- Park, W., J. Li, R. Song, J. Messing & X. Chen 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology : CB* 12(17): 1484-95.
- Pasquinelli, A. E. 2002. MicroRNAs: deviants no longer. *Trends in genetics : TIG* 18(4): 171-3.
- Peters, G. J., B. van Triest, H. H. Backus, C. M. Kuiper, C. L. van der Wilt & H. M. Pinedo 2000. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *European journal of cancer* 36(7): 916-24.
- Pizzorno, G., Z. Sun & R. E. Handschumacher 1995. Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochemical pharmacology* 49(4): 553-7.
- Platzer, P., M. B. Upender, K. Wilson, J. Willis, J. Lutterbaugh, A. Nosrati, J. K. Willson, D. Mack, T. Ried & S. Markowitz 2002. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer research* 62(4): 1134-8.
- Posner, M. R. & R. J. Mayer 1994. The use of serologic tumor markers in gastrointestinal malignancies. *Hematology/oncology clinics of North America* 8(3): 533-53.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein & K. W. Kinzler 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235-7.
- Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson & O. Radmark 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal* 21(21): 5864-74.
- Provost, P., R. A. Silverstein, D. Dishart, J. Walfridsson, I. Djupedal, B. Kniola, A. Wright, B. Samuelsson, O. Radmark & K. Ekwall 2002. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26): 16648-53.
- Purdie, C. A., J. O'Grady, J. Piris, A. H. Wyllie & C. C. Bird 1991. p53 expression in colorectal tumors. *The American journal of pathology* 138(4): 807-13.
- Pushparaj, P. N. & A. J. Melendez 2006. Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33(5-6): 504-10.

- Qian, L. Y., P. Li, X. R. Li, D. J. Chen & S. H. Zhu 2012. Multivariate analysis of molecular indicators for postoperative liver metastasis in colorectal cancer cases. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13(8): 3967-71.
- Qiu, G., W. Sun, Y. Zou, Z. Cai, P. Wang, X. Lin, J. Huang, L. Jiang, X. Ding & G. Hu 2015. RNA interference against TMEM97 inhibits cell proliferation, migration, and invasion in glioma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein & V. E. Velculescu 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418(6901): 934.
- Ramsay, R. G. & T. J. Gonda 2008. MYB function in normal and cancer cells. *Nature reviews. Cancer* 8(7): 523-34.
- Reya, T. & H. Clevers 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434(7035): 843-50.
- Sanchez Alvarado, A. & P. A. Newmark 1999. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9): 5049-54.
- Sawhney, R. S., G. H. Zhou, L. E. Humphrey, P. Ghosh, J. I. Kreisberg & M. G. Brattain 2002. Differences in sensitivity of biological functions mediated by epidermal growth factor receptor activation with respect to endogenous and exogenous ligands. *The Journal of biological chemistry* 277(1): 75-86.
- Schaeffer, H. J. & M. J. Weber 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology* 19(4): 2435-44.
- Sekikawa, K., J. W. Arends, C. P. Verstijnen, E. van der Linden, W. Dinjens, B. Schutte & F. T. Bosman 1988. Influence of implantation site on growth, antigen expression and metastatic potential of human colonic cancer HT29 and 5583 xenografts in nude mice. *Invasion & metastasis* 8(4): 238-52.
- Shah, M. A. & G. K. Schwartz 2001. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7(8): 2168-81.
- Sheffer, M., M. D. Bacolod, O. Zuk, S. F. Giardina, H. Pincas, F. Barany, P. B. Paty, W. L. Gerald, D. A. Notterman & E. Domany 2009. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(17): 7131-6.
- Shen, D. Y., Y. H. Zhan, Q. M. Wang, G. Rui & Z. M. Zhang 2013. Oncogenic potential of cyclin kinase subunit-2 in cholangiocarcinoma. *Liver*

international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 33(1): 137-48.

