

**KAJIAN TERHADAP ELEMEN PENGAWAL
ATURAN HULUAN YANG MENYOKONG
EKSPRESI KLF6 YANG BERKAIT
DENGAN PENGALAK SUPER
DALAM KANSER BUAH
PINGGANG**

NURUL NADIA BINTI MOHAMAD ZAMBERI

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

KAJIAN TERHADAP ELEMEN PENGAWALATURAN HULUAN YANG
MENYOKONG EKSPRESI KLF6 YANG BERKAIT DENGAN
PENGALAK SUPER DALAM KANSER BUAH PINGGANG

NURUL NADIA BINTI MOHAMAD ZAMBERI

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH
IJAZAH DOKTOR FALSAFAH

INSTITUT BIOLOGI MOLEKUL PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR
2025

	UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07	No. Semakan: 01	Tarikh Kuat Kuasa: 01/04/2024
	BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS SELEPAS PEMBETULAN Form and Check List of Amended Thesis Submission		

G. PERAKUAN TESIS SARJANA / DOKTOR FALSAFAH (CERTIFICATION OF MASTERS / DOCTORAL THESIS)			
Nama penuh pengarang (Author's Full Name)	Nurul Nadia Binti Mohamad Zamberi		
No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.)	P112522	Sesi Akademik (Academic Session)	2024/2025
Tajuk Tesis (Thesis Title)	Kajian Terhadap Elemen Pengawalan Hulu Yang Menyokong Ekspresi KLF6 Yang Berkait Dengan Penggalak Super Dalam Kanser Buah Pinggang		

Merujuk kepada Klausa 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai (*Tandakan ✓ bagi maklumat yang berkaitan):
 (With regard to Clause 4.2 of the UKM Student Intellectual Property Policy (Supplementary), the thesis is the student's property. I hereby declare this thesis as (*Mark ✓ on relevant information):

- ☐ ***RAHSIA (CONFIDENTIAL)** Mengandungi maklumat rahsia di bawah AKTA RAHSIA RASMI 1972
 (Consisting of classified information under the OFFICIAL SECRETS ACT 1972)
- ☐ ***TERHAD (RESTRICTED)** Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/ badan di mana penyelidikan dijalankan
 (Consisting of RESTRICTED information which has been determined by the organization/ body where the research was conducted)
- ☒ ***AKSES TERBUKA/ TIDAK TERHAD (OPEN ACCESS/ NON-RESTRICTED)** Saya membenarkan tesis ini diterbitkan secara akses terbuka, teks penuh atau dibuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
 (I allow this thesis to be published through open access, full text or copied for study, learning and research purposes only)

Bagi kategori Akses Terbuka / Tidak Terhad, saya membenarkan tesis (Sarjana / Doktor Falsafah) ini di simpan di Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)* dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

(For the Open Access / Non-Restricted category, I allow this (Master's / Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

- Perpustakaan UKM mempunyai hak untuk membuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
 (UKM Library has the right to reproduce the thesis for study, learning and research purposes only.)
- Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia dibenarkan membuat satu (1) salinan tesis ini untuk tujuan pertukaran antara institusi pengajian tinggi dan mana-mana badan/ agensi kerajaan, tertakluk kepada terma dan syarat.
 (UKM Library is allowed to make one (1) copy of this thesis for exchange purposes among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)



UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07

No. Semakan: 01

Tarikh Kuat Kuasa:
01/04/2024

**BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS SELEPAS
PEMBETULAN**
Form and Check List of Amended Thesis Submission

PENGESAHAN PELAJAR (<i>STUDENT VERIFICATION</i>)	PENGESAHAN PENYELIA (<i>SUPERVISOR VERIFICATION</i>)
TANDATANGAN PELAJAR (<i>STUDENT'S SIGNATURE</i>)	TANDATANGAN PENYELIA / Pengerusi JK Siswazah (<i>SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON SUPERVISION COMMITTEE SIGNATURE</i>)
Kad Pengenalan /: No. Pasport (<i>Identity Card / Passport No.</i>)	Nama Penyelia/ Pengerusi JK Siswazah (<i>Supervisor's / Chairperson Supervision Committee Name</i>)
Tarikh: (<i>Date</i>)	Tarikh: (<i>Date</i>)

PENGAKUAN

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

25 Mac 2025

NURUL NADIA BINTI
MOHAMAD ZAMBERI
P112522

PENGHARGAAN

Alhamdulillah, saya bersyukur ke hadrat Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang kerana memberikan kekuatan dan ketabahan kepada saya untuk menyelesaikan kajian Ph.D ini sehingga selesai. Saya merakamkan ucapan setinggi penghargaan kepada Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS/1/2020/SKK0/UKM/03/3) daripada Kementerian Pengajian Tinggi (KPT) di atas sokongan sumber kewangan dan bantuan sara hidup untuk saya menjalankan dan seterusnya menyelesaikan kajian ini dengan jayanya.

Setinggi-tinggi penghargaan dan ucapan terima kasih yang tidak ternilai saya panjangkan kepada penyelia saya, Ts. Dr. Saiful Effendi Syafruddin, yang banyak memberi sokongan, nasihat dan tunjuk ajar sepanjang kajian ini dijalankan. Beliau telah banyak memberi bimbingan dari mula saya mendaftar sebagai pelajar Ph.D sehinggalah ke akhir penyelidikan saya di UMBI. Bimbingan, nasihat dan saranan penambahbaikan yang berterusan daripada beliau telah membolehkan saya menjalankan dan menamatkan kajian Ph.D saya di UMBI. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada penyelia bersama, Ts. Dr. Mohamad Aimanuddin Mohtar dan Prof. Madya Dr. Low Teck Yew, kerana turut membantu saya dalam merangka kerja-kerja makmal dan sedikit sebanyak memberikan nasihat serta sokongan dalam menjalankan kajian ini.

Di kesempatan ini juga saya ingin merakamkan ucapan terima kasih kepada insan tersayang yang sentiasa berada di samping saya memberi sokongan dan menyuntik semangat dalam diri saya. Kepada ayah saya, Mohamad Zamberi, ibu saya, Juriah Soho dan adik beradik saya, Teha, Inah dan Jidah, jutaan terima kasih saya ucapkan. Tidak dilupakan juga buat suami tercinta, Ahmad Haziq yang sentiasa bersama saya pada waktu suka dan duka. Terima kasih awak. Kepada anak ibu, Ahmad Ehsan yang menjadi peneman waktu malam ibu sejak dalam kandungan sepanjang proses penulisan tesis ini. Kini, setelah lapan bulan berlalu dan tesis ini berjaya dijilidkan, ibu bersyukur kerana dapat menutup satu lembaran perjuangan ini denganmu di sisi. Semoga engkau membesar dengan sihat, menjadi anak yang soleh dan berbakti kepada agama, bangsa dan negara. Aamiin YRA.

Seterusnya, terima kasih buat rakan-rakan UMBI, Kak Hasanah, Syaza, Lina, Mira, Kak Miza, Alyssa, Kak Lina, Fariha yang sentiasa memberi sokongan ketika saya memerlukan. Akhir kata, terima kasih atas segala sumbangan dan doa yang dititipkan kepada saya, sama ada secara langsung atau tidak langsung. Semoga Allah memberkati kalian.

ABSTRAK

Ekspresi *Kruppel-like factor 6* (KLF6) dalam subjenis kanser sel renal subjenis sel jelas (ccRCC) diaruh oleh *super enhancer* atau penggalak super (SE). KLF6 memainkan peranan penting dalam mengawal laluan isyarat yang menghubungkan beberapa fenotip utama ccRCC. Penggalak super mempunyai kromatin terbuka yang luas dan diikat oleh pelbagai komponen yang mengawal atur proses epigenetik dan transkripsi aktif gen yang berkaitan. Walau bagaimanapun, komponen yang membentuk dan mengatur landskap penggalak super *KLF6* masih kurang jelas. Justeru, tujuan kajian ini adalah untuk mengenalpasti molekul yang berperanan dalam mengawal penggalak super *KLF6* dan mengaruh ekspresi tinggi gen ini dalam ccRCC. Bagi mencapai objektif ini, aktiviti pengatur utama penggalak super, BRD4 and P300, direncatkan secara kimia serta kawasan penggalak super dideasetilasi menggunakan teknik CRISPR-dCas9. Selain itu, MEF2C yang merupakan antara calon pengatur hulu *KLF6* juga disasarkan secara genetik. Perencatan aktiviti BRD4 dan P300 menjejaskan kadar pertumbuhan sel ccRCC, mengurangkan tahap isyarat H3K27ac dan merendahkan ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ*. Deasetilasi beberapa konstituen tunggal penggalak super *KLF6* juga mengurangkan tahap isyarat H3K27ac dan ekspresi *KLF6*. Tahap pengekspresan *KLF6* juga berkurang apabila *MEF2C* disasarkan dengan menggunakan teknik CRISPRi dan RNAi. Ikatan langsung MEF2C di kawasan promoter *KLF6* divalidasi menggunakan teknik MEF2C ChIP-qPCR. Pengenalan semula eksogen *MEF2C* meningkatkan kembali tahap ekspresi *KLF6* yang seterusnya mengesahkan peranan MEF2C dalam mengawal atur proses transkripsi *KLF6*. Namun begitu, penyasaran *MEF2C* dalam sel ccRCC tidak memberikan kesan ke atas migrasi sel. Selain itu, penyasaran MEF2C menurunkan viabiliti sel secara signifikan selepas rawatan dengan *sunitinib*, manakala tiada perubahan signifikan diperhatikan dengan *everolimus*. Tambahan pula, penyasaran MEF2C meningkatkan potensi pembentukan koloni dalam sel ccRCC. Secara kolektifnya, kajian ini merungkaikan peranan BRD4 dan P300 dalam mengekalkan landskap penggalak super yang aktif dan mendorong ekspresi tinggi *KLF6* dalam ccRCC. Selain itu, hasil kajian mendapati MEF2C mampu bergabung bersama elemen pengaturan *KLF6* dan turut terlibat dalam mengaktifkan transkripsi ekspresi *KLF6* dalam ccRCC. Dapat disimpulkan bahawa penemuan ini mengetengahkan petunjuk penting terhadap penghasilan ccRCC yang berkembang disekitar *KLF6* yang diaruh oleh penggalak super. Justeru, hasil kajian ini boleh membuka laluan untuk penyelidikan masa hadapan terutamanya dalam pembangunan strategi terapeutik ccRCC baharu.

ELUCIDATING THE UPSTREAM REGULATORY ELEMENTS THAT SUPPORT THE SUPER ENHANCER ASSOCIATED KLF6 EXPRESSION IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA (CCRCC)

ABSTRACT

Kruppel-like factor 6 (KLF6), a super enhancer (SE)-driven transcription factor, plays pivotal role in regulating signalling loop that links several clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) hallmark features. Super enhancer is characterised by large, opened chromatin regions that are bound by many epigenetic and transcription regulators, which drive high expression of the respective gene. Nonetheless, the components that regulate the KLF6 super enhancer landscape remains elusive. Hence, this study aims to identify the components that establish the KLF6 super enhancer and drive the expression of this ccRCC-dependent gene. To attain this objective, the activities of super enhancer regulators BRD4 and P300 were chemically perturbed as well as deacetylating proximal super enhancer regions using the CRISPR-dCas9 tool. Genetic approaches were also performed to target *MEF2C*, a putative KLF6 upstream regulator. Chemical inhibition of BRD4 and P300 activities impaired ccRCC cells growth. Notably, a reduction in H3K27ac signals and downregulation of KLF6 and its downstream target PDGF β were also observed. Moreover, deacetylation of individual *KLF6* proximal super enhancer regions also reduced H3K27ac signals and *KLF6* expression levels. CRISPRi and RNAi-mediated *MEF2C* repression resulted in *KLF6* downregulation. MEF2C direct binding at the *KLF6* promoter region was confirmed by MEF2C ChIP-qPCR. Reintroduction of exogenous *MEF2C* into MEF2C-targeted ccRCC cells upregulated *KLF6* expression, thus corroborating MEF2C role as one of the *KLF6* upstream regulators. Additionally, targeting MEF2C significantly reduced cell viability following treatment with sunitinib, whereas no significant changes were observed with everolimus. Furthermore, targeting MEF2C enhances the potential for colony formation in ccRCC cells. Collectively, this study sheds light on the roles of BRD4 and P300 in maintaining transcriptionally-active super enhancer landscape and driving the high expression of pro-oncogenic *KLF6* in ccRCC. Besides, MEF2C was found to bind at the KLF6 regulatory elements and also involve in transactivating *KLF6* expression in ccRCC. In conclusion, these findings provide important jigsaws for the construction of ccRCC molecular dependency that revolve around super enhancer-driven KLF6. Moreover, this insight could pave the way for future studies especially for the development of novel ccRCC therapeutic strategies.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xii
SENARAI RAJAH	xiv
SENARAI SIMBOL	xxiv
SENARAI SINGKATAN	xxv
BAB I PENGENALAN	
1.1 Pendahuluan	1
1.2 Kepentingan Kajian	6
1.3 Permasalahan Kajian	9
1.4 Objektif Kajian	9
1.4.1 Objektif umum	9
1.4.2 Objektif khusus	9
1.5 Hipotesis Kajian	10
BAB II KAJIAN LITERASI	
2.1 Pengenalan Kanser	11
2.2 Pengenalan Sistem Buah Pinggang	15
2.3 Pengenalan Kanser Buah Pinggang	18
2.4 Simptom Dan Risiko Penyakit Kanser Buah Pinggang	20
2.5 Jenis Kanser Sel Renal (RCC)	22
2.6 Pengenalan Dan Ciri Utama ccRCC	23
2.6.1 Ciri molekul ccRCC	25
2.6.2 Gen VHL	27
2.6.3 Pengesanan oksigen dan tumorigenesis	27
2.6.4 Laluan isyarat mTORC1	30
2.6.5 Gangguan tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC	32

2.7	Penyahkawalaturan Proses Transkripsi Dalam Kanser	34
2.8	Mekanisma Pengawalaturan Proses Epigenetik	36
2.8.1	Modifikasi histon	37
2.8.2	Metilasi DNA	39
2.8.3	Kawasan promoter dan penggalak	41
2.8.4	Kawasan kromatin terbuka (<i>open chromatin</i>)	42
2.8.5	BRD4	44
2.8.6	P300	45
2.9	Penggalak Super Dan Kanser	46
2.10	Pengenalan KLF6	49
2.10.1	Peranan KLF6 dalam fisiologi normal dan tumorigenesis	49
2.11	Faktor Transkripsi MEF2C	51
BAB III	KAEDAH KAJIAN	
3.1	Bahan Dan Radas	53
3.1.1	Bahan kimia, reagen dan kit	53
3.1.2	Plasmid	55
3.1.3	Konstruk sgRNA dan shRNA, dan jujukan primer	56
3.1.4	Radas dan instrumen makmal	57
3.2	Rekabentuk Eksperimen	58
3.3	Sel Kultur	61
3.3.1	Sel selanjar ccRCC dan kondisi pengkulturan	61
3.3.2	Pencairan sel krio	61
3.3.3	Subkultur sel selanjar	62
3.3.4	Pengawetan krio sel selanjar	62
3.3.5	Pengiraan sel menggunakan <i>Invitrogen Countess Automated Cell Counter</i>	63
3.4	Pengesahan Fungsi Molekul BRD4 Dan P300 Dalam Menyokong Penggalak Super <i>KLF6</i> Dan Ekspresi <i>KLF6</i> Secara Penyasaran Kimia	63
3.4.1	Rawatan JQ1 dan A-485 terhadap asai viabiliti sel	64
3.4.2	Rawatan JQ1 dan A-485 terhadap asai pembentukan koloni	65
3.4.3	Pengekstrakan RNA	66
3.4.4	Sintesis cDNA	67
3.4.5	Analisis tahap ekspresi <i>KLF6</i> dan sasaran hiliran <i>PDGFβ</i> menggunakan qPCR	68
3.4.6	Analisis tahap isyarat H3K27ac pada lokus <i>KLF6</i> menggunakan ChIP-qPCR	69
3.4.7	Pengekstrakan dan kuantifikasi protein	74

	3.4.8	Pemblotan Western	75
3.5		Deasetilasi Histon Pada Lokus Penggalak Super <i>KLF6</i>	78
	3.5.1	Mutagenesis terarah pada plasmid dCas9-hHDAC3	78
	3.5.2	Penghasilan <i>E.coli</i> yang kompeten secara kimia	80
	3.5.3	Transformasi bakteri	81
	3.5.4	Pengekstrakan plasmid menggunakan kit <i>Monarch® Plasmid Miniprep</i>	81
	3.5.5	Penghasilan partikel lentiviral plasmid dCas9-hHDAC3	82
	3.5.6	Transduksi plasmid dCas9-hHDAC3 ke dalam sel ccRCC	82
	3.5.7	Penghasilan partikel lentiviral plasmid pKLV-Puro_sgRNA	83
	3.5.8	Transduksi plasmid pKLV-Puro_sgRNA ke dalam sel ccRCC	84
	3.5.9	Analisis tahap ekspresi gen <i>KLF6</i> menggunakan qPCR	84
	3.5.10	Analisis tahap isyarat H3K27ac pada lokus <i>KLF6</i> menggunakan ChIP-qPCR	84
3.6		Penyenyapan Ekspresi MEF2C Dalam Sel ccRCC	85
	3.6.1	Rekabentuk dan pengklonan iMEF2C ke dalam plasmid pKLV-Hygro	85
	3.6.2	Penulenan konstruk iMEF2C menggunakan kit <i>Monarch PCR and DNA Cleanup</i>	87
	3.6.3	Pencernaan iMEF2C dan plasmid pKLV-Hygro	87
	3.6.4	Elektroforesis gel dan penulenan plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna menggunakan kit <i>Monarch DNA Gel Extraction</i>	88
	3.6.5	Ligasi konstruk iMEF2C dalam plasmid pKLV-Hygro	89
	3.6.6	Pencernaan pKLV-Hygro_iMEF2C-AaRI	90
	3.6.7	Ligasi fragmen " <i>sgRNA scaffold-U6 promoter</i> " dalam plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-AarI	90
	3.6.8	Transformasi bakteri	91
	3.6.9	Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC	91
	3.6.10	Rekabentuk dan pengklonan shMEF2C	92
	3.6.11	Pencernaan konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP	93
	3.6.12	Ligasi konstruk shMEF2C dalam plasmid sGEP	94
	3.6.13	Transformasi bakteri	95
	3.6.14	Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC	95
	3.6.15	Analisis tahap ekspresi gen MEF2C dan <i>KLF6</i>	96
	3.6.16	Analisis tahap isyarat MEF2C pada lokus <i>KLF6</i> (ChIP-qPCR)	97