- Shephard, R. J. 1993. Exercise in the prevention and treatment of cancer. An update. *Sports medicine* 15(4): 258-80.
- Sieron, P., C. Hader, J. Hatina, R. Engers, A. Wlaziński, M. Müller & W. A. Schulz 2009. DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression. *British journal of cancer* 101(8): 1410-6.
- Smith, A. J., H. S. Stern, M. Penner, K. Hay, A. Mitri, B. V. Bapat & S. Gallinger 1994. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer research* 54(21): 5527-30.
- Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz, C. Wittekind & International Union against Cancer. 2010. TNM classification of malignant tumours Ed. 7th. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Spruck, C. H., M. P. de Miguel, A. P. Smith, A. Ryan, P. Stein, R. M. Schultz, A. J. Lincoln, P. J. Donovan & S. I. Reed 2003. Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science* 300(5619): 647-50.
- Stram, Y. & L. Kuzntsova 2006. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus genes* 32(3): 299-306.
- Strate, L. L. & S. Syngal 2005. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer causes & control : CCC* 16(3): 201-13.
- Subramaniam, V., I. R. Vincent, M. Gilakjan & S. Jothy 2007. Suppression of human colon cancer tumors in nude mice by siRNA CD44 gene therapy. *Experimental and molecular pathology* 83(3): 332-40.
- Suzuki, E., T. Ota, K. Tsukuda, A. Okita, K. Matsuoka, M. Murakami, H. Doihara & N. Shimizu 2004. nm23-H1 reduces in vitro cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 108(2): 207-11.
- Takahashi, Y., Y. Ishii, Y. Nishida, M. Ikarashi, T. Nagata, T. Nakamura, S. Yamamori & S. Asai 2006. Detection of aberrations of ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene (UBE2C) in advanced colon cancer with liver metastases by DNA microarray and two-color FISH. *Cancer genetics and cytogenetics* 168(1): 30-5.
- Tan, C. & X. Du 2012. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 18(37): 5171-80.

- Tanaka, F., S. Matsuzaki, K. Mimori, Y. Kita, H. Inoue & M. Mori 2011. Clinicopathological and biological significance of CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 overexpression in human gastric cancer. *International journal of oncology* 39(2): 361-72.
- Ting, T., R. Jamal, R. Harun, W. Z. Wan Ngah & N. M. Mokhtar 2015. RNA Interference-Mediated Knockdown on DKC1 Gene in Chemosensitized Colorectal Cancer Cell Lines. *International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms* 1(2).
- Toledo, F. & G. M. Wahl 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer* 6(12): 909-23.
- Tomonaga, T., K. Matsushita, S. Yamaguchi, M. Oh-Ishi, Y. Kodera, T. Maeda, H. Shimada, T. Ochiai & F. Nomura 2004. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(6): 2007-14.
- Trainer, D. L., T. Kline, F. L. McCabe, L. F. Faucette, J. Feild, M. Chaikin, M. Anzano, D. Rieman, S. Hoffstein, D. J. Li & et al. 1988. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *International journal of cancer* 41(2): 287-96.
- Tronov, V. A., Kramarenko, H, E. N. Maiorova & S. F. Zakharov 2007. [Mismatch repair (MMR) efficiency and MSH2 gene mutation in human colorectal carcinoma cell line COLO320HSR]. *Genetika* 43(4): 537-44.
- Vaucheret, H., C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, P. Mourrain, J. C. Palauqui & S. Vernhettes 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16(6): 651-9.
- Volchenboun, S. L., C. Li, S. Li, E. F. Attiyeh, C. P. Reynolds, J. M. Maris, A. T. Look & R. E. George 2009. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer research* 69(10): 4143-9.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal & R. A. Martienssen 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297(5588): 1833-7.
- von Kleist, S., E. Chany, P. Burtin, M. King & J. Fogh 1975. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *Journal of the National Cancer Institute* 55(3): 555-60.
- Wanebo, H. J., B. Rao, C. M. Pinsky, R. G. Hoffman, M. Stearns, M. K. Schwartz & H. F. Oettgen 1978. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a