3.7	Pengekspresan Eksogenus <i>MEF2C</i>	97
3.7.1	Penggandaan dan pengklonan jujukan MEF2C dan FLAG MEF2C	97
3.7.2	Pencernaan MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro	98
3.7.3	Ligasi MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro	99
3.7.4	Transformasi bakteria	100
3.7.5	Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC	100
3.7.6	Penghubungan penanda FLAG dalam MEF2C CDS	101
3.7.7	Pencernaan konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro	102
3.7.8	Ligasi FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro	102
3.7.9	Transformasi bakteria	103
3.7.10	Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC	103
3.7.11	Analisis tahap isyarat MEF2C dan FLAG pada kawasan promotor <i>KLF6</i> (ChIP-qPCR/FLAG ChIP-qPCR)	104
3.8	Penilaian Kesan Fenotip Penyenyapan Ekspresi Faktor Transkripsi MEF2C Dalam Model In Vitro ccRCC	105
3.8.1	Asai migrasi sel	105
3.8.2	Asai viabiliti sel menggunakan perencat kimia <i>sunitinib</i> dan <i>everolimus</i>	105
3.8.3	Asai pembentukan koloni	107
3.9	Analisis Statistik	108

BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1	Peranan BRD4 Dan P300 Dalam Menyokong Penggalak Super <i>KLF6</i>	109
4.1.1	Penilaian tahap viabiliti sel ccRCC yang dirawat dengan JQ1 dan A-485	110
4.1.2	Penilaian keupayaan pembentukan koloni sel ccRCC yang dirawat dengan JQ1 dan A-485	114
4.1.3	Rawatan JQ1 dan A-485 mengurangkan tahap ekspresi <i>KLF6</i> dalam sel ccRCC	118
4.1.4	Pengurangan tahap isyarat H3K27ac pada wilayah penggalak gen <i>KLF6</i> selepas rawatan JQ1 dan A-485	121
4.1.5	Pengurangan tahap ekspresi <i>PDGFβ</i> dan tapak laluan isyarat mTORC1	125

4.2	Peranan Asetilasi Lisin 27 Histon 3 (H3K27ac) Dalam Menyokong Landskap Dan Aktiviti Penggalak Super <i>KLF6</i>	132
4.2.1	Mutagenesis terarah dalam plasmid dCas9-hHDAC3	135
4.2.2	Deasetilasi H3K27ac pada wilayah promotor dan penggalak <i>KLF6</i> iSE_1 mengurangkan tahap ekspresi gen <i>KLF6</i>	138
4.3	Penyenyapan Ekspresi <i>MEF2C</i> Dalam Sel ccRCC Menggunakan Teknologi Gangguan CRISPR (CRISPRi).	142
4.3.1	Penjanaan sel ccRCC yang mengalami penindasan ekspresi endogen <i>MEF2C</i>	147
4.3.2	Ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> berkurang dalam sel janaan menggunakan teknologi CRISPRi.	150
4.4	Penindasan Ekspresi <i>MEF2C</i> Dalam Sel ccRCC Menggunakan Teknologi Gangguan RNA (RNAi)	152
4.4.1	Ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> berkurang dalam sel janaan menggunakan teknologi RNAi.	157
4.4.2	Pengurangan ikatan <i>MEF2C</i> pada wilayah promotor <i>KLF6</i> dalam sel ccRCC yang mengalami penindasan ekspresi <i>MEF2C</i>	158
4.5	Pengekspresan Eksogenus <i>MEF2C</i> Dalam Sel ccRCC	163
4.6	Kesan Penyenyapan <i>MEF2C</i> Ke Atas Sel ccRCC In vitro	170
4.6.1	Penyenyapan <i>MEF2C</i> tidak memberikan kesan dalam asai migrasi sel	171
4.6.2	Penyenyapan <i>MEF2C</i> menurunkan tahap viabiliti sel selepas rawatan <i>sunitinib</i> dan tidak memberikan kesan signifikan dengan <i>everolimus</i>	173
4.6.3	Penyenyapan <i>MEF2C</i> meningkatkan potensi pembentukan koloni dalam sel in vitro.	177

BAB V

PERBINCANGAN

5.1	Modulasi Epigenetik Dalam Sel ccRCC	179
5.1.1	BRD4 dan P300 menyokong penggalak super <i>KLF6</i> dalam sel ccRCC	181
5.1.2	Deasetilasi histon memberi kesan terhadap pembentukan struktur kromatin dan aktiviti penggalak super <i>KLF6</i> .	185
5.2	<i>KLF6</i> Dan Pengisyaratan mTORC1 Dalam Sel ccRCC	188
5.3	Hubungan Faktor Transkripsi <i>MEF2C</i> Dan <i>KLF6</i>	191

BAB VI	KESIMPULAN	
6.1	Rumusan Kajian	194
6.2	Limitasi Kajian	196
6.3	Cadangan Kajian Lanjutan	199
RUJUKAN		201
LAMPIRAN		
Lampiran A	Gambarajah Peta Plasmid	228
Lampiran B	Maklumat Sel Yang Digunakan Dalam Kajian	231
Lampiran C	Persediaan Penimbal ChIP	234
Lampiran D	Persediaan Pemblotan Western	235
Lampiran E	Senarai Pembentangan Dalam Persidangan	237
Lampiran F	Senarai Anugerah Dan Pencapaian	243
Lampiran G	Senarai Penerbitan	244

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 3.1	Konstruk sgRNA dan shRNA	56
Jadual 3.2	Senarai primer yang digunakan	56
Jadual 3.3	Kondisi bagi tindakbalas transkripsi berbalik	67
Jadual 3.4	Senarai prob TaqMan	68
Jadual 3.5	Penyediaan reagen untuk qPCR	68
Jadual 3.6	Kondisi qPCR bagi analisis ekspresi gen	69
Jadual 3.7	Antibodi yang digunakan dalam ChIP-qPCR	71
Jadual 3.8	Penyediaan reagen untuk qPCR	72
Jadual 3.9	Kondisi qPCR bagi analisis primer yang dipilih	72
Jadual 3.10	Senarai antibodi primer dan sekunder yang digunakan dalam pemblotan Western	76
Jadual 3.11	Primer yang digunakan dalam mutagenesis terarah	79
Jadual 3.12	Penyediaan reagen untuk PCR gradien	79
Jadual 3.13	Program PCR bagi analisis primer	80
Jadual 3.14	Penyediaan reagen untuk amplifikasi iMEF2C	86
Jadual 3.15	Kondisi PCR untuk amplifikasi iMEF2C	87
Jadual 3.16	Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid	88
Jadual 3.17	Penyediaan reagen untuk rawatan <i>Antartic Phosphatase</i> (AnP)	88
Jadual 3.18	Penyediaan reagen untuk ligasi iMEF2C	90
Jadual 3.19	Penyediaan reagen untuk PCR bagi pengklonan shMEF2C	92
Jadual 3.20	Kondisi program PCR pengklonan shMEF2C	93
Jadual 3.21	Penyediaan reagen untuk pencernaan konstruk shMEF2C	94
Jadual 3.22	Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid sGEP	94
Jadual 3.23	Antibodi yang digunakan dalam MEF2C ChIP-qPCR	97

Jadual 3.24	Penyediaan reagen untuk amplifikasi MEF2C CDS	98
Jadual 3.25	Kondisi PCR untuk amplifikasi MEF2C CDS	98
Jadual 3.26	Penyediaan reagen untuk pencernaan konstruk shMEF2C	99
Jadual 3.27	Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid pLVX-Hygro	99
Jadual 3.28	Antibodi yang digunakan dalam MEF2C ChIP-qPCR dan FLAG ChIP-qPCR	104



SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
Rajah 1.1	Ilustrasi yang menunjukkan ekspresi KLF6 dalam ccRCC diaruh oleh penggalak super. KLF6 berada di tengah pusat pengisyaratan sel yang menghubungkan tapak laluan isyarat mTORC1 dan laluan homeostasis lipid melalui pengaktifan ekspresi gen PDGFB. Selain itu, KLF6 juga mengaktifkan transkripsi gen SREBF2 yang merupakan faktor transkripsi utama yang mengawal atur laluan homeostasis lipid.	5
Rajah 1.2	Ilustrasi jurang pengetahuan yang masih kurang jelas berdasarkan penemuan penyelidikan terdahulu. Dua jurang pengetahuan yang dikaji secara spesifik dalam projek ini adalah pengenaltastian dan pencirian: (i) elemen pengawalselia epigenetik yang mengawal kebolehcapaian kromatin dan menyokong penggalak super KLF6 dalam ccRCC dan (ii) faktor transkripsi yang mengikat pada KLF6 dan mengaruh ekspresi tinggi KLF6 dalam ccRCC.	8
Rajah 2.1	Ciri khas dan fenotip kanser yang memainkan peranan penting dalam menyokong pertumbuhan, perkembangan dan kemandirian sel kanser. Model ini merangkumi fenotip utama yang mencirikan perkembangan dan kelangsungan hidup sel kanser. Ciri khas kanser terdiri daripada pelbagai mekanisma yang membolehkan sel kanser berkembang dalam persekitaran mikro tumor serta menyumbang kepada sifat agresif kanser. Pemahaman tentang ciri ini memainkan peranan penting dalam penyelidikan kanser dan pembangunan strategi terapeutik.	14
Rajah 2.2	Anatomi sistem buah pinggang (wanita) yang menunjukkan buah pinggang, ureter, pundi kencing, dan uretra. Air kencing dihasilkan dalam tubul renal dan terkumpul di pelvis renal setiap buah pinggang. Air kencing mengalir dari buah pinggang melalui ureter ke pundi kencing. Air kencing disimpan dalam pundi kencing sehingga ia dikeluarkan dari badan melalui uretra.	16
Rajah 2.3	Anatomi buah pinggang dan nefron. Nefron merangkumi dua kumpulan struktur iaitu <i>corpuscle</i> renal dan tubul renal. <i>Corpuscle</i> renal terdiri daripada glomerulus yang dikelilingi oleh kapsul glomerulus. <i>Corpuscle</i> renal adalah struktur penapis bagi nefron. Tubul berbelit proksimal adalah tubul yang terikat terus pada glomerulus. Gelung <i>Henle</i> membentuk selekoh dengan menghubungkan dua tubul iaitu tubul menaik dan menurun. Tubul terakhir adalah tubul berbelit distal yang terletak lebih jauh dari glomerulus.	17

Rajah 2.4	Gambar mikroskopik ccRCC. Ciri morfologi ccRCC: sel tumor berkumpul dalam kelompok padat atau dalam struktur seperti folikel dan menunjukkan sitoplasma yang besar. Selain itu, kelompok sel darah merah dan saluran kapilari mudah dikesan di antara sel tumor. (Hematoksilin-eosin, pembesaran asal $\times 200$).	24
Rajah 2.5	Ciri molekul ccRCC: VHL, PBRM1, BAP1, dan SETD2 terletak di kawasan lengan pendek kromosom 3 manusia. Kehilangan struktur dan fungsi di kawasan ini dikenali sebagai “kehilangan kromosom 3p”. Kehilangan kromosom 3p telah disahkan sebagai kejadian pendorong karsinogenik yang biasa berlaku dalam ccRCC.	25
Rajah 2.6	Pengawalaturan proses normoksia dan hipoksia. Dalam persekitaran normoksia, faktor transkripsi HIF1 α dan HIF2 α mengalami hidroksilasi pada satu atau kedua-dua residu prolin yang dimangkin oleh prolyl hidroksilase 1 (PHD1), PHD2, dan PHD3. Faktor transkripsi HIF α yang mengalami prolyl-hidroksilasi akan diikat oleh kompleks ligase E3 ubiquitin pVHL–elongin C (ELC)–elongin B–cullin 2 (CUL2)–RBX1 (VCB–CR) untuk proses ubiquitinasi dan seterusnya disasarkan untuk degradasi proteosomal. Dalam persekitaran hipoksia, prolin tidak mengalami hidroksilasi disebabkan ketiadaan oksigen. Oleh itu, HIF α akan terkumpul secara abnormal dan seterusnya membentuk heterodimer dengan HIF1 β . Heterodimer ini kemudian ditranslokasi ke dalam nukleus, mengikat elemen tindak balas hipoksia (HREs), dan mengaruh transkripsi gen yang terlibat untuk adaptasi dan kemandirian sel dalam persekitaran hipoksia.	29
Rajah 2.7	Kompleks protein mTORC1 dan mTORC2. Komponen yang membentuk kompleks protein mTORC1 dan mTORC2 terdiri daripada mTOR, mLST8, dan DEPTOR yang dikongsi bersama antara kedua-dua kompleks protein ini. Perbezaan antara kompleks protein ini pula adalah mTORC1 mempunyai komponen khusus RAPTOR dan PRAS40, manakala protein RICTOR, mSIN1 dan PROTOR adalah spesifik kepada mTORC2.	31
Rajah 2.8	Mekanisma epigenetik yang mengawalatur proses transkripsi gen. Ilustrasi menunjukkan mekanisme epigenetik iaitu (i) metilasi DNA, (ii) modifikasi protein histon dan struktur kromatin, dan (iii) penyenyapan ekspresi gen oleh RNA bukan pengekod.	37
Rajah 2.9	Perbezaan asetilasi histon dan deasetilasi histon. Asetilasi residu lisin pada histon melibatkan penambahan kovalen kumpulan asetil pada kedudukan ϵ rantai sisi lisin, yang menghasilkan struktur kromatin terbuka dan membolehkan	

	wilayah DNA diakses oleh faktor dan ko-faktor pengawalan transkripsi gen. Sebaliknya, deasetilasi lisin melibatkan penyingkiran kumpulan asetil, menyebabkan struktur kromatin menjadi lebih padat, tertutup dan tidak dapat diakses oleh faktor dan ko-faktor pengawalan transkripsi gen.	39
Rajah 2.10	Struktur kromatin dan modifikasi histon. Kromatin terdiri daripada unit asas yang dipanggil nukleosom. Setiap nukleosom terdiri daripada empat pasangan histon, iaitu H2A, H2B, H3, dan H4, yang membentuk suatu oktamer. Ekor N-terminal protein histon boleh mengalami modifikasi pasca translasi (PTMs) pada residu asid amino tertentu. Modifikasi ini boleh mempengaruhi struktur kromatin. Eukromatin, juga dikenali sebagai “kromatin terbuka,” ialah struktur yang mudah diakses dan membolehkan transkripsi aktif. Sebaliknya, heterokromatin, atau “kromatin tertutup,” adalah lebih padat dan kurang boleh diakses, menjadikan transkripsi kurang aktif. Metilasi histon boleh mengaktifkan atau menekan transkripsi gen bergantung pada lokasi ia berlaku. Sebaliknya, asetilasi histon mengurangkan interaksi antara histon yang berdekatan serta interaksi antara histon dan DNA, yang membawa kepada pembentukan eukromatin.	43
Rajah 2.11	Ilustrasi penggalak biasa (A) dan penggalak super (B) yang terlibat dalam pengaktifan transkripsi gen. Penggalak super berbeza daripada penggalak biasa berdasarkan saiznya yang lebih besar, isyarat H3K27ac yang lebih tinggi (penanda kromatin terbuka dan transkripsi aktif), serta diikat oleh lebih banyak faktor transkripsi (TF), kofaktor, dan BRD4. BRD4 mengenali histon H3K27 yang telah diasetilasi dan merekrut faktor pemanjangan transkripsi positif B (P-TEFb) dan mediator. Proses ini mengaktifkan RNA polymerase II dan pengikatan pada promoter gen, seterusnya meningkatkan transkripsi. Oleh kerana penggalak super diikat oleh lebih banyak molekul BRD4 dan faktor lain, ia membawa kepada tahap transkripsi yang jauh lebih tinggi, terutamanya bagi onkogen yang dikaitkan dengan penggalak super, berbanding dengan gen yang dikawal oleh penggalak biasa.	48
Rajah 3.1	Fasa 1 pengkajian mekanisme epigenetik yang merangkumi metodologi yang dilaksanakan dalam kajian seperti asai in vitro, qPCR, ChIP-qPCR dan CRISPR-dCas9-hHDAC3.	59
Rajah 3.2	Fasa 2 pengkajian mekanisme transkripsi yang merangkumi metodologi yang dilaksanakan dalam kajian seperti CRISPR-dCas9-KRAB, qPCR, ChIP-qPCR dan asai in vitro.	60
Rajah 3.3	Langkah ringkas dalam asai imunopresipitasi kromatin (ChIP) - qPCR. Eksperimen ini mempunyai beberapa langkah utama iaitu paut silang sel, lisis sel dan pengekstrakan kompleks	