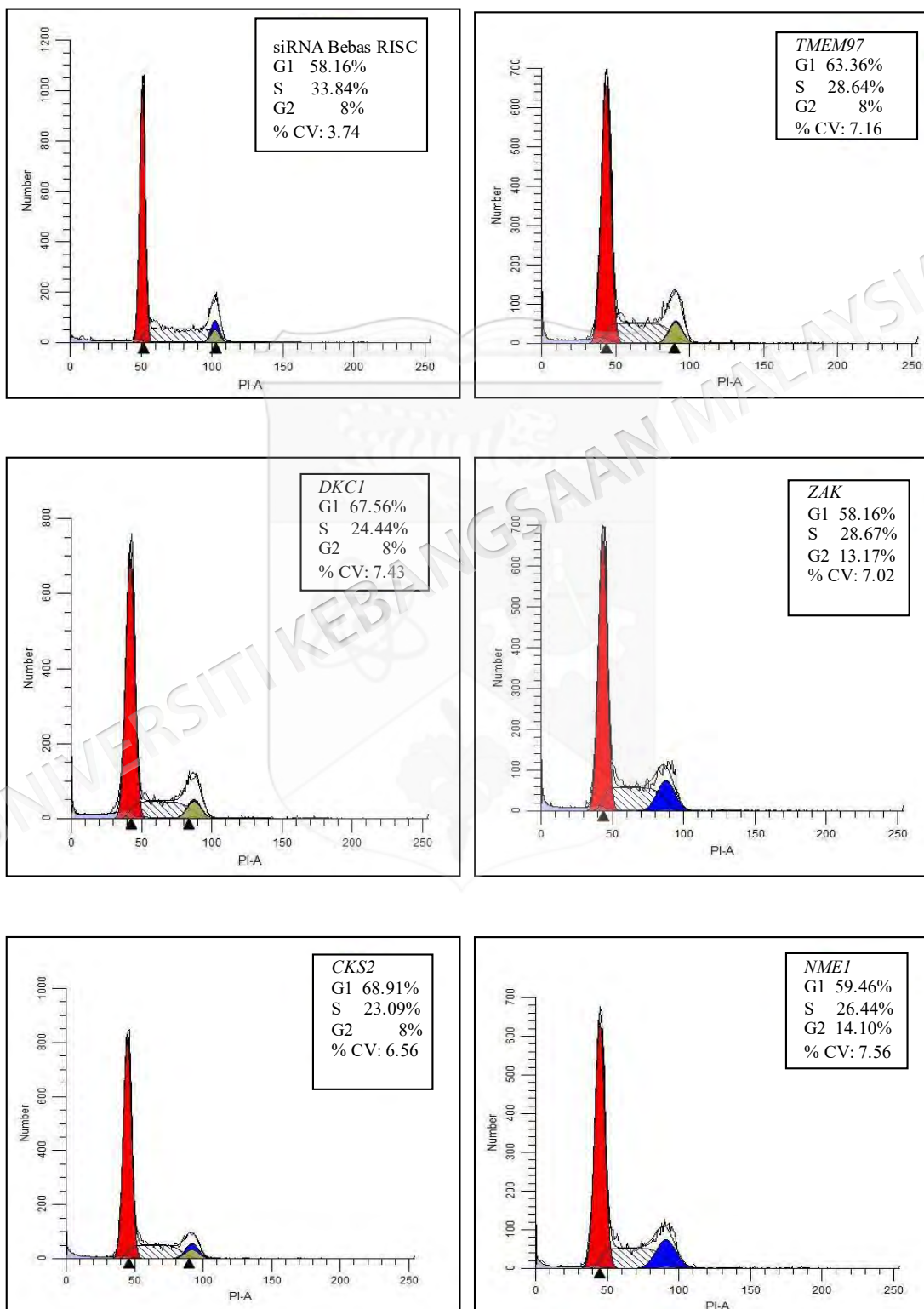
- prognostic indicator in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 299(9): 448-51.
- Wang, G., X. Wang, S. Wang, H. Song, H. Sun, W. Yuan, B. Cao, J. Bai & S. Fu 2008. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues. *International journal of colorectal disease* 23(7): 675-82.
- Wang, Y. F., C. J. Chang, J. H. Chiu, C. P. Lin, W. Y. Li, S. Y. Chang, P. Y. Chu, S. K. Tai & Y. J. Chen 2014. NM23-H1 expression of head and neck squamous cell carcinoma in association with the response to cisplatin treatment. *Oncotarget* 5(17): 7392-405.
- Wargelius, A., S. Ellingsen & A. Fjose 1999. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochemical and biophysical research communications* 263(1): 156-61.
- Waterhouse, P. M., M. W. Graham & M. B. Wang 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23): 13959-64.
- Waterhouse, P. M., N. A. Smith & M. B. Wang 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in plant science* 4(11): 452-457.
- Weitz, J., M. Koch, J. Debus, T. Hohler, P. R. Galle & M. W. Buchler 2005. Colorectal cancer. *Lancet* 365(9454): 153-65.
- Whitehurst, A. W., B. O. Bodemann, J. Cardenas, D. Ferguson, L. Girard, M. Peyton, J. D. Minna, C. Michnoff, W. Hao, M. G. Roth, X. J. Xie & M. A. White 2007. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* 446(7137): 815-9.
- Wianny, F. & M. Zernicka-Goetz 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature cell biology* 2(2): 70-5.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe & G. L. Johnson 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* 79(1): 143-80.
- Wilkins, C., R. Dishongh, S. C. Moore, M. A. Whitt, M. Chow & K. Machaca 2005. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436(7053): 1044-7.
- Willson, J. K., G. N. Bittner, T. D. Oberley, L. F. Meisner & J. L. Weese 1987. Cell culture of human colon adenomas and carcinomas. *Cancer research* 47(10): 2704-13.