	DNA-protein, fragmentasi asid nukleik menggunakan sonifikasi, imunopresipitasi menggunakan antibodi, paut silang berbalik dan pembersihan sampel DNA untuk analisis aliran qPCR.	73
Rajah 3.4	Langkah ringkas dalam pembloatan Western. Eksperimen ini mempunyai beberapa langkah utama iaitu pemisahan protein menggunakan kaedah elektroforesis SDS-PAGE, pemindahan protein ke atas membran, inkubasi antibodi dan visualisasi.	77
Rajah 3.5	Lokasi primer hadapan dan berbalik yang digunakan dalam mutagenesis terarah plasmid dCas9-hHDAC3.	79
Rajah 3.6	Ilustrasi wilayah penggalak konstituen yang disasarkan oleh iSE_1, iSE_2 dan iSE_3 pada lokus KLF6.	83
Rajah 3.7	Ilustrasi (A) konstruk iMEF2C yang direka bentuk untuk mengekspresikan dua sgRNA yang menyasarkan MEF2C secara serentak. Konstruk ini mengandungi jujukan sgRNA yang diapit oleh tapak enzim pencernaan <i>BbsI</i> untuk membolehkan penyisipan ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Selain itu, tapak enzim <i>AarI</i> ditempatkan di antara dua sgRNA bagi memudahkan penyisipan fragmen tambahan pada langkah pengklonan seterusnya. (B) fragmen “sgRNA scaffold-U6 promoter” yang turut mengandungi tapak enzim <i>AarI</i> pada kedua-dua hujungnya. Tapak enzim ini direka bagi memastikan jantian yang serasi dengan plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C- <i>AarI</i> semasa proses ligasi, membolehkan penyambungan fragmen ini untuk menghasilkan konstruk akhir pKLV-Hygro_iMEF2C.	86
Rajah 3.8	Carta alir strategi pengklonan konstruk iMEF2C ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Langkah pertama melibatkan ligasi konstruk iMEF2C yang telah dicerna ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Seterusnya, plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C- <i>AarI</i> yang terhasil dicerna menggunakan enzim <i>AarI</i> sebelum fragmen sgRNA scaffold-U6 promoter diligasi ke dalam plasmid tersebut untuk menghasilkan plasmid akhir pKLV-Hygro_iMEF2C yang lengkap.	91
Rajah 3.9	Carta alir strategi pengklonan konstruk shMEF2C ke dalam plasmid sGEP. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid sGEP dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>EcoRI</i> . Seterusnya, konstruk shMEF2C yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid sGEP yang telah dicerna untuk menghasilkan sGEP_shMEF2C.	95
Rajah 3.10	Carta alir strategi pengklonan konstruk MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Hygro. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid pLVX-Hygro dengan enzim <i>XhoI</i> dan	

	<i>XbaI</i> . Seterusnya, konstruk MEF2C CDS yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid pLVX-Hygro yang telah dicerna untuk menghasilkan pLVX-Hygro_MEF2C CDS.	100
Rajah 3.11	Strategi pengklonan konstruk FLAG MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Puro. Carta alir strategi pengklonan konstruk FLAG MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Puro. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid pLVX-Puro dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>XbaI</i> . Seterusnya, konstruk FLAG MEF2C CDS yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid pLVX-Puro yang telah dicerna untuk menghasilkan pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS.	103
Rajah 4.1	Kesan rawatan JQ1 ke atas viabiliti sel ccRCC selepas 72 jam (A) 786-M1A, magnifikasi 4X (B) OS-LM1B dan (C) UOK101. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B dan UOK101 telah dilakukan sebanyak sekali. $ns > 0.05$, $***P \leq 0.0005$, ANOVA sehalu.	111
Rajah 4.2	Kesan rawatan A-485 ke atas viabiliti sel ccRCC selepas 72 jam (A) 786-M1A, magnifikasi 4X dan (B) OS-LM1B. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B telah dilakukan sebanyak dua kali. $ns > 0.05$, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.005$, ANOVA sehalu.	113
Rajah 4.3	Potensi pembentukan koloni selepas rawatan JQ1 dalam 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101. Kesemua sel telah diplatkan dan dikultur dalam plat telaga 6 selama 7 hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian dilakukan sebanyak 3 kali. $***P \leq 0.0005$, ANOVA sehalu.	115
Rajah 4.4	Potensi pembentukan koloni selepas rawatan A-485 dalam 786-M1A dan OS-LM1B. Kesemua sel telah diplat dan dikultur dalam plat telaga 6 selama 7 hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian telah dilakukan sebanyak 3 kali. $***P \leq 0.0005$, ANOVA sehalu.	117
Rajah 4.5	Tahap ekspresi <i>KLF6</i> selepas rawatan dengan perencat aktiviti BRD4, JQ1 dalam sel ccRCC. (A) 786-M1A dan (B) OS-LM1B. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B telah dilakukan sebanyak dua kali. $ns > 0.05$, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.005$. ANOVA sehalu.	119
Rajah 4.6	Tahap ekspresi <i>KLF6</i> selepas rawatan dengan perencat aktiviti P300, A-485 dalam sel ccRCC. (A) 786-M1A dan (B) OS-	

	LM1B. Ujian ke atas 786-M1A dan OS-LM1B telah dilakukan sebanyak tiga kali. $ns>0.05$, $*P\leq 0.05$, $***P\leq 0.0005$. ANOVA sehalu.	120
Rajah 4.7	Gambaran kedudukan penggalak super <i>KLF6</i> .	122
Rajah 4.8	Kadar isyarat H3K27ac terhadap penggalak <i>KLF6</i> dalam sel 786-M1A selepas rawatan JQ1. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. $***P\leq 0.0005$. Ujian T.	123
Rajah 4.9	Tahap isyarat H3K27ac terhadap penggalak <i>KLF6</i> dalam sel 786-M1A selepas rawatan A-485. Ujian dilakukan sebanyak satu kali.	125
Rajah 4.10	Tahap ekspresi <i>KLF6</i> dan <i>PDGFβ</i> dalam sel ccRCC selepas rawatan dengan 10 μ M JQ1 selama 6 jam. (A) 786-M1A (B) OS-LM1B. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. $**P\leq 0.005$, $***P\leq 0.0005$. Ujian T.	127
Rajah 4.11	Tahap ekspresi <i>KLF6</i> dan <i>PDGFβ</i> dalam sel ccRCC selepas rawatan dengan 10 μ M A-485 selama 16 jam. (A) 786-M1A (B) OS-LM1B. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. $**P\leq 0.005$, $***P\leq 0.0005$. Ujian T.	129
Rajah 4.12	Rawatan JQ1 berpotensi untuk mengurangkan tahap aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 dalam sel ccRCC 786-M1A. Sel 786-M1A dirawat dengan 10 μ M JQ1 selama 6 jam sebelum analisis pemblotan Western dijalankan. Ujian dilakukan sebanyak satu kali.	131
Rajah 4.13	Ilustrasi kedudukan sasaran sgRNA pada lokus <i>KLF6</i> .	133
Rajah 4.14	Carta alir deasetilasi histon dalam sel 786-M1A menggunakan pendekatan CRISPR-dCas9. (1) Sel 786-M1A ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 dan (2) dirawat dengan blastisidin untuk menghasilkan sel stabil 786-M1A_dCas9-hHDAC3. (3) Sel stabil ini kemudian ditransduksi dengan plasmid pKLV-Puro_sgRNA dan (4) dirawat dengan puromisin untuk menghasilkan sel stabil 786-M1A_hHDAC3_sgRNA. (5) Analisis ekspresi <i>KLF6</i> dan (6) analisis isyarat H3K27ac pada lokus <i>KLF6</i> dijalankan bagi mengesahkan aktiviti deasetilasi histon.	134
Rajah 4.15	Kedudukan kodon henti yang berada di antara jujukan dCas9 dan gen rintangan blastisidin dalam plasmid dCas9-hHDAC3. Ilustrasi plasmid dihasilkan menggunakan perisian SnapGene Viewer (https://www.snapgene.com/snapgene-viewer).	135
Rajah 4.16	Hasil dapatan eksperimen mutagenesis terarah plasmid dCas9-hHDAC3. (A) Koloni bakteria yang tumbuh di atas plat agar LB + ampicilin adalah bakteria yang berjaya ditransformasi	

	dengan plasmid mutan. (B) Elektroferogram penjujukan plasmid mutan mengesahkan penukaran nukleotida T kepada A.	137
Rajah 4.17	Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dan dipilih dengan antibiotik blastisidin 30 µg/mL. (A) Sel yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 asal dan (B) plasmid dCas9-hHDAC3 mutan. Sel yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 mutan mempunyai kerintangan terhadap blastisidin. Magnifikasi 4X.	138
Rajah 4.18	Deasetilasi histon menggunakan teknologi CRISPR-dCas9-hHDAC3 dalam sel 786-M1A pada wilayah promoter <i>KLF6</i> , penggalak <i>KLF6</i> iSE_1, penggalak <i>KLF6</i> iSE_2 dan penggalak <i>KLF6</i> iSE_3. Ekspresi gen <i>KLF6</i> pada promoter <i>iKLF6</i> dan wilayah penggalak <i>KLF6</i> iSE_1 mengalami penurunan signifikan berbanding sel kawalan. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ns>0.05, **P≤0.005. Ujian T.	139
Rajah 4.19	Deasetilasi histon menggunakan teknologi CRISPR-dCas9-hHDAC3 pada beberapa wilayah lokus <i>KLF6</i> dalam sel 786-M1A. Isyarat H3K27ac berkurang dengan ketara pada wilayah penggalak iSE_1 berbanding NTC. Ujian dilakukan sebanyak dua kali, ns>0.05, *P≤0.05, **P≤0.005, Ujian T.	141
Rajah 4.20	Motif keluarga MEF2 pada wilayah promoter <i>KLF6</i> .	143
Rajah 4.21	Analisis korelasi gen dalam data TCGA dengan menggunakan perisian sesawang GEPIA menunjukkan korelasi positif antara tahap ekspresi <i>KLF6</i> dan keluarga <i>MEF2</i> dalam ccRCC. Ekspresi setiap keluarga MEF2 adalah tinggi dalam sampel kanser berbanding sampel normal. T merujuk kepada sampel kanser manakala N merujuk kepada sampel normal. *P<0.01. Korelasi Pearson.	144
Rajah 4.22	Analisis ekspresi gen dalam data TCGA dengan menggunakan perisian sesawang GEPIA menunjukkan perbezaan tahap ekspresi <i>MEF2C</i> yang tinggi dalam ccRCC berbanding tisu normal. T merujuk kepada sampel kanser manakala N merujuk kepada sampel normal. Skala 4 menunjukkan tahap ekspresi paling tinggi manakala skala 1 menunjukkan tahap ekspresi paling rendah.	145
Rajah 4.23	Carta alir penyenyapan ekspresi <i>MEF2C</i> dalam sel ccRCC menggunakan pendekatan CRISPRi.	146
Rajah 4.24	Imej elektroforesis gel bagi plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna dengan enzim <i>BbsI</i> dan plasmid pKLV-Hygro yang tidak dicerna.	147

Rajah 4.25	Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk iMEF2C yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid pKLV-Hygro.	148
Rajah 4.26	Sel 786-M1A_dCas9-KRAB yang telah ditransduksi dan berjaya dalam pemilihan antibiotik higromisin 1000 µg/mL. (A) Sel yang tidak ditransduksi. (B) Sel yang ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_NTC. (C) Sel yang ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C. Magnifikasi 4X.	149
Rajah 4.27	Ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> dalam sel ccRCC yang telah mengalami penenyapan <i>MEF2C</i> . Penenyapan gen <i>MEF2C</i> dalam sel ccRCC (A) 786-M1A. (B) UOK101 dan (C) OS-LM1B melalui teknologi CRISPRi mengurangkan tahap ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> berbanding dengan NTC. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. **P≤0.005, ***P≤0.0005. Ujian T.	151
Rajah 4.28	Carta alir penenyapan ekspresi <i>MEF2C</i> dalam sel ccRCC menggunakan pendekatan RNAi.	153
Rajah 4.29	Imej elektroforesis gel bagi konstruk shMEF2C yang berjaya diamplifikasi.	154
Rajah 4.30	Imej elektroforesis gel bagi plasmid sGEP yang berjaya dicerna dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>EcoRI</i> , dan dirawat dengan AnP. Imej plasmid yang tidak dicerna (kawalan) tidak disertakan.	154
Rajah 4.31	Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk shMEF2C yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid sGEP.	155
Rajah 4.32	Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dan berjaya dalam pemilihan antibiotik puromisin 4 µg/mL. (A) Sel yang tidak ditransduksi. (B) Sel yang ditransduksi dengan plasmid sGEP kosong. (C) Sel yang ditransduksi dengan plasmid sGEP_shMEF2C. Magnifikasi 4X.	156
Rajah 4.33	Ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> dalam sel 786-M1A yang telah mengalami penenyapan <i>MEF2C</i> menggunakan RNAi. Penenyapan <i>MEF2C</i> mengurangkan tahap ekspresi <i>MEF2C</i> dan <i>KLF6</i> berbanding NTC. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. *P≤0.05, **P≤0.005. Ujian T.	157
Rajah 4.34	Sel 786-M1A yang ditransduksi dengan plamid sGEP_shMEF2C menunjukkan tahap protein yang rendah berbanding NTC, yang menunjukkan kecekapan RNAi dalam mengurangkan ekspresi <i>MEF2C</i> . Antibodi <i>MEF2C</i> membuktikan keefisienan untuk mengikat protein <i>MEF2C</i> dalam sel ccRCC.	159

Rajah 4.35	Lokasi primer yang digunakan untuk mengamplifikasi wilayah promotor KLF6 yang diikat oleh MEF2C. Primer ini digunakan dalam kajian MEF2C ChIP-qPCR.	160
Rajah 4.36	Pengayaan isyarat MEF2C untuk antibodi MEF2C berbanding antibodi IgG dalam sel asal (A) 786-M1A dan (B) OS-LM1B. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.005$, Ujian T.	161
Rajah 4.37	Isyarat MEF2C berkurang dalam sel 786-M1A yang mengalami penenyapan <i>MEF2C</i> berbanding sel kawalan. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, Ujian T.	162
Rajah 4.38	Carta alir pengekspresan MEF2C CDS dan FLAG MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A yang telah mengalami penenyapan gen MEF2C.	164
Rajah 4.39	Imej elektroforesis gel bagi konstruk MEF2C CDS yang berjaya diamplifikasi.	165
Rajah 4.40	Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk MEF2C CDS yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid pLVX-Hygro. Bulatan merah menunjukkan kedudukan kodon pemula ATG bagi konstruk MEF2C CDS.	165
Rajah 4.41	Isyarat MEF2C bertambah dalam sel 786-M1A yang mengalami pengenalan eksogen MEF2C berbanding NTC dalam MEF2C ChIP-qPCR. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, Ujian T.	167
Rajah 4.42	Imej elektroforesis gel bagi konstruk FLAG MEF2C CDS yang berjaya diamplifikasi daripada plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS.	168
Rajah 4.43	Elektroferogram penjujukan mengesahkan kehadiran FLAG MEF2C CDS yang telah berjaya diligasi ke dalam plasmid pLVX- Puro.	168
Rajah 4.44	Isyarat MEF2C bertambah dalam sel 786-M1A yang mengalami pengenalan eksogen MEF2C berbanding sel kawalan dalam FLAG ChIP-qPCR. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, Ujian T.	170
Rajah 4.45	Kesan migrasi sel ke atas sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C. (A) Imej migrasi sel, magnifikasi 4X. (B) Graf menunjukkan kadar peratusan migrasi sel selepas 12 jam. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ns>0.05. Ujian T.	172

- Rajah 4.46 Kesan rawatan *sunitinib* ke atas asai viabiliti sel selepas 72 jam dalam sel ccRCC. Sel 786-M1A_iMEF2C mencatatkan penurunan tahap viabiliti sel setelah dirawat dengan perencat kimia *sunitinib* pada tahap kepekatan yang lebih tinggi berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, *P≤0.05, **P≤0.005, ***P≤0.0005, ANOVA dua hala. 174
- Rajah 4.47 Kesan rawatan *everolimus* ke atas asai viabiliti sel selepas 72 jam dalam sel ccRCC. Sel 786-M1A_NTC dan 786_iMEF2C tidak menunjukkan kerentanan setelah dirawat dengan perencat kimia *everolimus*. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, *P≤0.05, ANOVA dua hala. 176
- Rajah 4.48 Potensi pembentukan koloni dalam sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C. Kesemua sel telah diplat dan dikultur dalam plat telaga 6 selama tujuh hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ***P≤0.0005, Ujian T. 178
- Rajah 6.1 Model ringkasan penemuan kajian. Kajian ini menunjukkan bahawa BRD4 dan P300 adalah elemen pengawal atur epigenetik penting yang menyokong pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC. Selain itu, deasetilasi histon pada beberapa kawasan penggalak *KLF6* menggunakan CRISPR-dCas9 mengubah landskap kromatin dan menekan ekspresi *KLF6*, mengesahkan peranan asetilasi dalam pengawalan ekspresi *KLF6*. Dari perspektif mekanisme transkripsi, kajian ini membuktikan bahawa MEF2C mengikat pada promotor *KLF6* dan bertindak sebagai faktor transkripsi. Walau bagaimanapun, penyenyapan *MEF2C* dalam ccRCC tidak memberi kesan terhadap migrasi sel dan viabiliti sel tetapi meningkatkan pembentukan koloni, mencadangkan peranan MEF2C dalam keseimbangan proliferasi dan survival jangka panjang dalam ccRCC. 196

SENARAI SIMBOL

%	Peratus yang digunakan
<	Kurang daripada
>	Lebih daripada
bp	Pasangan bes
kb	Kilo bes
mm	Milimeter
cm	Sentimeter
Ct	Kitaran ambang
mg	Miligram
mL	Mililiter
mM	Milimolar
ng	Nanogram
ng/ μ l	Nanogram per mikroliter
nM	Nanomolar
$^{\circ}$ C	Darjah celsius
rpm	Putaran per minit
TM	Tanda dagangan; <i>trademark</i>
V	Voltan
mA	Miliampere
Δ	Delta
μ g	Mikrogram
μ g/mL	Mikrogram per mililiter
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromolar

SENARAI SINGKATAN

ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
ATCC	<i>American Type Culture Condition</i>
BAP1	<i>BRCA1 associated protein-1</i>
BRAF	<i>V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BET	<i>Bromodomain and extra-terminal domain</i>
BRD4	<i>Bromodomain-containing protein 4</i>
BRG1	<i>Brahma-related gene 1</i>
BRM	<i>Brahma</i>
ccRCC	<i>Clear cell kanser renal</i>
CDKN2	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptors</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
FBS	<i>Serum janin lembu; Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FH	<i>Fumarate hydratase</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>

HATS	<i>Histone acetyltransferases</i>
HCF-1	<i>Host cell factor-1</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HRE	<i>Hypoxia-response elements</i>
KLF6	<i>Krüppel-like factors 6</i>
KRAS	<i>Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	<i>Kehilangan keheterozigotan; loss of heterozygosity</i>
LSD1	<i>Lysine specific demethylase 1</i>
MAPK/ERK	<i>Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase</i>
MEF2C	<i>Myocyte enhancer factor 2C</i>
MET	<i>Peralihan mesenkima kepada epitelium; Mesenchymal epithelial transition</i>
miRNA	<i>MicroRNA</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)</i>
FADH2	<i>Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) + hydrogen 2 (H)</i>
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i>
OCR	<i>Kawasan kromatin terbuka; Open chromatin region</i>
PBAF	<i>Polybromo-associated BAF</i>
PBRM1	<i>Polybromo 1</i>
PBS	<i>Salina penimbal berfosfat; Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Tindak balas berantai polimerase; Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF β	<i>Platelet-derived growth factor β</i>
P13K/AKT	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B</i>

P-S6	Fosforilasi protein ribosomal S6; <i>Phosphorylation ribosomal protein S6</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	Tindak balas berantai polimerase masa nyata; <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RCC	<i>Renal cell carcinoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	Penggalak super: <i>Super enhancer</i>
SETD2	<i>SET domain containing protein 2</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TET	<i>Ten-eleven Translocation</i>
TP53	<i>Tumour protein p53</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>Von Hippel Lindau</i>

BAB I

PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Proses kitaran pertumbuhan dan kematian sel manusia serta sel eukariot lain dikawal atur dengan sangat rapi oleh interaksi antara tapak laluan isyarat bersama mekanisma molekul yang berkaitan. Pertumbuhan sel diaruh oleh stimulus yang akan menghantar transduksi isyarat untuk sel membahagi apabila diperlukan serta dalam kondisi yang optimum untuk berproliferasi. Namun begitu, sekiranya terdapat kerosakan pada sel, tekanan genotoksik, tekanan persekitaran, atau tiada keperluan untuk membahagi, isyarat sama ada untuk sel menjalani apoptosis atau berhenti daripada berproliferasi akan diaktifkan (Kopeina & Zhivotovsky 2022). Keseimbangan dalam proses ini adalah penting untuk memastikan proses fisiologi manusia berjalan secara normal serta mengelakkan terdapatnya gangguan dalam proses ini yang seterusnya boleh menyebabkan pelbagai penyakit.

Kanser merupakan penyakit pertumbuhan sel yang tidak terkawal dan abnormal yang mungkin berpunca daripada satu atau populasi sel yang mengalami perubahan atau mutasi genetik dan/atau epigenetik. Pertumbuhan yang tidak terkawal ini boleh bermula dan berlaku dalam pelbagai jenis sel di dalam badan manusia seperti sel epitelium, sel darah, sel neuron, sel otot dan sel tisu penghubung (Borrescio-Higa & Valdés 2022; Gounder, Thomas & Tap 2018; Park, Hwang & Song 2023; Yang et al. 2022b). Namun begitu, 90% daripada jenis kanser adalah berasal daripada sel epitelium yang melapisi kulit atau organ dalaman yang dikenali sebagai karsinoma (*carcinoma*) (Cserni 2002). Seperti yang digariskan di atas, berbanding dengan pertumbuhan sel normal, sel kanser mampu membahagi secara tidak terkawal tanpa diaruh oleh sebarang isyarat untuk bertumbuh. Selain itu, sel kanser juga mempunyai keupayaan untuk tidak bertindak

balas terhadap isyarat yang mengarahkannya sama ada untuk berhenti daripada bertumbuh atau menjalani apoptosis (Kopeina & Zhivotovsky 2022). Seterusnya, sel kanser juga berupaya untuk mengelak daripada dikesan dan dimusnahkan oleh sistem imuniti badan. Bagi menjamin kemandirian dan perkembangan metastasis (merebak ke organ sekunder), sel kanser mampu menghantar isyarat untuk merangsang pembentukan salur darah baru yang dapat membekalkan nutrisi dan oksigen yang cukup bagi menampung pertumbuhan sel kanser ini yang cepat dan agresif (Cree 2011).

Mutasi atau perubahan genetik dan/atau epigenetik yang menyebabkan pembentukan dan perkembangan kanser boleh berlaku sama ada secara sporadik ataupun diwarisi melalui keturunan. Kanser diklasifikasikan sebagai penyakit poligenik dimana tiada spesifik gen atau faktor yang menyumbang dalam pembentukan dan pertumbuhan kanser. Malah, terdapat banyak kajian melaporkan yang terdapat akumulasi pelbagai mutasi genetik dan epigenetik dalam sel kanser yang penting dalam memacu pertumbuhan dan perkembangan kanser. Selain daripada faktor genetik dan epigenetik, terdapat juga beberapa faktor lain yang boleh meningkatkan risiko untuk mendapat kanser iaitu faktor usia, pemakanan, amalan gaya hidup yang tidak sihat, pendedahan berpanjangan terhadap mutagen dan sinar radiasi, serta jangkitan virus seperti *human papilloma virus* dan *human hepatitis virus* (Gopal Krishnan et al. 2020).

Menurut statistik pada tahun 2020, kanser buah pinggang tergolong dalam 20 jenis kanser yang paling kerap berlaku di seluruh dunia. Prevalen pesakit kanser buah pinggang adalah lebih tinggi dalam kalangan lelaki berbanding dengan wanita di mana sebahagian besar penghidap kanser buah pinggang ini adalah warga emas dengan purata umur 64 tahun. Seramai 115,600 kes kematian melibatkan kanser buah pinggang dalam kalangan lelaki berbanding kes wanita sebanyak 63,768 (Sung et al. 2021). Statistik terkini menunjukkan seramai lebih 9,500 pesakit telah dikenalpasti perlu menjalani rawatan dialisis setiap tahun.

Secara umumnya, kanser buah pinggang boleh dibahagikan kepada 4 subjenis utama iaitu kanser sel renal (*renal cancer cell* - RCC) diikuti oleh karsinoma sel transisi, sel sarkoma buah pinggang dan tumor *Wilms*. RCC yang berasal daripada lapisan sel epitelium tubul buah pinggang merupakan subjenis yang paling lazim dan menyumbang

kepada 90% daripada kes kanser buah pinggang di seluruh dunia. Karsinoma sel transisi bermula daripada sel yang dipanggil sel transisi manakala sel sarkoma buah pinggang berasal daripada tisu penghubung buah pinggang. Tumor *Wilms* pula adalah jenis kanser yang paling biasa terjadi dalam kalangan kanak-kanak berumur 3 hingga 4 tahun. Seterusnya, RCC boleh dikelaskan kepada beberapa subjenis iaitu *clear cell renal cell carcinoma* (ccRCC), *papillary cell renal cell carcinoma* dan *chromophobe* (Siegel, Miller & Jemal 2019). ccRCC merupakan subjenis yang mempunyai prevalen paling tinggi dan menyumbang kepada sekurang-kurangnya 75% insiden kanser buah pinggang di seluruh dunia. Selain itu, majoriti kematian yang berkaitan kanser buah pinggang juga adalah daripada subjenis ccRCC. Sebagai tambahan, istilah ccRCC diberikan berdasarkan histologi subjenis ini yang mempunyai sitoplasma yang lutsinar dan besar yang disebabkan oleh akumulasi abnormal lipid dan glikogen.

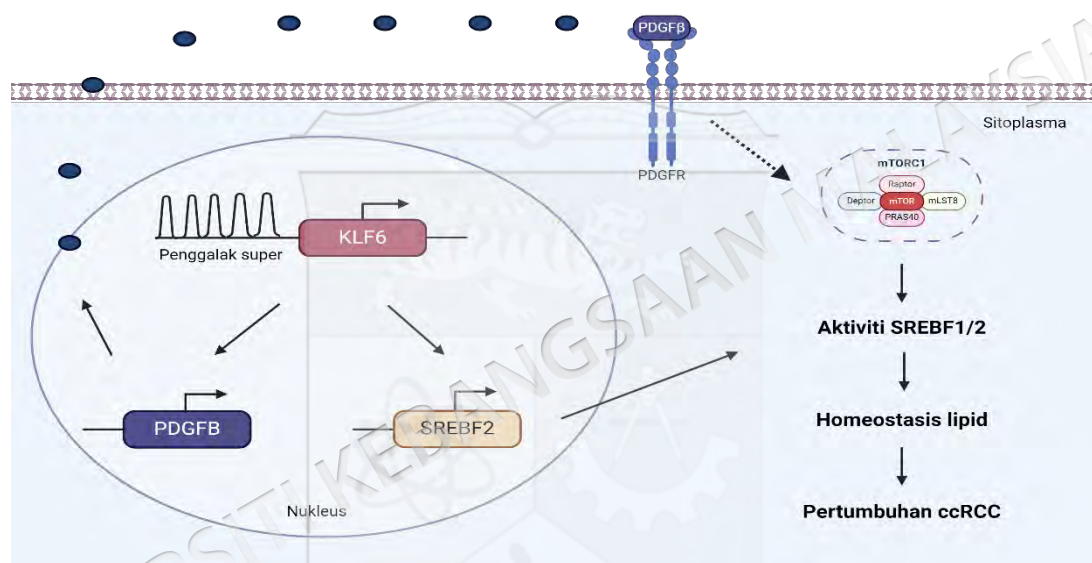
Oleh kerana prevalen insiden ccRCC yang tinggi, banyak kajian berkaitan kanser buah pinggang tertumpu kepada memahami dengan lebih mendalam dan merungkai patogenesis dan kebergantungan ccRCC terhadap gen, protein atau mekanisma sel dan molekul tertentu. Pemahaman dan pengetahuan ini adalah penting untuk membantu dalam pembangunan strategi klinikal yang lebih efektif dalam kaedah diagnosis, rawatan atau ramalan prognosis pesakit. Secara umumnya, kaedah rawatan terbaik untuk ccRCC adalah pengesanan kanser pada peringkat awal yang diikuti oleh pembedahan untuk membuang tisu kanser pada tahap awal. Namun begitu, sebahagian besar pesakit hanya dapat didiagnosis apabila kanser telah berada pada tahap akhir. Pada tahap akhir ini, sel kanser adalah agresif, mempunyai keupayaan metastatik yang tinggi dan tidak responsif terhadap rawatan yang diberikan (Blanco, Teh & Amato 2011; Diamond et al. 2015). Kaedah rawatan ccRCC yang telah diluluskan untuk kegunaan klinikal pada masa kini adalah perencatan atau penyasaran proses angiogenesis, tapak laluan isyarat mTORC1, titik perencatan imun (*immune checkpoint inhibitor*) dan pro-onkogenik HIF2 α . Namun begitu, kadar tindak balas pesakit terhadap kaedah rawatan yang diluluskan oleh FDA ini masih tidak memuaskan (Choueiri & Motzer 2017). Oleh yang demikian, terdapat keperluan mendesak untuk pembangunan kaedah rawatan dan strategi klinikal yang lebih efektif.

Penyahaktifan bi-allelik gen penindas tumor VHL merupakan perubahan genetik yang paling kerap dijumpai iaitu dalam 90% pesakit ccRCC. Oleh yang demikian, mutasi dalam gen VHL diklasifikasikan sebagai *truncal event* dalam pembentukan ccRCC. Selain itu, mutasi *VHL* juga adalah eksklusif kepada ccRCC dan jarang dijumpai dalam jenis kanser yang lain. Penyahaktifan *VHL* menyebabkan akumulasi abnormal protein HIF2 α di mana VHL berperanan menandakan HIF2 α untuk degradasi proteosomal dalam tahap normal oksigen. Berperanan dalam mengaktifkan program transkripsi untuk adaptasi dalam kondisi hipoksia, akumulasi HIF2 α dalam persekitaran normoksia yang disebabkan oleh penyahaktifan *VHL* seterusnya mengaruh pembentukan dan pertumbuhan ccRCC. Secara kolektif, VHL-HIF2 α merupakan pemandu onkogenik yang penting dalam proses tumorigenesis awal ccRCC (Courtney et al. 2018; Ma et al. 2016; *The Cancer Genome Atlas Research Network* 2013).

Penggalak super atau *super enhancer* ditakrifkan sebagai kawasan penggalak luas yang diikat oleh banyak faktor dan kofaktor yang mengaruh pengekspresan tinggi gen hiliran. Ciri lain penggalak super adalah pengisyaratan H3K27ac yang tinggi yang menandakan lokus genomik yang mempunyai kawasan kromatin yang terbuka dan proses transkripsi gen yang aktif. Pada awal penemuannya, penggalak super dilaporkan memainkan peranan penting dalam mengaktifkan pengekspresan gen dan program transkripsi yang berkaitan dengan proses perkembangan embrio, pengawalaturan status pluripotensi sel stem serta penentuan identiti sel dan tisu (Chen et al. 2008; Whyte et al. 2013). Namun begitu, terdapat banyak kajian yang menunjukkan kadar kebergantungan sel kanser yang tinggi pada penggalak super dan gen hiliran yang diaruh oleh penggalak super ini (Tang 2020; Yoshino & Suzuki 2022; Zhou & Parsons 2023). Sementara itu, penyasaran protein yang mengawal atur pembentukan landskap penggalak super dan proses transkripsi gen hiliran dapat merencatkan pertumbuhan sel kanser daripada organ yang berlainan.

KLF6 merupakan faktor transkripsi di mana pengekspresan gen KLF6 yang tinggi dalam ccRCC dikawal atur oleh penggalak super yang luas. Selari dengan kajian yang menunjukkan kebergantungan sel kanser terhadap gen yang diaruh oleh penggalak super, penyasaran *KLF6* dengan menggunakan teknik CRISPR/Cas9 merencatkan pertumbuhan sel ccRCC secara signifikan dalam asai in vitro dan juga in vivo.

Seterusnya, kajian mekanistik yang mendalam merungkaikan bahawa KLF6 berada di titik pusat pengisyratan selular yang menghubungkan tapak laluan isyarat mTORC1 dan homeostasis lipid yang merupakan antara fenotip utama dalam patogenesis ccRCC. KLF6 menghubungkan tapak laluan isyarat mTORC1 dan homeostasis lipid melalui pengaktifan gen hiliran PDGF β , SREBF1 dan SREBF2 (Syafuruddin et al. 2019). Rajah 1.1 menunjukkan ilustrasi ringkasan kajian oleh Syafuruddin et al.



Rajah 1.1 Ilustrasi yang menunjukkan ekspresi KLF6 dalam ccRCC diaruh oleh penggalak super. KLF6 berada di tengah pusat pengisyratan sel yang menghubungkan tapak laluan isyarat mTORC1 dan laluan homeostasis lipid melalui pengaktifan ekspresi gen PDGFB. Selain itu, KLF6 juga mengaktifkan transkripsi gen SREBF2 yang merupakan faktor transkripsi utama yang mengawal atur laluan homeostasis lipid.

Sumber: Diubahsuai dari (Syafuruddin et al. 2019)

Di sebalik penemuan yang penting tentang peranan KLF6 dan mekanisma molekul hiliran yang dikawal oleh KLF6 dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan sel ccRCC, terdapat beberapa jurang pengetahuan yang masih perlu dikaji. Antara yang penting adalah pengenalpastian faktor hulu lain, dari konteks genetik dan epigenetik, yang bertanggungjawab dalam pembentukan dan mengawal atur landskap penggalak super serta pengaktifan ekspresi gen KLF6 yang tinggi dalam ccRCC. Justeru, kajian ini bertujuan untuk mengenalpasti elemen genetik dan epigenetik yang terlibat dalam pengawalaturan penggalak super *KLF6* untuk

mendapatkan pemahaman yang lebih holistik berkaitan tapak laluan isyarat KLF6 dan peranannya dalam patogenesis ccRCC. Pengetahuan yang mendalam ini amat penting dalam usaha untuk membangunkan strategi diagnostik atau terapeutik baru yang lebih berkesan untuk ccRCC.

1.2 KEPENTINGAN KAJIAN

Seperti yang telah digariskan dalam seksyen di atas, kadar tindakbalas pesakit ccRCC terhadap kaedah rawatan yang diberikan masih kurang memuaskan. Meskipun terdapat pesakit yang memberi respon positif, terdapat kekangan di mana kanser akan tumbuh kembali dan kanser berulang ini secara amnya adalah lebih agresif serta memperoleh ketahanan baharu terhadap rawatan yang telah diberikan. Selain itu, halangan terbesar untuk merawat ccRCC secara berkesan adalah penyakit ini selalunya didiagnosis pada tahap akhir di mana sel kanser telah bermetastasis dan merebak ke organ sekunder. Pada tahap ini, sel kanser adalah sangat agresif, mempunyai rintangan terapeutik yang tinggi dan tidak dapat dirawat dengan efektif oleh kaedah rawatan sedia ada. Justeru itu, kadar mortaliti ccRCC terutama sekali di kalangan pesakit tahap akhir adalah amat tinggi. Usaha dan perhatian khusus harus diberikan untuk membangunkan strategi baharu yang lebih efisien dalam merawat penyakit ini.

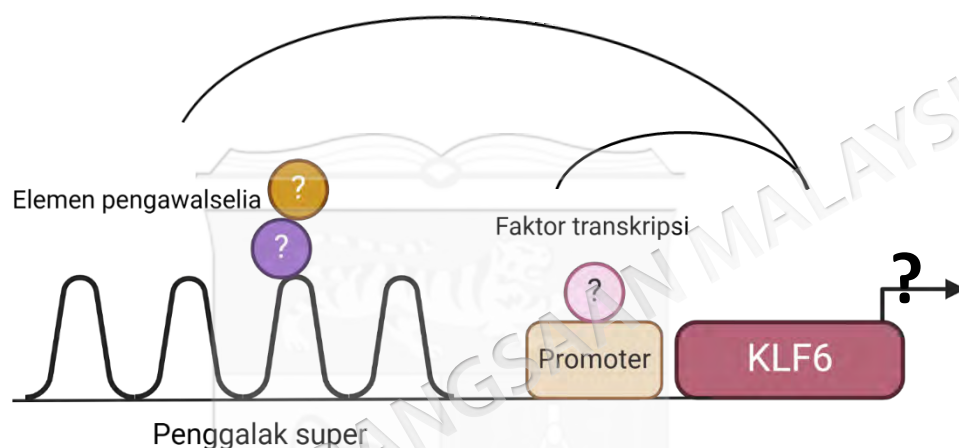
Pemahaman yang masih kurang jelas berkaitan mekanisma molekul yang memandu patogenesis dan perkembangan ccRCC adalah antara penyebab yang menyukarkan pembangunan kaedah terapeutik yang efektif untuk penyakit ini. Pengetahuan yang lebih holistik tentang patogenesis ccRCC adalah penting dan amat diperlukan. Hal ini dapat membantu untuk mengenalpasti protein atau komponen yang mana sel ccRCC mempunyai kebergantungan yang tinggi dan seterusnya dapat disasarkan secara terapeutik dengan lebih berkesan. Selain itu, kaedah diagnosis sedia ada juga adalah kurang efektif untuk mengesan ccRCC pada peringkat awal di mana pada masa kini, pengesanan awal adalah kunci utama dalam merawat dan menghalang daripada penyakit ini menjadi lebih agresif dan merebak (Barata & Brian I. Rini 2017). Di samping itu, kajian terkini juga telah menunjukkan yang ccRCC mempunyai heterogeniti yang tinggi di mana profil mutasi dalam sel intratumoral dan metastatik klon adalah berbeza antara satu sama lain (Gerlinger et al. 2014; Turajlic et al. 2018a,

2018b). Hal ini telah menyukarkan lagi pembangunan strategi terapeutik yang lebih berkesan untuk merawat penyakit ini. Justeru, penyasaran paksi VHL-HIF2 α atau mekanisma molekul hiliran yang dikawal atur oleh paksi ini dilihat sebagai strategi yang lebih praktikal kerana mutasi dalam gen VHL adalah *truncal event* dalam pembentukan ccRCC dan dijumpai dalam 90% pesakit ccRCC.