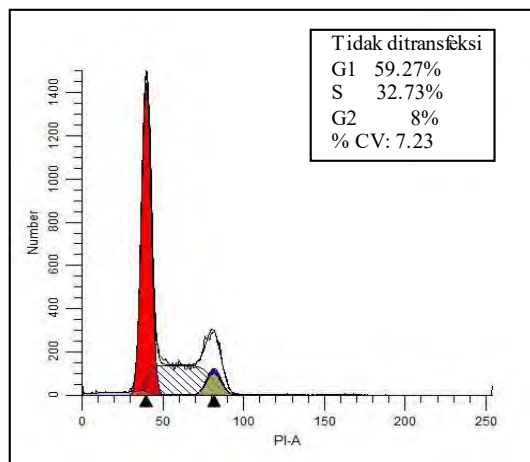
- Winawer, S. J., A. G. Zauber, H. Gerdes, M. J. O'Brien, L. S. Gottlieb, S. S. Sternberg, J. H. Bond, J. D. Wayne, M. Schapiro, J. F. Panish & et al. 1996. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine* 334(2): 82-7.
- Wolk, A., C. S. Mantzoros, S. O. Andersson, R. Bergstrom, L. B. Signorello, P. Lagiou, H. O. Adami & D. Trichopoulos 1998. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *Journal of the National Cancer Institute* 90(12): 911-5.
- Xia, F., C. W. Lee & D. C. Altieri 2008. Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis. *Cancer research* 68(6): 1826-33.
- Xie, J. & S. H. Itzkowitz 2008. Cancer in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 14(3): 378-89.
- Xie, K. M., X. F. Hou, M. Q. Li & D. J. Li 2010. NME1 at the human maternal-fetal interface downregulates titin expression and invasiveness of trophoblast cells via MAPK pathway in early pregnancy. *Reproduction* 139(4): 799-808.
- Xu, W. H., J. B. Zhang, Z. Dang, X. Li, T. Zhou, J. Liu, D. S. Wang, W. J. Song & K. F. Dou 2014. Long non-coding RNA URHC regulates cell proliferation and apoptosis via ZAK through the ERK/MAPK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *International journal of biological sciences* 10(7): 664-76.
- Xu, X. Y., L. J. Zhang, Y. Q. Yu, X. T. Zhang, W. J. Huang, X. C. Nie & G. Q. Song 2014. Down-regulated MAC30 expression inhibits proliferation and mobility of human gastric cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33(5): 1359-68.
- Yan, B. Y., D. W. Wang, Z. L. Zhu, Y. H. Yang, M. W. Wang, D. S. Cui, H. Zhang & X. F. Sun 2010. Overexpression of MAC30 in the cytoplasm of oral squamous cell carcinoma predicts nodal metastasis and poor differentiation. *Chemotherapy* 56(6): 424-8.
- Yang, C., C. Zhang, Z. Zhao, T. Zhu & B. Yang 2015. Fighting against kidney diseases with small interfering RNA: opportunities and challenges. *Journal of translational medicine* 13: 39.
- Yang, J. J. 2002. Mixed lineage kinase ZAK utilizing MKK7 and not MKK4 to activate the c-Jun N-terminal kinase and playing a role in the cell arrest. *Biochemical and biophysical research communications* 297(1): 105-10.
- Yang, J. J., Y. J. Lee, H. H. Hung, W. P. Tseng, C. C. Tu, H. Lee & W. J. Wu 2010. ZAK inhibits human lung cancer cell growth via ERK and JNK activation in an AP-1-dependent manner. *Cancer science* 101(6): 1374-81.