Kajian oleh Syafruddin dan rakan-rakan telah berjaya menemui dan mencirikan fungsi penting faktor transkripsi KLF6 yang dikawal oleh penggalak super dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan ccRCC. Kajian terdahulu ini lebih memfokuskan kepada fungsi KLF6 dan mekanisma molekul hiliran yang dikawal atur oleh KLF6. Meskipun terdapat penemuan yang menunjukkan HIF2 α mengikat salah satu konstituen penggalak super *KLF6*, masih terdapat jurang pengetahuan yang besar terutama sekali berkaitan komponen hulu lain yang terlibat dalam mengawal atur pembentukan dan aktiviti penggalak super serta transkripsi aktif *KLF6* dalam ccRCC (Syafruddin et al. 2019). Pengetahuan ini termasuk keterlibatan faktor epigenetik yang mengawal pembukaan dan penutupan kromatin melalui pengikatan, pembacaan dan modifikasi protein histon. Sehubungan itu, kajian Ph.D ini memberi tumpuan kepada penyiasatan peranan *histone acetyltransferases* (HATs) P300 dan BRD4 serta modifikasi histon dalam mengawal atur landskap penggalak super *KLF6* melalui pembukaan dan penutupan kromatin dan seterusnya mengaruh pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC.

Selain itu, pengetahuan berkaitan faktor transkripsi selain HIF2 α yang mengikat pada penggalak super dan memandu ekspresi gen *KLF6* dalam ccRCC juga diperlukan dalam mendapatkan pemahaman patogenesis ccRCC yang lebih holistik. Kajian terdahulu telah menganalisa motif DNA dengan menggunakan perisian MEME Suite dan FIMO untuk mengenalpasti calon faktor transkripsi yang mengikat penggalak super *KLF6*. Hasil analisis menunjukkan motif transkripsi faktor MEF2 dalam wilayah promotor *KLF6*. Bagi pengesahan, analisis data TCGA RNA-seq telah dijalankan yang menunjukkan korelasi positif antara tahap ekspresi *KLF6* dan *MEF2C*. Berdasarkan penemuan ini, kajian ini juga menyiasat peranan faktor transkripsi MEF2C dalam mengikat wilayah promotor dan mengaruh ekspresi gen *KLF6* dalam ccRCC.

Pengetahuan yang diperolehi daripada persoalan kajian ini penting dalam mendapatkan pemahaman yang lebih holistik tentang isyarat laluan dan rangkaian transkripsi KLF6 dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan sel ccRCC. Hal ini seterusnya secara langsung dapat membuka jalan untuk pembangunan kaedah diagnosis dan/atau terapeutik, terutama sekali yang berkisar dalam penyasaran rangkaian transkripsi KLF6, yang lebih berkesan untuk rawatan penyakit ccRCC. Rajah 1.2 menunjukkan ilustrasi jurang pengetahuan kajian ini.



Rajah 1.2

Ilustrasi jurang pengetahuan yang masih kurang jelas berdasarkan penemuan penyelidikan terdahulu. Dua jurang pengetahuan yang dikaji secara spesifik dalam projek ini adalah pengenaltastian dan pencirian: (i) elemen pengawalselia epigenetik yang mengawal kebolehcapaian kromatin dan menyokong penggalak super KLF6 dalam ccRCC dan (ii) faktor transkripsi yang mengikat pada KLF6 dan mengaruh ekspresi tinggi KLF6 dalam ccRCC.

1.3 PERMASALAHAN KAJIAN

Merujuk kepada jurang pengetahuan yang dibincangkan dalam seksyen 1.2 di atas, berikut adalah persoalan-persoalan yang dikaji dan dijawab melalui kajian Ph.D ini:

- i. Adakah perencatan *histone acetyltransferases* (HATs), P300 dan BRD4, melalui kaedah kimia akan mengurangkan isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super gen KLF6 dan menurunkan tahap pengekspresan gen KLF6?
- ii. Apakah kesan deasetilasi histon dengan menggunakan teknik CRISPR-dCas9-hHDAC3 ke atas tahap isyarat H3K27ac konstituen penggalak super gen KLF6 dan tahap pengekspresan gen KLF6?
- iii. Adakah faktor transkripsi MEF2C mengikat wilayah promotor gen KLF6 dan memandu ekspresi gen KLF6 dalam sel ccRCC?
- iv. Apakah kesan penyenyapan faktor transkripsi MEF2C dengan menggunakan teknik CRISPR-dCas9-KRAB ke atas fenotip dan kebolehhidupan sel ccRCC?

1.4 OBJEKTIF KAJIAN

1.4.1 Objektif umum

Objektif umum kajian ini adalah untuk mengenalpasti dan mencirikan komponen epigenetik dan genetik yang berperanan dalam mengawal atur landskap penggalak super *KLF6* dan mengaruh pengekspresan tinggi gen KLF6 dalam ccRCC.

1.4.2 Objektif khusus

Berikut adalah objektif khusus yang akan menyumbang kepada usaha pencapaian objektif umum kajian ini:

- i. Mengukur kesan perencatan aktiviti *histone acetyltransferases* (HATs), P300 dan BRD4, ke atas isyarat H3K27ac di lokus penggalak super gen KLF6 dan tahap ekspresi gen KLF6.

- ii. Menentukan deasetilasi histon pada konstituen penggalak super gen KLF6 dengan menggunakan teknik CRISPR-dCas9-hHDAC3 akan membawa kepada modifikasi landskap kromatin dan pengurangan tahap ekspresi gen KLF6.
- iii. Menentukan faktor transkripsi MEF2C mengikat pada wilayah promoter gen KLF6 dan memandu ekspresi gen KLF6 dalam ccRCC.
- iv. Mengukur kesan fenotip penyenapan ekspresi faktor transkripsi MEF2C dalam model in-vitro ccRCC menggunakan pendekatan CRISPR-dCas9-KRAB.

1.5 HIPOTESIS KAJIAN

- i. Perencatan HATs, P300 dan BRD4, secara kaedah kimia akan mengurangkan isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super gen KLF6 dan seterusnya mengurangkan tahap ekspresi gen KLF6.
- ii. Deasetilasi histon pada konstituen penggalak super gen KLF6 dengan menggunakan teknik CRISPR-dCas9-hHDAC3 akan membawa kepada modifikasi landskap kromatin dan mengurangkan tahap ekspresi gen KLF6.
- iii. Faktor transkripsi MEF2C mengikat wilayah promoter gen KLF6 dan memandu ekspresi gen KLF6 dalam ccRCC.
- iv. Penyenapan MEF2C menggunakan CRISPR-dCas9-KRAB tidak menjejaskan pertumbuhan sel ccRCC.

BAB II

KAJIAN LITERASI

2.1 PENGENALAN KANSER

Kanser didefinisikan sebagai penyakit berbahaya yang disebabkan oleh pertumbuhan sel tidak normal yang membahagi tanpa kawalan (*Kamus Dewan* 2005). Sel normal kebiasaannya mempunyai keupayaan untuk membahagi bergantung kepada ransangan atau stimulus dalaman dan luaran. Sebagai contoh, sel akan membahagi untuk menghasilkan sel progeni ketika proses pembentukan dan perkembangan embrio dan organ, penggantian sel yang rosak atau mati, pembentukan saluran darah baharu dan sebagainya. Setiap proses ini dikawal rapi dan mempunyai mekanisme dan isyarat laluan pengawalaturan yang tertentu bagi memastikan fungsi badan manusia dapat berjalan dengan secara normal. Mekanisma asas pembahagian sel bergantung kepada fungsi gen atau protein tertentu yang terlibat secara langsung dalam mengawal kitaran hidup sel dan memandu sel untuk membahagi, bertumbuh dan kekal hidup.

Sebagai contoh, protein P53 adalah salah satu pengawalatur utama dalam proses pembahagian sel dan kematian sel. Protein P53 digelar sebagai "penjaga genom" kerana peranannya dalam bertindak balas kepada pelbagai tekanan luaran atau dalaman. Tekanan ini termasuk sinaran, bahan toksik, kekurangan nutrien, kitaran sel yang tidak terkawal, kerosakan DNA, pengaktifan onkogen dan hipoksia (Boutelle & Attardi 2021; Hafner et al. 2019; Wang, Strasser & Kelly 2022). Dalam kondisi normal, tahap ekspresi *TP53* adalah rendah jika tiada rangsangan daripada tekanan. P53 bertindak balas terhadap tekanan yang dihadapi dengan memacu penghentian kitaran sel (*cell cycle arrest*), pembaikan DNA, penuaan sel, apoptosis dan autofagi (Pan & Blattner 2021).

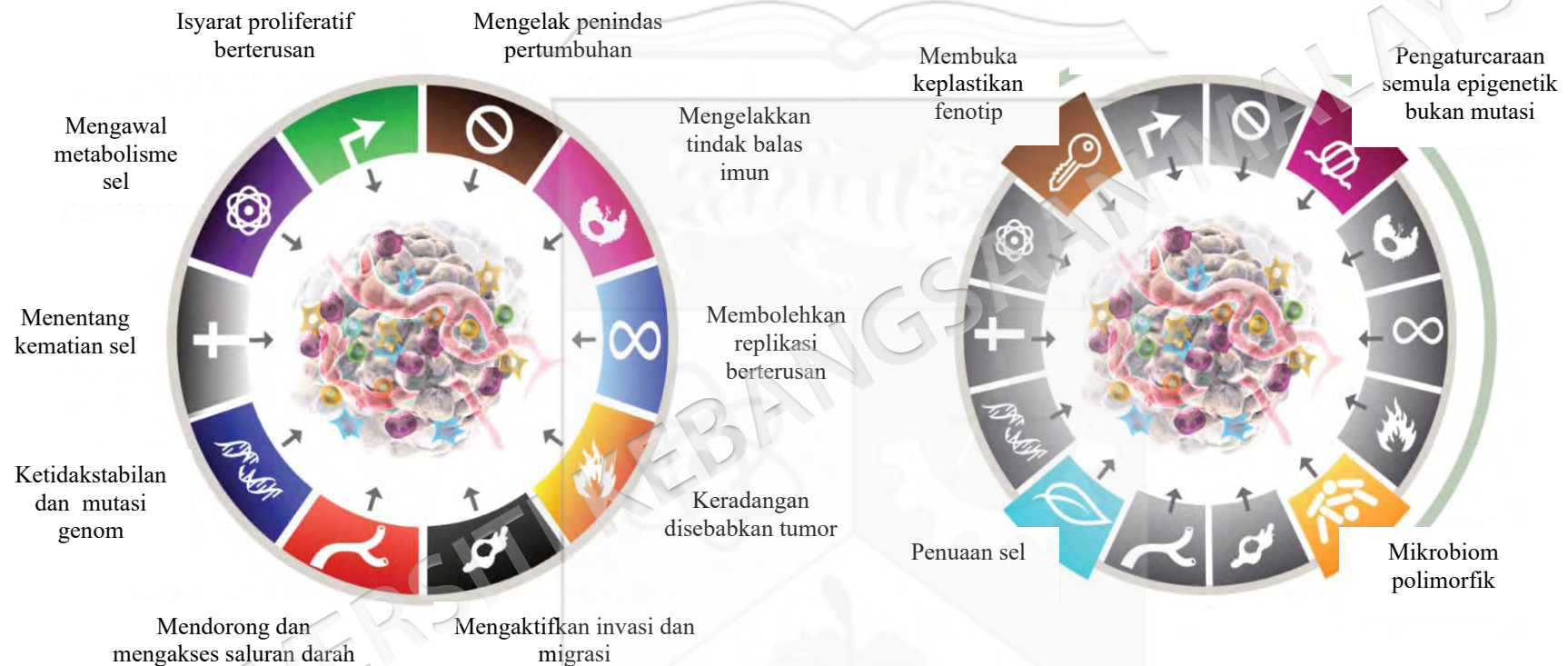
Selain itu, *MYC* ialah keluarga gen pengawalatur dan proto-onkogen yang mengkodkan faktor transkripsi. Keluarga *MYC* terdiri daripada tiga gen yang berkaitan: *c-MYC* (*MYC*), *l-MYC* (*MYCL*), dan *n-MYC* (*MYCN*). Komponen-komponen genetik yang terlibat dalam aliran *MYC* adalah yang terlibat dalam biogenesis ribosom, terjemahan mRNA, peraturan kitaran sel, dan tindak balas tekanan, yang seterusnya memberi kesan kepada pelbagai fungsi biologi seperti percambahan, pembedaan, kelangsungan hidup, kematian sel, dan peraturan imun (Dang 2012; Meyer & Penn 2008).

Walau bagaimanapun, gen atau protein yang dibincangkan di atas boleh mengalami perubahan genetik dan/atau epigenetik yang seterusnya mengganggu fungsi normal mereka dalam mengawal atur kitaran hidup dan pertumbuhan sel. Kegagalan untuk menjalankan fungsinya dengan baik akan menyebabkan sel akan membahagi dan bertumbuh tanpa kawalan. Hal ini seterusnya akan menghasilkan sel kanser yang boleh menjadi agresif dan merebak ke kawasan lain di dalam badan. Pemerebakan sel kanser ini dikenali sebagai metastasis menyumbang kepada 90% kepada kematian yang disebabkan oleh kanser. Mutasi pada gen ini boleh berlaku secara sporadik dalam jangka hayat seseorang individu yang boleh disebabkan oleh kesilapan dalam proses replikasi DNA ketika proses pembahagian sel atau pendedahan kepada mutagen yang boleh merosakkan struktur atau integriti DNA. Selain itu, mutasi pada gen ini boleh diwarisi daripada keturunan yang boleh menyebabkan kanser familial.

Sebagai contoh, penyahaktifan *TP53* lazimnya berlaku dalam tumorigenesis. Kira-kira 50% daripada semua tumor mempunyai mutasi dalam gen *TP53*. Gen *TP53* adalah pemain utama dalam pembentukan kanser, dan ia dianggap sebagai gen penindas tumor yang paling penting (Vaddavalli & Schumacher 2022). Majoriti mutasi dalam *TP53* adalah mutasi *missense*. Mutasi *TP53* kebiasaannya ditemui bersama-sama dengan mutasi *BRCA1* atau *BRCA2* yang diwarisi dan spontan dalam kanser ovari dan payudara. Menariknya, 70 - 90% kanser dengan mutasi *BRCA1* juga mempunyai mutasi dalam gen *TP53* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Mutasi *TP53* sering diperhatikan dalam kebanyakan kanser paru-paru, kolon dan pankreas dengan mutasi *RAS* (Cancer Genome Atlas Network 2012; Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013).

Selain itu, onkoprotein MYC mengawal transkripsi hampir 15% gen yang terekspres (Dang 2012). Dalam kebanyakan jenis kanser, ekspresi protein MYC tidak dikawal atur secara normal dan ekspresi *MYC* yang tinggi sering dikaitkan dengan prognosis yang tidak baik. Penyahkawalaturan ini bukan sahaja disebabkan oleh pemindahan kromosom atau perubahan nombor salinan yang melibatkan gen MYC, tetapi juga disebabkan oleh kedudukan *MYC* yang berada di hiliran beberapa tapak laluan isyarat onkogenik. Pengaktifan *MYC* menyumbang kepada replikasi DNA tanpa henti, peningkatan sintesis protein, pengaktifan suis angiogenik, penindasan tindak balas terhadap program pengawalaturan autokrin dan parakrin (Dang 2012).

Kanser mempunyai mekanisme tersendiri untuk bertumbuh, merebak dan mempunyai daya tahan yang tinggi di dalam tubuh manusia. Enam ciri kanser telah dicadangkan oleh Hanahan dan Weinberg pada tahun 2000 (disebut sebagai ciri I) iaitu merangsang isyarat proliferasif yang berterusan, mengelak penindasan pertumbuhan, menghalang kematian sel, membolehkan replikasi berterusan, mengaruh pembentukan saluran darah baharu, dan mengaktifkan invasi dan migrasi (Hanahan & Weinberg 2000). Kemudian pada tahun 2011, dua ciri khas telah ditambah iaitu (disebut sebagai ciri II): mengawal metabolisme sel dan mengelakkan tindak balas imun (Hanahan & Weinberg 2011). Selain itu, dua ciri lain telah ditambah dan melengkapkan 10 ciri khas kanser iaitu: ketidakstabilan dan mutasi genom serta keradangan disebabkan tumor. Seterusnya pada tahun 2022, Hanahan telah menambah empat lagi ciri khas kanser seperti yang digambarkan dalam Rajah 2.1.



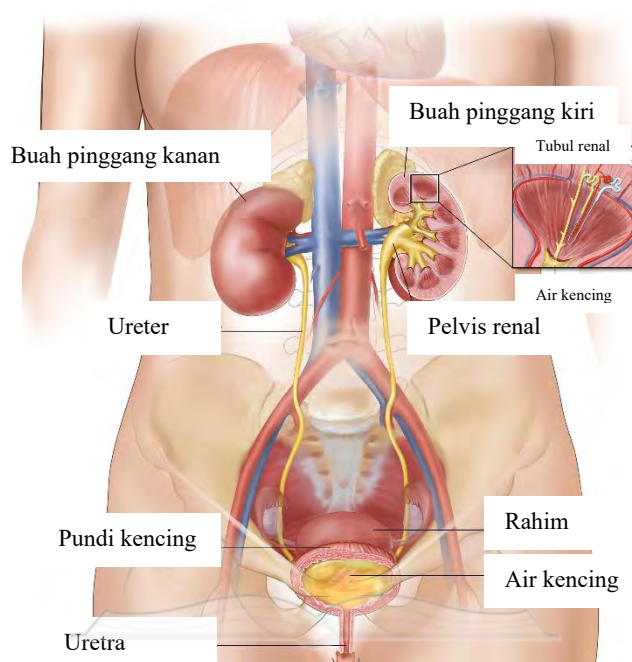
Rajah 2.1 Ciri khas dan fenotip kanser yang memainkan peranan penting dalam menyokong pertumbuhan, perkembangan dan kemandirian sel kanser. Model ini merangkumi fenotip utama yang mencirikan perkembangan dan kelangsungan hidup sel kanser. Ciri khas kanser terdiri daripada pelbagai mekanisme yang membolehkan sel kanser berkembang dalam persekitaran mikro tumor serta menyumbang kepada sifat agresif kanser. Pemahaman tentang ciri ini memainkan peranan penting dalam penyelidikan kanser dan pembangunan strategi terapeutik.

Sumber: Diubahsuai dari (Hanahan 2022)

2.2 PENGENALAN SISTEM BUAH PINGGANG

Sistem buah pinggang atau dikenali sebagai sistem perkumuhan mempunyai fungsi penting iaitu mengekalkan homeostasis badan melalui penyingkiran bahan buangan yang tidak diperlukan hasil daripada proses metabolisme sel. Di samping itu, sistem perkumuhan juga berfungsi untuk menyingkirkan air berlebihan daripada dalam badan dan juga terlibat dalam penghasilan enzim yang diperlukan oleh badan. Komponen sistem perkumuhan manusia terdiri daripada buah pinggang, ureter, pundi kencing, dan uretra seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.2 (*National Cancer Institute* 2011).

Buah pinggang atau ginjal merupakan organ utama dalam sistem perkumuhan manusia di mana organ ini memainkan peranan penting dalam menapis dan menyingkirkan toksin, bahan buangan metabolik dan ion berlebihan melalui penghasilan air kencing. Selain itu, buah pinggang juga bertindak menyerap semula mineral penting seperti natrium, kalsium, fosforus, dan kalium untuk mengekalkan keseimbangan kandungan mineral dalam darah pada kadar yang diperlukan. Air kencing yang terhasil melalui proses penapisan oleh buah pinggang kemudiannya akan disalurkan ke pundi kencing melalui tiub yang dipanggil ureter sebelum dikumuhkan melalui uretra (Wallace 1998).

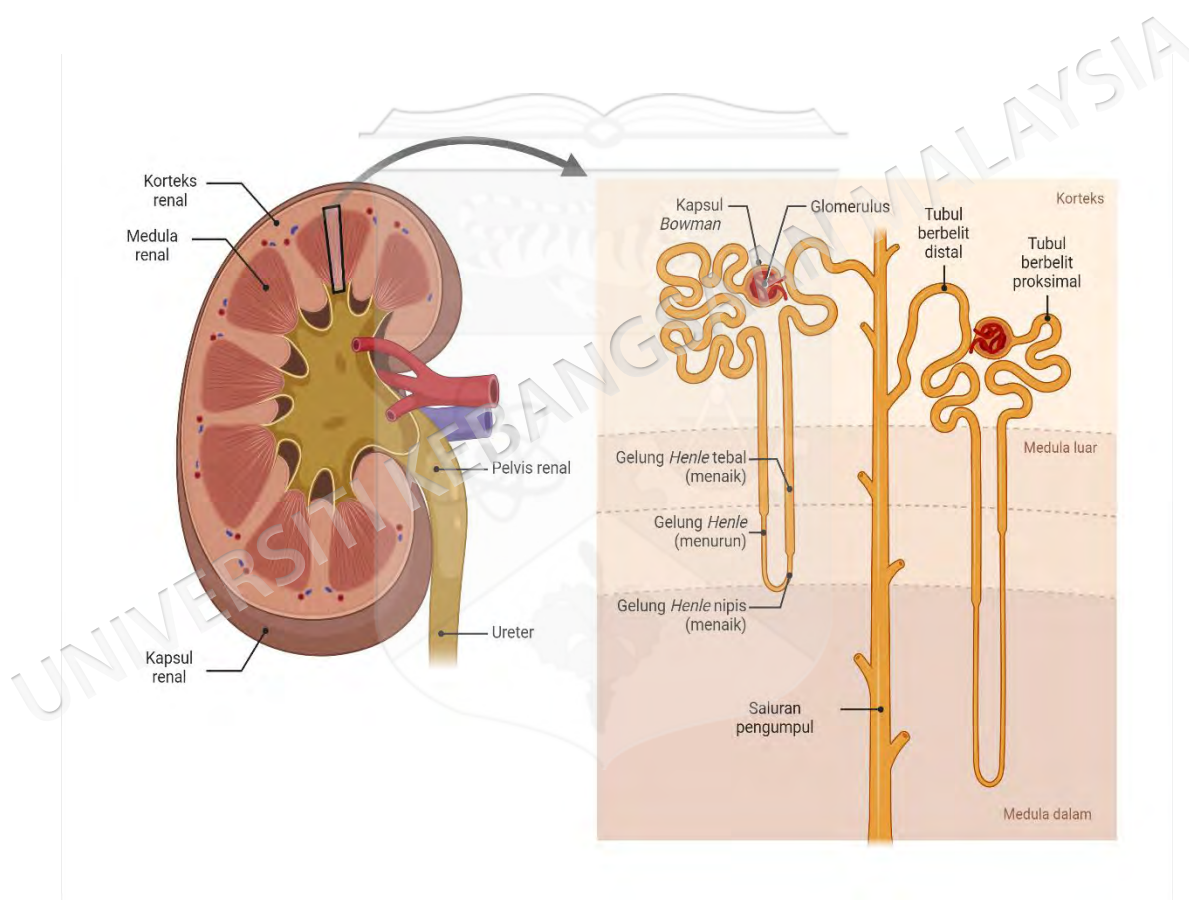


Rajah 2.2 Anatomi sistem buah pinggang (wanita) yang menunjukkan buah pinggang, ureter, pundi kencing, dan uretra. Air kencing dihasilkan dalam tubul renal dan terkumpul di pelvis renal setiap buah pinggang. Air kencing mengalir dari buah pinggang melalui ureter ke pundi kencing. Air kencing disimpan dalam pundi kencing sehingga ia dikeluarkan dari badan melalui uretra.

Sumber: Diubahsuai dari (*National Cancer Institute 2011*)

Selain daripada mengekalkan homeostasis darah dan keseimbangan komposisi cecair badan, buah pinggang juga mempunyai peranan sebagai organ endokrin yang merembeskan hormon atau enzim. Sebagai contoh, renin yang dirembeskan oleh buah pinggang terlibat dalam proses pengawalan tekanan darah melalui sistem renin-angiotensin (RAS). Selain itu, sebagai tindakbalas terhadap kekurangan oksigen dalam tubuh, buah pinggang akan merembeskan hormon eritropoietin yang akan disalurkan ke ke sumsum tulang untuk merangsang penghasilan sel darah merah baharu. *Calcitriol* (1,25 dihydroxy vitamin D₃), salah satu jenis vitamin D yang aktif dihasilkan dalam mitokondria tubul proksimal renal. Ia adalah hormon yang mengaktifkan reseptor vitamin D dalam sel, seterusnya meningkatkan ekspresi banyak gen (Acharya & Olivero 2018). Selain itu, buah pinggang menghasilkan enzim seperti *kallikrein*, sejenis protease yang mampu membelah ikatan peptida dalam protein (Sahay, Kalra & Bandgar 2012).

Dari segi anatomi dan struktur, manusia mempunyai sepasang buah pinggang yang terletak di bawah sangkar rusuk. Buah pinggang sebelah kanan adalah lebih rendah sedikit daripada buah pinggang sebelah kiri kerana terdapatnya hati di bahagian kanan abdomen manusia. Buah pinggang dikelilingi oleh lapisan nipis kapsul renal di mana darah dipam ke dalam buah pinggang melalui arteri renal dan meninggalkan buah pinggang melalui vena renal. Darah beredar melalui korteks renal dan melepasi medula renal. Medula renal mengandungi banyak tiub panjang yang sangat kecil dipanggil nefron yang bertindak sebagai struktur penapis. Nefron bergelung antara korteks renal dan medula renal seperti yang digambarkan dalam Rajah 2.3.



Rajah 2.3

Anatomi buah pinggang dan nefron. Nefron merangkumi dua kumpulan struktur iaitu *corpuscle* renal dan tubul renal. *Corpuscle* renal terdiri daripada glomerulus yang dikelilingi oleh kapsul glomerulus. *Corpuscle* renal adalah struktur penapis bagi nefron. Tubul berbelit proksimal adalah tubul yang terikat terus pada glomerulus. Gelung *Henle* membentuk selekoh dengan menghubungkan dua tubul iaitu tubul menaik dan menurun. Tubul terakhir adalah tubul berbelit distal yang terletak lebih jauh dari glomerulus.

Bagi meningkatkan kecekapan buah pinggang dalam menjalankan fungsinya sebagai organ perkumuhan, terdapat 1 hingga 1.3 juta nefron dalam setiap buah pinggang yang berfungsi menapis bahan buangan daripada badan. Nefron mempunyai dua bahagian utama iaitu (i) *corpuscle* renal yang terdiri daripada kapsul *Bowman* dan glomerulus dan (ii) tubul renal (Sembulingam & Sembulingam 2012). Tubul berbelit proksimal, gelung *Henle*, tubul berbelit distal dan saluran pengumpul pula membentuk bahagian tubul renal. Darah yang disalurkan ke kapilari glomerulus melalui arteriol aferen dan ditapis melalui celah yang dibentuk oleh sel podosit ke dalam kapsul *Bowman*.

Celahan glomerulus yang kecil ini membolehkan hanya bahan tertentu sahaja meninggalkan saluran darah dan masuk ke dalam nefron untuk penapisan. Turasan yang terbentuk bukan sahaja mengandungi bahan buangan tetapi juga bahan penting yang diperlukan oleh tubuh seperti mineral, ion, glukosa, asid amino dan protein yang lebih kecil. Justeru itu, elemen penting ini akan diserap masuk semula ke dalam sistem peredaran darah apabila melalui tubul renal. Bahan buangan akan terus beredar melalui tubul renal sehingga sampai ke saluran pengumpul dan seterusnya dikumuhkan daripada badan melalui pundi kencing dan uretra (Sembulingam & Sembulingam 2012).

2.3 PENGENALAN KANSER BUAH PINGGANG

Seperti organ lain di dalam badan, buah pinggang juga terdedah kepada pembentukan kanser yang disebabkan oleh pembahagian dan pertumbuhan sel yang tidak terkawal akibat perubahan genetik dan epigenetik. Sekiranya tidak dikesan dan dirawat pada peringkat awal, kanser buah pinggang ini akan menjadi lebih agresif dan boleh merebak ke tisu sekeliling dan seterusnya ke organ sekunder seperti paru-paru dan tulang. Statistik pada tahun 2020 melaporkan lebih daripada 431,288 diagnosis baharu kes kanser buah pinggang dengan kira-kira 179,368 kematian berkaitan kanser buah pinggang di seluruh dunia (Sung et al. 2021). Kanser buah pinggang merupakan kanser ke-16 paling tinggi dicatatkan selepas kanser pankreas dan leukemia. Dari aspek jantina, lelaki adalah 2 hingga 3 kali lebih berisiko untuk mendapat kanser buah pinggang berbanding wanita. Kenyataan ini disokong oleh statistik yang diterbitkan oleh *Global Cancer Statistics 2020* yang menunjukkan lelaki menyumbang kepada 271,249 kes

kanser buah pinggang berbanding dengan kes wanita yang sebanyak 160,039 (Sung et al. 2021).

Di Malaysia, peratusan penghidap kanser buah pinggang juga adalah tinggi dikalangan kaum lelaki iaitu sebanyak 1276 kes berbanding kaum wanita 595 kes. Dalam kalangan lelaki, kaum India mencatatkan peratusan insiden tertinggi kanser buah pinggang sebanyak 40%, diikuti dengan kaum Cina 32%, dan kaum Melayu sebanyak 28%. Manakala dalam kalangan wanita, kaum Cina mencatatkan peratusan insiden paling tinggi sebanyak 38%, diikuti dengan kaum Melayu 31%, dan kaum India sebanyak 31%. Purata umur pesakit kanser buah pinggang di Malaysia bagi kaum lelaki dan wanita adalah dalam lingkungan umur 60 tahun dan keatas. Lebih dari 50% kes kanser buah pinggang lazimnya dilaporkan didiagnosis pada pada tahap 4 dimana kanser telah berada pada peringkat terakhir (*Malaysian National Cancer Registry Report 2012*).

Pengesanan tahap awal yang diikuti dengan pembedahan untuk membuang sel kanser di kawasan primer adalah kaedah rawatan yang paling efisien. Strategi ini dapat memanjangkan jangka hayat dan meningkatkan kualiti hidup pesakit kanser buah pinggang. Selain itu, ini adalah penting kerana ia dapat menghalang sel-sel kanser daripada menjadi lebih agresif dan merebak ke organ sekunder. Walau bagaimanapun, pembedahan berkemungkinan akan memberikan kesan negatif ke atas fungsi buah pinggang yang seterusnya akan mengganggu proses homeostasis dan fisiologi normal manusia. Namun begitu, cabaran terbesar dalam rawatan kanser buah pinggang adalah diagnosis lewat di mana sebahagian besar pesakit hanya didiagnosis setelah sel kanser merebak ke organ sekunder. Kebiasaanya pada tahap ini, sel kanser tidak lagi akan bertindakbalas terhadap rawatan kemo- dan radioterapi yang dijalankan yang seterusnya akan mengurangkan kualiti hidup dan kadar survival pesakit dengan sangat drastik.

Kanser buah pinggang boleh diklasifikasi kepada beberapa jenis iaitu: (i) kanser sel renal, (ii) karsinoma sel transisi, (iii) sel sarkoma buah pinggang dan (iv) tumor *Wilms*. Kanser sel renal (*Renal cell carcinoma - RCC*) merupakan jenis kanser buah pinggang yang paling banyak didiagnosis iaitu dalam sebanyak 90% daripada jumlah keseluruhan kes di kalangan orang dewasa di seluruh dunia (Escudier et al. 2019). Pada

umumnya, RCC berasal daripada sel epitelium yang melapisi tubul renal yang merupakan sebahagian daripada sistem penapisan buah pinggang. Karsinoma sel transisi atau karsinoma sel peralihan terbentuk di dalam bahagian renal pelvis dan menyumbang kepada 5% - 10% kes kanser buah pinggang di kalangan orang dewasa. Sarkoma pula adalah jenis kanser buah pinggang yang paling jarang ditemui di mana kanser ini berasal daripada lapisan nipis kapsul tisu yang mengelilingi buah pinggang. Namun begitu, sarkoma mempunyai kadar berulang yang tinggi dan biasanya adalah sangat agresif dan mudah untuk bermetastasis ke organ sekunder (Acharya & Olivero 2018). Akhir sekali, tumor *Wilms* yang juga dikenali sebagai nefroblastoma, adalah jenis kanser metastatik buah pinggang yang selalu ditemui di kalangan kanak-kanak (Pater et al. 2021).

2.4 SIMPTOM DAN RISIKO PENYAKIT KANSER BUAH PINGGANG

Pada peringkat awal, RCC kebiasaannya tidak menunjukkan gejala ketika isipadu tumor kurang daripada 3 cm. Dianggarkan 25% pesakit adalah asimtomatik, dan penemuan awal tumor selalunya ditemui secara kebetulan ketika pesakit menjalani rutin kajian radiologi. Apabila tumor semakin membesar, antara simptom yang pesakit mungkin hadapi adalah hematuria, sakit belakang, keletihan, penurunan berat badan, anemia, demam dan paras kalsium serum yang tinggi. Hematuria, sakit pada rusuk dan ketulan pada bahagian rusuk adalah simptom yang jarang berlaku dan hanya terdapat dalam kalangan 10% pesakit. Sekiranya pesakit menghadapi ketiga-tiga simptom ini, penyakit ini telah berada ditahap lanjutan (Escudier et al. 2019).

Kebiasaannya, peningkatan kes RCC berlaku dengan ketara seiring dengan peningkatan usia, jauh lebih tinggi di kalangan orang dewasa yang lebih tua. Golongan lelaki lebih berisiko menghidap penyakit ini berbanding golongan wanita di seluruh dunia (Sung et al. 2021). Merokok, hipertensi dan obesiti adalah faktor risiko yang paling lazim dalam RCC (Christakoudi et al. 2020; Czyzyk-Krzeska et al. 2021). Beberapa kajian kohort dan kawalan kes telah menyediakan bukti yang kukuh untuk menunjukkan perhubungan bersebab antara merokok dan perkembangan RCC (*National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health* 2014). Terdapat bukti bahawa bukan perokok yang terdedah kepada asap rokok di persekitaran di rumah atau di tempat kerja lebih cenderung

menghidapi RCC (Theis et al. 2008). Selain itu, RCC juga telah dikaitkan dengan pelbagai pembolehubah gaya hidup, pemakanan, pekerjaan dan persekitaran, dengan pelbagai peringkat bukti (Chow, Dong & Devesa 2010).