- Yeung, T. M., S. C. Gandhi, J. L. Wilding, R. Muschel & W. F. Bodmer 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8): 3722-7.
- Yin, M. B. & Y. M. Rustum 1991. Comparative DNA strand breakage induced by FUra and FdUrd in human ileocecal adenocarcinoma (HCT-8) cells: relevance to cell growth inhibition. *Cancer communications* 3(2): 45-51.
- Yu, H., M. R. Spitz, J. Mistry, J. Gu, W. K. Hong & X. Wu 1999. Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 91(2): 151-6.
- Zambon, R. A., V. N. Vakharia & L. P. Wu 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular microbiology* 8(5): 880-9.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp & D. P. Bartel 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101(1): 25-33.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb & T. A. Anderson 2006. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental biology* 289(1): 3-16.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb & T. A. Anderson 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology* 302(1): 1-12.
- Zhang, H., F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy & W. Filipowicz 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal* 21(21): 5875-85.
- Zhao, Z. R., L. J. Zhang, X. Q. He, Z. Y. Zhang, F. Zhang, F. Li, Y. B. Pei, Y. M. Hu, M. W. Wang & X. F. Sun 2011. Significance of mRNA and Protein Expression of MAC30 in Progression of Colorectal Cancer. *Chemotherapy* 57(5): 394-401.

LAMPIRAN A

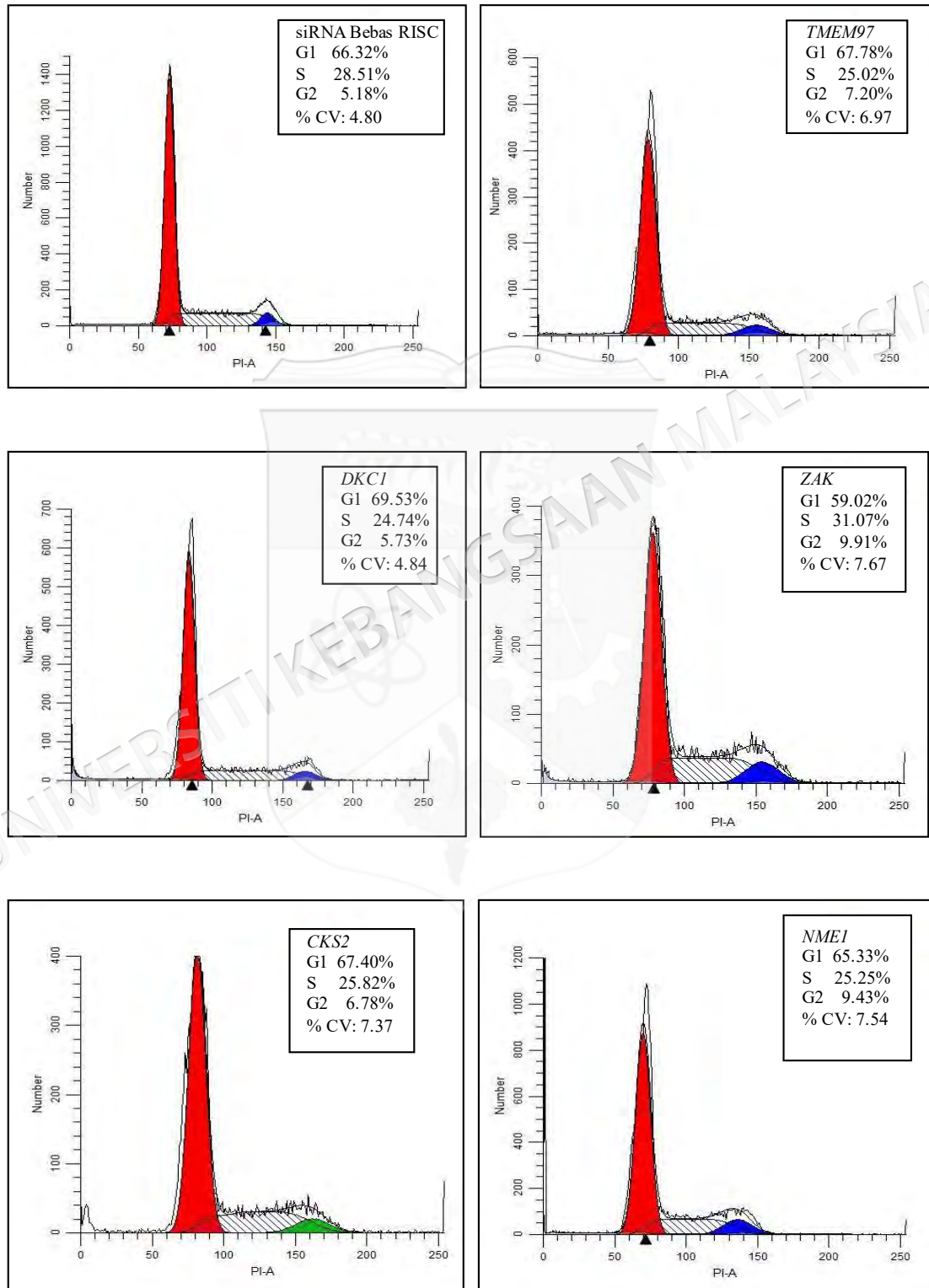
Perwakilan Analisis Kitaran Sel HCT116 Selepas 48 Jam Tempoh Transfeksi Dengan Menggunakan Aliran Sitometri.