Kanser buah pinggang lebih kerap berlaku di kalangan bangsa Afrika-Amerika, India-Amerika, dan Orang Asli Alaska di Amerika Syarikat. RCC jarang berlaku di kalangan orang Asia di Amerika Syarikat dan negara Asia yang lain. Ini menunjukkan bahawa kejadian RCC berbeza mengikut kumpulan etnik atau kaum (Znaor et al. 2015). Meskipun RCC kurang kerap berlaku dalam populasi Asia, RCC tetap merupakan antara kanser buah pinggang yang paling dominan dan mempunyai kadar kelangsungan hidup yang rendah apabila didiagnosis lewat atau pada tahap akhir. RCC juga dikenali sebagai tumor yang sangat angiogenik, bermaksud pertumbuhannya bergantung kepada pembentukan salur darah baru yang tinggi untuk menyalurkan keperluan oksigen dan nutrien. Ciri ini berpunca daripada mutasi yang sering berlaku dalam gen VHL, yang seterusnya mengaktifkan faktor hipoksia dan meningkatkan ekspresi gen pro-angiogenik seperti VEGF. Oleh itu, terapi yang menyasarkan angiogenesis, seperti perencat tirosin kinase dan antibodi anti-VEGF, merupakan antara strategi utama dalam rawatan RCC.

Namun, keberkesanan rawatan ini masih terbatas kerana rintangan terhadap terapi boleh berlaku, menunjukkan perlunya pemahaman yang lebih mendalam tentang mekanisme molekul yang mengawal pertumbuhan RCC. Dalam konteks ini, kajian ini menyasarkan untuk memahami elemen pengawalaturan hulu yang menyokong ekspresi KLF6 dalam RCC, khususnya melalui pengaruh penggalak super. Hasil kajian ini bukan sahaja dapat menambah pengetahuan baharu dalam pemetaan mekanisme pengawalan genetik dalam RCC, tetapi juga berpotensi membuka laluan kepada pendekatan terapeutik baharu yang lebih berkesan untuk merawat penyakit ini.

2.5 JENIS KANSER SEL RENAL (RCC)

Kanser sel renal atau RCC boleh diklasifikasikan kepada tiga subjenis utama iaitu *clear cell* RCC (ccRCC), *papillary* RCC dan *chromophobe* RCC. Klasifikasi subjenis ini adalah berdasarkan histologi dan analisis struktur tisu di bawah mikroskop. Subjenis ccRCC mempunyai prevalen yang paling tinggi di mana ccRCC menyumbang kepada kira-kira 75% keseluruhan kes kanser buah pinggang di seluruh dunia. Selain itu, ccRCC juga menyumbang kepada kadar kematian paling tinggi di kalangan pesakit kanser buah pinggang. Kajian literasi berkaitan ccRCC yang merupakan fokus kajian ini akan dibincangkan dengan terperinci dalam subseksyen 2.6.

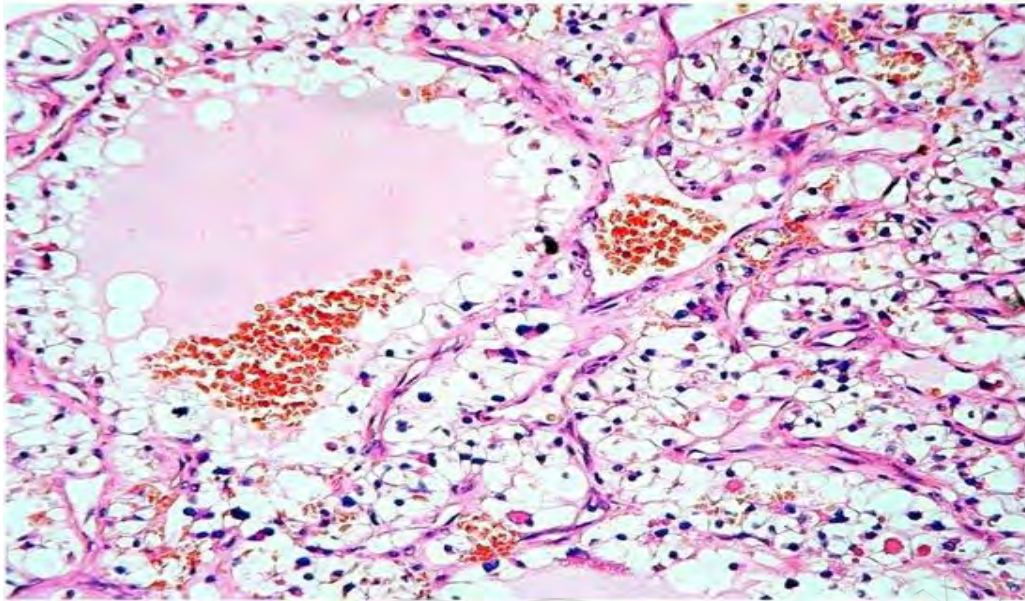
Papillary RCC pula adalah subjenis yang kedua paling kerap didiagnosis yang menyumbang kepada ~10% jumlah keseluruhan kes kanser buah pinggang. *Papillary* RCC boleh dikategorikan kepada jenis 1 dan jenis 2 (Escudier et al. 2019). Mutasi dalam gen *MET* dan *EGFR* adalah ciri molekul utama yang memandu pembentukan *papillary* RCC jenis 1. Pesakit *papillary* RCC jenis 1 mempunyai prevalen mutasi *MET* yang lebih tinggi berbanding pesakit yang menghidap *papillary* RCC jenis 2. Mutasi dalam gen *SETD2*, *CDKN2A* atau gabungan *TFE3* merupakan ciri penting dalam *papillary* RCC jenis 2 (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2016). Mutasi genetik lain yang dilaporkan dalam sampel *papillary* RCC adalah *CDKN2A/B*, *TERT* dan *FH* (Pal et al. 2018).

Subjenis *chromophobe* RCC yang berada di tangga ketiga menyumbang kepada 5% daripada jumlah keseluruhan kes kanser buah pinggang. Subjenis ini mempunyai ciri unik iaitu kehilangan satu salinan bagi setiap kromosom 1, 2, 6, 10, 13 dan 17 secara lengkap. Selain itu, terdapat kehilangan tambahan pada kromosom 3, 5, 8, 9, 11 dan 18, serta lengan kromosom 21q dalam 12% hingga 58% kes *chromophobe* RCC (Davis et al. 2014; Speicher et al. 1994). Mutasi dalam gen TP53, PTEN dan CDKN2A adalah jenis mutasi yang kerap dilaporkan dalam subjenis ini (Davis et al. 2014). Sebagai tambahan, terdapat beberapa subjenis RCC lain yang jarang dijumpai seperti *clear cell papillary* RCC, *hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome-associated* RCC dan *succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma* (Features & Pathology 2019).

2.6 PENGENALAN DAN CIRI UTAMA CCRCC

ccRCC ialah subjenis kanser buah pinggang yang paling lazim yang menyumbang kepada sekurang-kurangnya 75% daripada keseluruhan kes kanser buah pinggang (Thurnher et al. 2017). ccRCC bermula daripada pertumbuhan sel epitelium tubul proksimal renal yang hiper dan tanpa kawalan. Pesakit ccRCC tahap awal secara umumnya mempunyai kadar survival 5 tahun yang tinggi. Manakala prognosis pesakit tahap akhir yang mempunyai metastatik ccRCC adalah tidak baik dengan hanya kurang daripada 10% pesakit yang hidup selama 5 tahun selepas diagnosis. Seperti yang dibincangkan dalam subseksyen 2.3, insiden kanser berulang juga sering dijumpai di kalangan pesakit tahap awal ccRCC yang pada mulanya bertindakbalas positif terhadap rawatan yang diberikan. Insiden relaps ini pada kebiasaannya muncul bersama fenotip sel kanser yang lebih agresif dan memperolehi daya kerintangan yang tinggi terhadap rawatan yang diberikan.

Istilah sel jelas atau "*clear cell*" dalam ccRCC merujuk kepada rupa struktur histologi dan mikroskopik subjenis kanser ini yang mempunyai sitoplasma jelas dan kelihatan seperti kaca. Penampakan histologi ini adalah disebabkan oleh akumulasi glikogen dan lipid yang tinggi dalam sitoplasma subjenis ccRCC ini. Rajah 2.4 menunjukkan imej histologi ccRCC. Antara ciri khas lain ccRCC yang penting adalah prevalen mutasi dalam gen penindas tumor VHL yang amat tinggi yang dijumpai dalam kira-kira 90% pesakit ccRCC. Mutasi dalam gen ini merupakan perubahan genetik pertama yang berlaku (*truncal event*) dalam pembentukan ccRCC (Turajlic et al. 2018a).



Rajah 2.4 Gambar mikroskopik ccRCC. Ciri morfologi ccRCC: sel tumor berkumpul dalam kelompok padat atau dalam struktur seperti folikel dan menunjukkan sitoplasma yang besar. Selain itu, kelompok sel darah merah dan saluran kapilari mudah dikesan di antara sel tumor. (Hematoxilin-eosin, pembesaran asal $\times 200$).

Sumber: Diperoleh dari (Capodiferro et al. 2020)

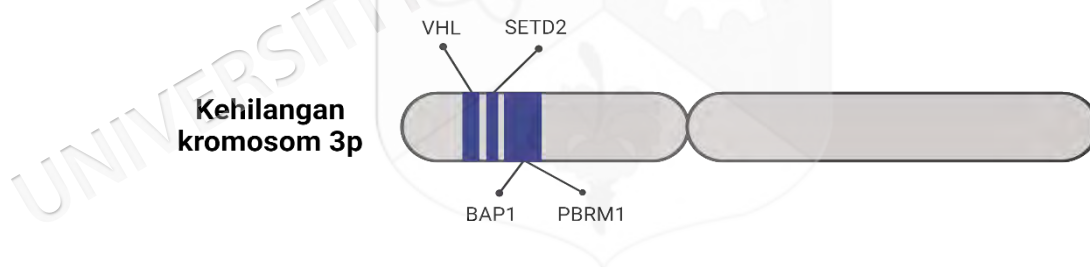
Seterusnya ccRCC bersifat hipervaskular kerana akumulasi pro-angiogenik VEGFA yang merupakan stimulus penting dalam merangsang dan mengawal atur pembentukan salur darah. *VEGFA* adalah gen hiliran yang dipandu oleh $HIF2\alpha$. Mutasi dalam gen *VHL* menyebabkan akumulasi $HIF2\alpha$ secara abnormal yang seterusnya menyumbang kepada penghasilan VEGFA yang tinggi (Kaelin 2002; Zhang & Zhang 2018). Di samping itu, hiperaktiviti pada tapak laluan isyarat mTORC1 juga kerap dijumpai dalam kalangan pesakit ccRCC (Pantuck et al. 2007; Robb et al. 2007). Kajian lepas melaporkan hiperaktiviti ini disebabkan oleh ekspresi tinggi gen *KLF6* dalam sel ccRCC yang merupakan pengawalatur hulu *PDGF\beta* yang bertindak sebagai agonis pengaktifan tapak laluan isyarat mTORC1 (Syafuruddin et al. 2019).

Ciri unik seterusnya adalah ccRCC mempunyai heterogeniti yang tinggi di antara tisu kanser primer dan klon metastatiknya. Di samping itu, intratumoral heterogeniti yang tinggi ini juga dilaporkan di mana penjujukan genom keseluruhan menunjukkan bahawa jujukan kawasan kanser primer berbeza mempunyai profil mutasi yang berbeza (Gerlinger et al. 2014; Turajlic et al. 2018a). Heterogeniti ccRCC yang tinggi ini telah menyumbang kepada kekurangan keberkesanan kaedah rawatan yang

diberikan kepada pesakit ccRCC dan merupakan antara cabaran klinikal besar yang perlu diselesaikan. Selain daripada mutasi gen VHL yang diperolehi secara sporadik, mutasi gen ini boleh juga diwarisi secara keturunan daripada keluarga yang diberi nama sebagai sindrom *Von-Hippel Lindau*. Kajian literasi mengenai gen penindas VHL ini dan implikasinya dalam pembentukan dan perkembangan ccRCC akan dibincangkan dalam subseksyen seterusnya.

2.6.1 Ciri molekul ccRCC

Beberapa gen penindas tumor tambahan telah dikenal pasti berhampiran gen VHL. *VHL*, *PBRM1*, *BAP1* dan *SETD2* terletak di kawasan lengan pendek kromosom manusia 3. Pemadaman struktur dan fungsi kawasan ini dikenali sebagai “kehilangan kromosom 3p” (Rajah 2.5). Kehilangan kromosom 3p telah disahkan sebagai ciri khas karsinogenik yang lazimnya berlaku dalam ccRCC. Mutasi dalam *BAP1* dan *PBRM1* sebahagian besarnya saling eksklusif dan dikaitkan dengan biologi tumor yang berbeza dan keadaan pesakit selepas rawatan. *PBRM1*, *BAP1* dan *SETD2* berperanan dalam pengawalan epigenetik serta terlibat dalam perkembangan penyakit ccRCC (Guo et al. 2012).



Rajah 2.5

Ciri molekul ccRCC: VHL, PBRM1, BAP1, dan SETD2 terletak di kawasan lengan pendek kromosom 3 manusia. Kehilangan struktur dan fungsi di kawasan ini dikenali sebagai “kehilangan kromosom 3p”. Kehilangan kromosom 3p telah disahkan sebagai kejadian pendorong karsinogenik yang biasa berlaku dalam ccRCC.

45% mutasi *Polybromo 1 (PBRM1)* dianggarkan berlaku dalam ccRCC. *PBRM1* berada pada lengan kromosom yang sama dengan *VHL* dan alel kedua sering dikodkan dengan *VHL* (Varela et al. 2011). Kebanyakan mutasi *PBRM1* disertai dengan kehilangan protein. *PBRM1* mengekodkan protein BAF180, iaitu salah satu komponen kompleks pemodelan nukleosom. Kebolehcapaian DNA dikawal oleh pengubahsuai (*remodelers*), yang membuka, meletakkan semula dan mengeluarkan nukleosom (Clapier & Cairns 2009). Pada masa ini terdapat empat keluarga kompleks pengubahsuai yang berbeza, termasuk keluarga *SWItch/Sucrose Non-Fermentable* (SWI/SNF). Keluarga ini berbeza dalam komposisi subunit dan fungsi biologi. Kompleks SWI/SNF disusun di sekeliling ATPase yang membekalkan tenaga untuk memecahkan hubungan histon, *BRM* dan *BRG1*. Mengikut komposisi subunit, kompleks SWI/SNF dibahagikan kepada kompleks BAF dan PBAF (Wilson & Roberts 2011). Mutasi *PBRM1* dalam ccRCC mempunyai akumulasi gen yang terlibat dalam sitoskeleton dan motiliti sel (Kapur et al. 2013).

Pengekodan gen *SET domain containing protein 2 (SETD2)* bermutasi dalam kira-kira 10% hingga 15% daripada ccRCC (Sato et al. 2013). Analisis meta mencadangkan bahawa mutasi *SETD2* bekerjasama dengan mutasi dalam *PBRM1*. Kedua-dua BAF180 dan SETD2 tertumpu pada histon, satu sebagai pembaca (BAF180) dan satu lagi sebagai penulis (SETD2). Protein SETD2 ialah enzim histon H3 lisin 36 trimetilasi (H3K36me3) dikaitkan dengan peningkatan kehilangan metilasi DNA di kawasan bukan promoter. Penemuan ini konsisten dengan pandangan yang muncul bahawa trimetilasi H3K36 mungkin terlibat dalam penyelenggaraan landskap heterokromatik, di mana *DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)* mengikat H3K36me3 dan metilasi DNA berdekatan (Dhayalan et al. 2010; Wagner & Carpenter 2012). Oleh itu, pengurangan H3K36me3 melalui penyahaktifan *SETD2* boleh membawa secara tidak langsung kepada kehilangan metilasi DNA serantau. Menariknya, kajian terkini telah mengaitkan *SETD2* dan H3K36me3 kepada pembaikan ketidakpadanan DNA (*DNA mismatch repair*), dan ketidakstabilan mikrosatelit ditemui dalam subset ccRCC (Li et al. 2013).

BRCA1 associated protein-1 (BAP1) bermutasi dalam 10% hingga 15% pesakit ccRCC (Peña-Llopis et al. 2012). Protein BAP1 berinteraksi dengan *host cell factor-1* (HCF-1), protein yang berfungsi sebagai perancah untuk beberapa kompleks pembentukan semula kromatin (Machida et al. 2009). Mutasi *BAP1* biasanya dikaitkan dengan kehilangan protein. Kehilangan *BAP1* dalam tumor menunjukkan peningkatan sasaran pengaktifan kompleks rapamycin 1 (mTORC1) (Peña-Llopis et al. 2012). Menariknya, mutasi *BAP1* dan *PBRM1* dalam ccRCC sebahagian besarnya saling eksklusif. Walau bagaimanapun, mutasi *BAP1* dan *PBRM1* dalam sel kanser dikaitkan dengan ciri histologi, biologi, dan hasil yang berbeza. Di samping itu, kehilangan *BAP1* dalam tumor lebih cenderung dikaitkan dengan pengaktifan mTORC1, berbanding tumor yang kehilangan *PBRM1* (Brownlee et al. 2012).