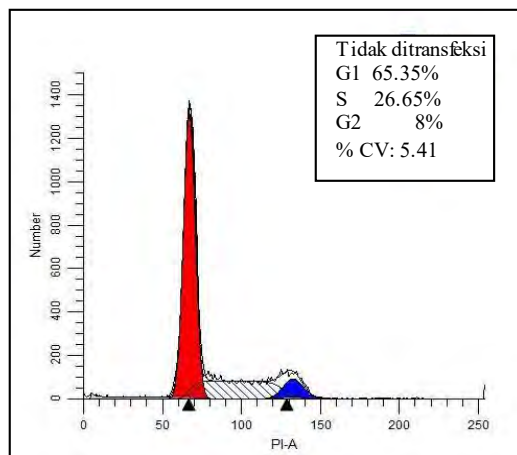




LAMPIRAN B

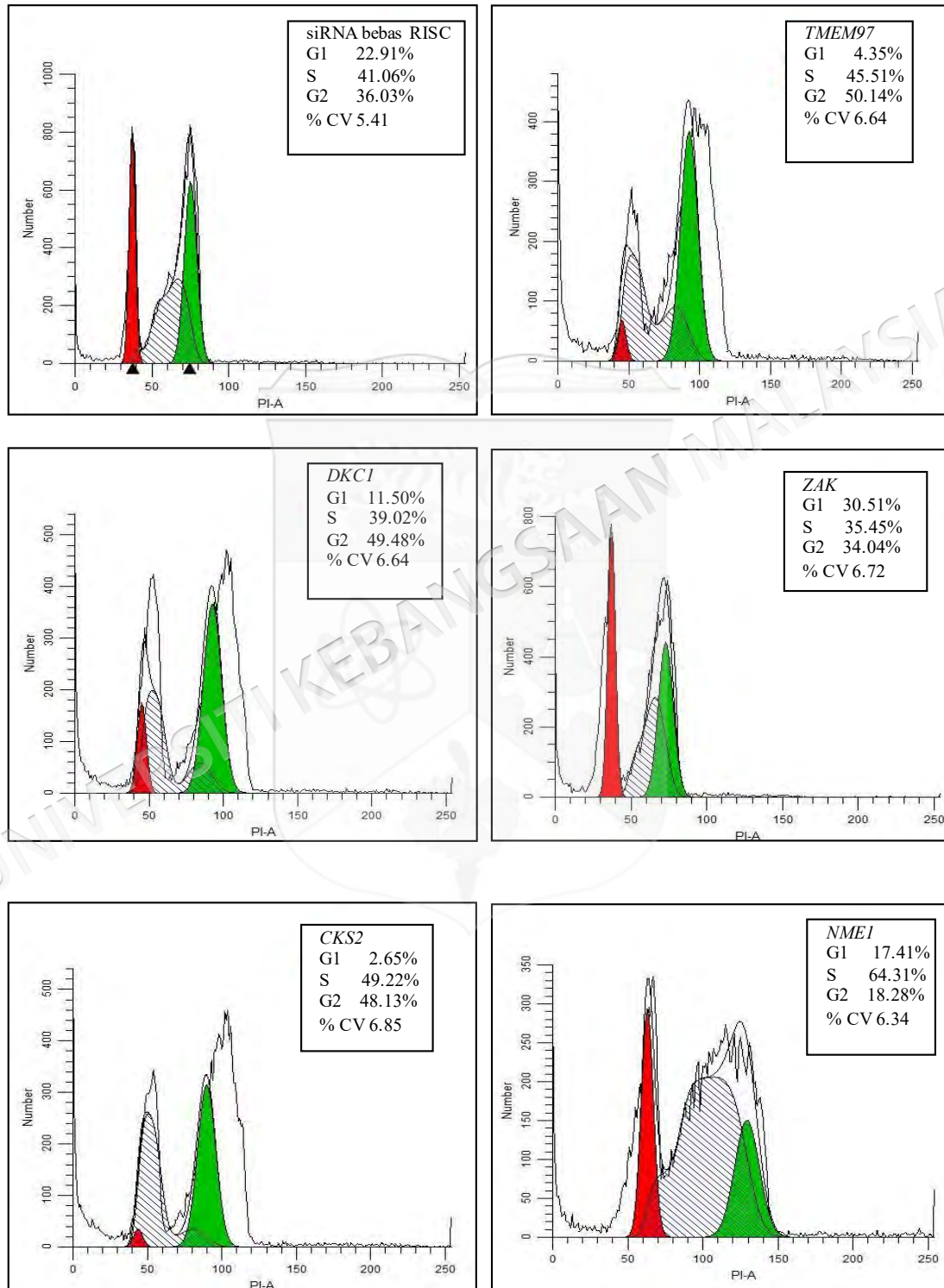
Perwakilan Analisis Kitaran Sel HT-29 Selepas 48 Jam Tempoh Transfeksi Dengan Menggunakan Aliran Sitometri.

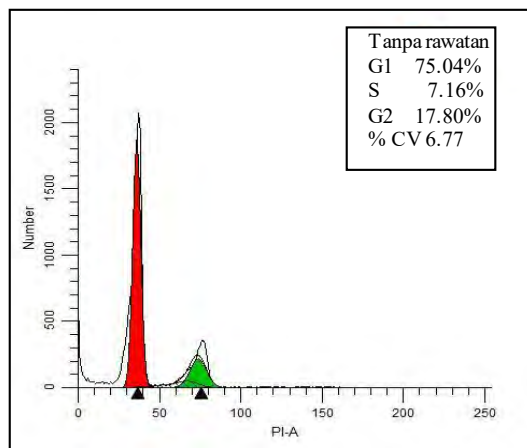




LAMPIRAN C

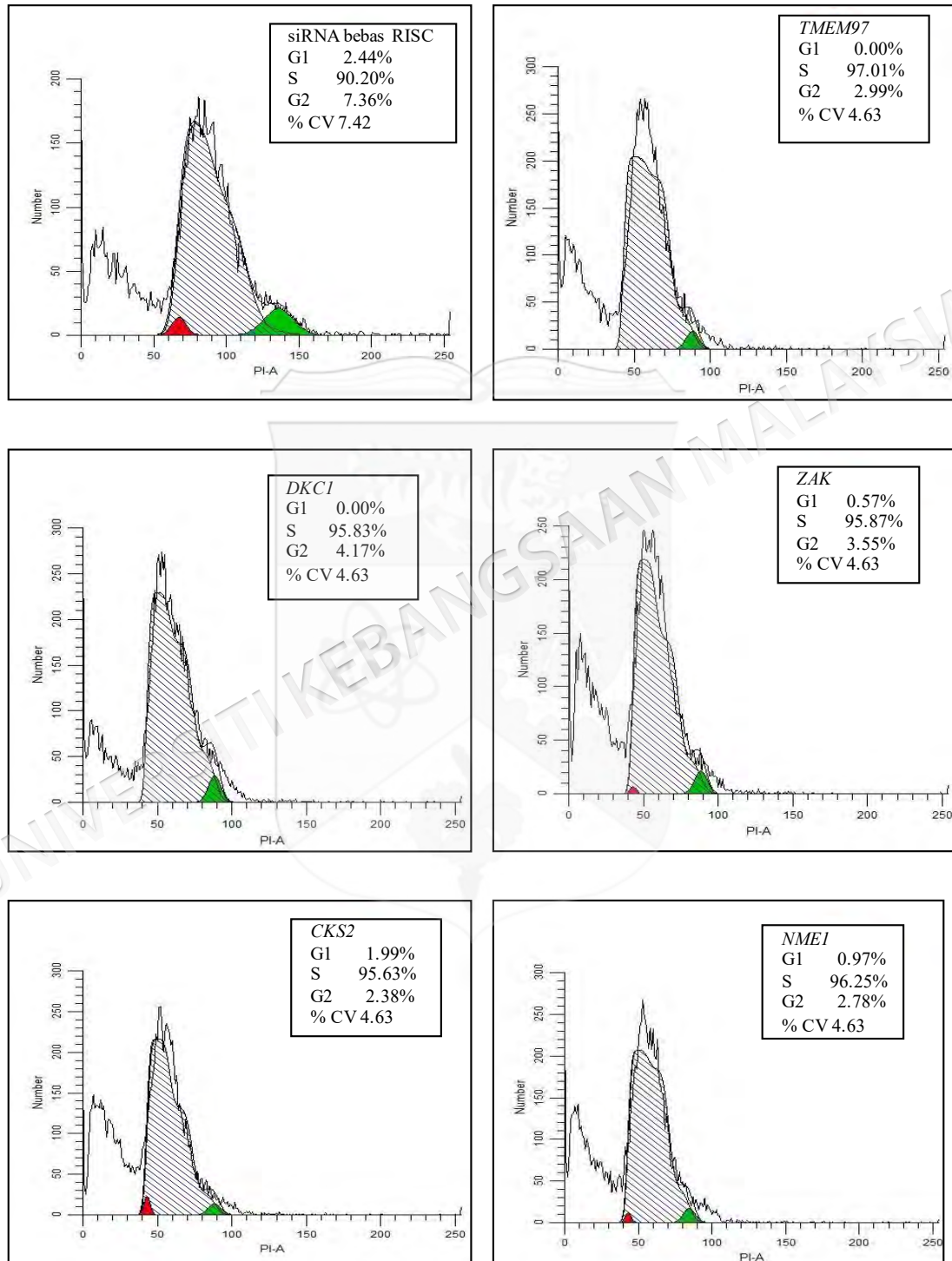
Perwakilan Analisis Kitaran Sel HCT116 Selepas Gabungan Transfeksi siRNA Dan 5-FU Dengan Menggunakan Aliran Sitometri.

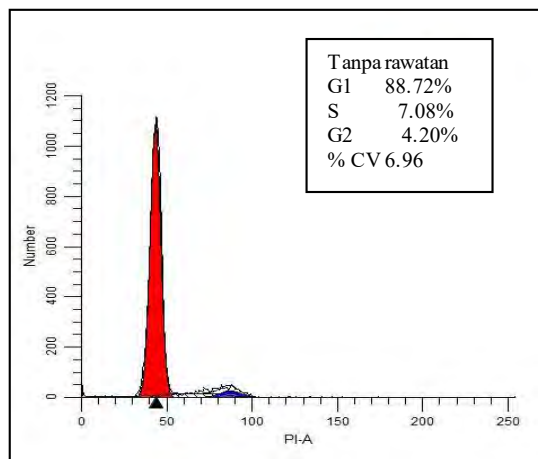




LAMPIRAN D

Perwakilan Analisis Kitaran Sel HT-29 Selepas Gabungan Transfeksi siRNA Dan 5-FU Dengan Menggunakan Aliran Sitometri.





LAMPIRAN E

Penerbitan

Ting, T., R. Jamal, R. Harun, W. Z. Wan Ngah & N. M. Mokhtar 2015. RNA Interference-Mediated Knockdown on DKC1 Gene in Chemosensitized Colorectal Cancer Cell Lines. *International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms* 1(2).