2.6.2 Gen VHL

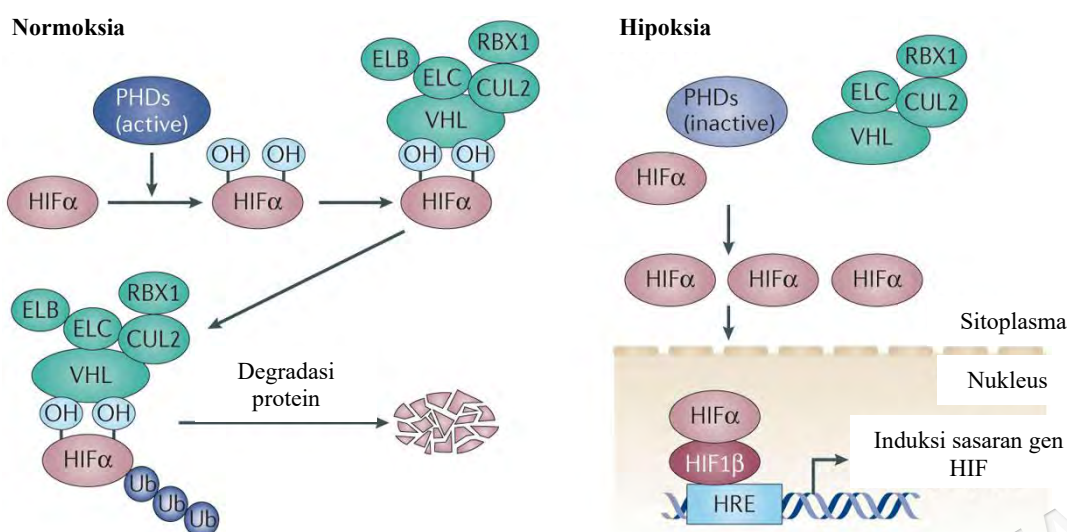
Insiden ccRCC berlaku sama ada dalam bentuk sporadik atau diwarisi secara keturunan. Kajian menunjukkan bahawa 91% hingga 98% ccRCC sporadik adalah disebabkan oleh kehilangan heterozigositi (*loss of heterozygosity*; LOH) gen VHL pada kromosom 3p dan 52% hingga 87% dalam mutasi *VHL* somatik. Selain itu, metilasi *VHL* yang mengakibatkan penyenyapan gen menyumbang kepada 7% hingga 11% dalam ccRCC sporadik. Gen VHL dikodkan untuk dua jenis isomer iaitu pVHL213 (30 kDa) dan pVHL172 (19 kDa). Kedua-dua isomer mempunyai kesan yang sama dalam kajian kefungsi sel serta kedua-dua isomer ini bertindak sebagai penindas tumor in vivo (Zhang & Zhang 2018).

2.6.3 Pengesanan oksigen dan tumorigenesis

Hypoxia inducible factor (HIF) ialah faktor transkripsi yang mengandungi subunit alfa dan subunit beta. Dua isoform subunit alfa HIF (HIF1 atau HIF2 α (dikenali sebagai EPAS1)) mengaktifkan transkripsi gen sasaran dengan mengikat pada unsur tindak balas hipoksia (*hypoxia-response elements*: HRE) dan kebiasaannya merosot dengan kehadiran oksigen (Ivan et al. 2002). Sebaliknya, HIF1 β atau dikenali sebagai *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), yang dikodkan oleh dua gen ARNT1 dan ARNT2. Kedua-dua gen ini adalah isoform yang stabil dan tidak merosot dengan kehadiran oksigen (Ivan et al. 2002). Terdapat satu lagi jenis isoform HIF3 α

yang jarang dikaji berbanding HIF1 α dan HIF2 α (Semenza 2012). HIF2 α bertanggungjawab memacu pertumbuhan sel ccRCC manakala HIF1 α diketahui menyekat perkembangan ccRCC (Keith, Johnson & Simon 2011; Shen et al. 2011).

Penyahaktifan *VHL* adalah ciri khas untuk sindrom *Von Hippel Lindau* dalam ccRCC. Pada peringkat molekul, pesakit dengan penyakit *Von Hippel Lindau* mewarisi salah satu alel bermutasi daripada ibu bapa mereka. Produk gen *VHL*, pVHL, adalah protein pelbagai fungsi yang berada antara nukleus dan sitoplasma (Lee et al. 1999). pVHL mengawal substrat hilirannya dengan membentuk kompleks VCB dengan faktor pemanjangan transkripsi B dan C yang penting untuk fungsi *VHL* (Kibel et al. 1995; Kishida et al. 1995). Keseluruhan kompleks VCB resistan terhadap degradasi proteasomal akibat daripada penstabilan interaksi elongin B dan C dengan pVHL (Schoenfeld, Davidowitz & Burk 2000). Sebaliknya, mutasi pada pVHL mengganggu kestabilan antara elongin B dan C yang mengakibatkan degradasi proteasomal yang cepat. Dalam ccRCC, mutasi pada gen *TCEB1* (elongin C) menjejaskan domain yang mengikat dengan pVHL (Sato et al. 2013). Rajah 2.6 menunjukkan ilustrasi kawalan “*oxygen-dependent hypoxia-inducible factor*”.



Rajah 2.6 Pengawalan proses normoksia dan hipoksia. Dalam persekitaran normoksia, faktor transkripsi HIF1 α dan HIF2 α mengalami hidroksilasi pada satu atau kedua-dua residu prolin yang dimangkin oleh prolyl hidroksilase 1 (PHD1), PHD2, dan PHD3. Faktor transkripsi HIF α yang mengalami prolyl-hidroksilasi akan diikat oleh kompleks ligase E3 ubiquitin pVHL–elongin C (ELC)–elongin B–cullin 2 (CUL2)–RBX1 (VCB–CR) untuk proses ubiquitinasi dan seterusnya disasarkan untuk degradasi proteosomal. Dalam persekitaran hipoksia, prolin tidak mengalami hidroksilasi disebabkan ketiadaan oksigen. Oleh itu, HIF α akan terkumpul secara abnormal dan seterusnya membentuk heterodimer dengan HIF1 β . Heterodimer ini kemudian ditranslokasi ke dalam nukleus, mengikat elemen tindak balas hipoksia (HREs), dan mengaruh transkripsi gen yang terlibat untuk adaptasi dan kemandirian sel dalam persekitaran hipoksia.

Sumber: Diubahsuai dari (Gossage, Eisen & Maher 2015)

Kompleks VCB membentuk kompleks kelompok dengan cullin 2 (CUL2) dan protein RING RBX1 membentuk kompleks VCB–CR (kompleks ini dipanggil kompleks ligase E3) (Kaelin 2002). Kompleks ligase E3 menyasarkan HIF1 α dan HIF2 α untuk proses degradasi dan *ubiquitination*. pVHL terdiri daripada dua domain bermutasi, alpha dan beta. Domain alpha merekrut Elongins, Cul2, dan RBX1, manakala domain beta ialah domain pengikat substrat dalam kes ini akan terikat dengan HIF α (Kaelin 2002; Stebbins, Kaelin & Pavletich 1999). Pengikatan HIF α dengan kompleks ligase E3 bergantung pada hidroksilasi dua sisa prolin terpelihara dalam HIF α oleh prolyl hydroxylase 1 PHD1 (juga dikenali sebagai EGLN2), PHD2 dan PHD3. Bagi melakukan hidroksilasi, PHD memerlukan oksigen sebagai substrat bersama dan ianya hanya aktif dalam keadaan normoksik (Bruick & McKnight 2001; Min et al. 2002).

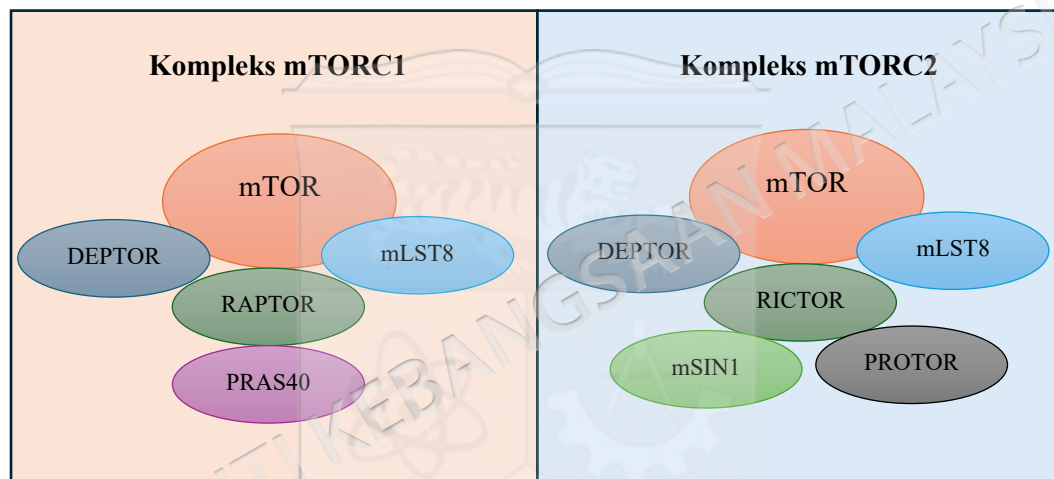
Dalam keadaan oksigen yang rendah, PHD1, PHD2 dan PHD3 tidak aktif. Ini menyebabkan HIF α berkumpul dalam sitoplasma dan membentuk heterodimer bersama HIF1 β dan seterusnya dipindahkan ke dalam nukleus (Semenza 2012). Protein heterodimer ini akan mengaktifkan transkripsi gen sasaran *HER*. Gen ini memainkan peranan dalam pengisyaratan onkogenik seperti peningkatan pembentukan saluran darah melalui pertambahan ekspresi *VEGF*; meningkatkan glikolisis melalui pertambahan ekspresi *GLUT1*, *hexokinase 2*, dan *lactate dehydrogenase A*; meningkatkan pengeluaran sel darah merah melalui pertambahan ekspresi *erythropoietin (EPO)*; meningkatkan pertumbuhan sel dan kelangsungan hidup melalui pertambahan ekspresi *PDGF*. Dalam keadaan oksigen yang normal, kompleks ligase E3 berkebolehan untuk memacu degradasi protein HIF α .

2.6.4 Laluan isyarat mTORC1

Rapamycin ialah sebatian makrolid dengan sifat antikulat, antiproliferatif dan imunosupresif yang pertama kali dijumpai dalam bakteria *Streptomyces hygroscopicus* di Pulau Easter (Vézina, Kudelski & Sehgal 1975). Selepas kajian dan pencirian yang mendalam, makrolid rapamycin ini didapati menyasarkan protein dalam sel mamalia yang kini lebih dikenali sebagai *mammalian target of rapamycin* atau akronimnya mTOR (Brown et al. 1994). Laluan isyarat mTOR memainkan peranan penting dalam menyokong pertumbuhan dan kemandirian sel melalui pengawalaturan pelbagai proses penting dalam badan. Proses ini termasuk pengawalaturan selular metabolisme, biosintesis makromolekul seperti lipid dan amino asid, dan transkripsi gen yang berkaitan dengan percambahan sel. Selain itu, laluan isyarat mTOR ini juga bertindak dalam mengawal atur proses autofagi sama ada untuk menyingkirkan organel/protein yang tidak diperlukan atau penghasilan nutrien dan tenaga bagi tujuan menyokong pertumbuhan sel (Harwood et al. 2018; Saxton & Sabatini 2017).

Isyarat laluan mTOR boleh dirangsang dan diaktifkan oleh pelbagai stimulus sama ada dari dalam atau luar sel. Stimulus ransangan ini termasuk faktor pertumbuhan, mitogen, ketersediaan nutrien dan status tenaga selular. mTOR tergolong dalam keluarga kinase protein serine/treonine (kinase berkaitan PI3K) dan jujukan gen untuk mTOR terletak pada kromosom 1 (Baretić & Williams 2014). Bagi menjalankan fungsinya, mTOR perlu membentuk kompleks bersama klien protein tertentu dan

sehingga kini, terdapat tiga kompleks mTOR kompleks yang telah dicirikan; mTORC1, mTORC2 dan mTORC3. mTORC1 dan mTORC2 adalah dua kompleks yang paling banyak dikaji dan diperincikan berbanding dengan mTORC3 (Loewith et al. 2002; Sarbassov et al. 2004). mTORC1 terdiri daripada protein mTOR yang membentuk kompleks dengan protein RAPTOR, mLST8, PRAS40 dan DEPTOR. Bagi mTORC2, protein mTOR juga membentuk kompleks bersama mLST8 dan DEPTOR tetapi tidak dengan RAPTOR dan PRAS40, sebaliknya dengan RICTOR, mSIN1 dan PROTOR-1 (Sarbassov et al. 2004). Kompleks mTORC1 dan mTORC2 ditunjukkan dalam Rajah 2.7.



Rajah 2.7 Kompleks protein mTORC1 dan mTORC2. Komponen yang membentuk kompleks protein mTORC1 dan mTORC2 terdiri daripada mTOR, mLST8, dan DEPTOR yang dikongsi bersama antara kedua-dua kompleks protein ini. Perbezaan antara kompleks protein ini pula adalah mTORC1 mempunyai komponen khusus RAPTOR dan PRAS40, manakala protein RICTOR, mSIN1 dan PROTOR adalah spesifik kepada mTORC2.

Sumber: Diubahsuai dari (Zoncu, Efeyan & Sabatini 2011)

Di antara kedua kompleks ini, pemahaman dan pengetahuan berkaitan mekanisme pengaktifan dan fungsi mTORC1 adalah lebih baik dan mendalam berbanding dengan mTORC2. Secara ringkasnya, kompleks mTORC1 berfungsi sebagai pengawalatur utama dalam proses selular metabolisme manakala kompleks mTORC2 telah dikenal pasti terlibat dalam mengawal atur pembentukan dan modifikasi sitoskeleton (Jacinto et al. 2004; Sarbassov et al. 2004). Walau bagaimanapun, proses fisiologi yang dikawal oleh kompleks mTORC1 dan mTORC2 adalah sama penting untuk menggalakkan pertumbuhan sel serta meningkatkan kelangsungan hidup sel

sebagai tindak balas kepada isyarat dalaman dan luaran. Laluan isyarat mTORC1 boleh diaktifkan oleh isyarat stimulus yang dinyatakan dalam perenggan di atas manakala mTORC2 hanya responsif terhadap pengaktifan oleh faktor pertumbuhan (Saxton & Sabatini 2017).

2.6.5 Gangguan tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC

Gangguan dalam aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 menyumbang kepada patogenesis beberapa jenis penyakit seperti kanser, Alzheimer, diabetes jenis II dan pengumpulan lemak berlebihan dalam badan (obesiti) (Davoody et al. 2024; Jere, Houreld & Abrahamse 2019). Gangguan atau keabnormalan aktiviti ini boleh terjadi disebabkan oleh mutasi dalam komponen yang terlibat dalam mengawal atur tapak laluan isyarat mTORC1. Selain itu, peningkatan ekspresi atau aktiviti stimulus di luar kawalan juga boleh mengganggu tapak laluan isyarat mTORC1 ini. Di dalam patogenesis kanser, peningkatan atau gangguan pada isyarat tapak laluan isyarat mTORC1 membawa kepada pengaktifan mekanisme hiliran yang menggalakkan pertumbuhan dan perkembangan kanser dengan merangsang aktiviti reseptor faktor pertumbuhan, pembentukan saluran darah serta metabolisme glikolitik dan lipid serta metabolisme lipid (Saxton & Sabatini 2017).

Peningkatan aktiviti isyarat tapak laluan isyarat mTORC1 merupakan salah satu ciri khas ccRCC seperti yang dinyatakan dalam subseksyen 2.6 (Pantuck et al. 2007; Robb et al. 2007). Sebagai contoh, Pantuck et al., melakukan pewarnaan imunohistokimia untuk fosforilasi protein ribosomal S6 (P-S6) dalam 375 sampel mikroatur tisu ccRCC dan mendapati 85% daripada sampel yang dianalisis adalah positif untuk P-S6 (Pantuck et al. 2007). Pengukuran tahap ekspresi P-S6 merupakan kaedah asas yang digunakan untuk menentukan aktiviti isyarat tapak laluan isyarat mTORC1 (Chung et al. 1994; Pullen & Thomas 1997). Selain itu, tahap ekspresi P-S6 mempunyai korelasi positif dengan gred ccRCC dan adalah lebih tinggi dalam pesakit yang mempunyai metastatik ccRCC (Pantuck et al. 2007).

Seperti kebanyakan jenis kanser lain, peningkatan aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC telah dikaitkan dengan mutasi genetik dalam komponen tapak laluan ini. Usaha penjujukan skala besar sampel ccRCC yang dijalankan oleh konsortium TCGA dan Sato et al., telah mengenalpasti mutasi gen PIK3CA dan PTEN dalam kira-kira 2% - 5% insiden ccRCC (Sato et al. 2013; *The Cancer Genome Atlas Research Network* 2013). Namun begitu, peratusan kes ccRCC yang mempunyai mutasi ini adalah jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan peratusan mutasi yang dijumpai dalam kes kanser endometrium (Levine 2013). Di samping itu, mutasi dalam gen mTOR dijumpai dalam kira-kira 6% daripada kes ccRCC (*The Cancer Genome Atlas Research Network* 2013; Xu et al. 2016). Sebahagian kecil mutasi juga dijumpai dalam gen tuberous sclerosis 1 (TSC1) yang berfungsi sebagai pengawalatur negatif bagi laluan isyarat mTORC1 (Kucejova et al. 2011).

Secara kolektif, perubahan genetik dalam komponen yang terlibat dalam mengawal atur tapak laluan ini menyumbang kepada pengaktifan hiper mTORC1 dalam ccRCC. Walau bagaimanapun, hanya sebilangan kecil pesakit ccRCC yang mempunyai mutasi dalam gen seperti *PIK3CA*, *PTEN* dan *mTOR*. Perkara ini tidak memberi gambaran sebenar tentang sebab utama yang menyumbang kepada peratusan pesakit ccRCC yang tinggi mempunyai peningkatan aktiviti dalam tapak laluan isyarat mTORC1. Malah, kajian terdahulu melaporkan peningkatan dalam aktiviti mTORC1 dalam kanser buah pinggang metastatik walaupun tiada penyesaran gen penindas tumor *PTEN* (Abou Youssif et al. 2011), menunjukkan bahawa isyarat pengaktifan huluan diperlukan dalam sebahagian besar kes ccRCC.

Ekspresi *KLF6* adalah tinggi didalam ccRCC berbanding tisu buah pinggang normal. Penyesaran *KLF6* dengan menggunakan teknik CRISPR/Cas9 merencatkan pertumbuhan sel ccRCC secara signifikan dalam asai in vitro dan juga in vivo. Ini menunjukkan kepentingan kehadiran *KLF6* dalam sel ccRCC. *KLF6* telah diketahui berada di huluan laluan pengisyaratan mTOR. PDGF β , selaku agonis bagi mTOR, telah dilaporkan mempunyai tapak pengikat *KLF6* di kawasan promoter *PDGF β* dalam analisis ChIP-seq. Ini disahkan melalui analisis ChIP-qPCR. *KLF6* mengawal ekspresi *PDGF β* secara langsung seterusnya mengaktifkan tapak laluan isyarat mTOR dalam ccRCC. Pengekspresan gen *KLF6* yang tinggi dalam ccRCC dikawal atur oleh

penggalak super yang luas dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan ccRCC. Penyasaran penggalak super secara individu dalam lokus *KLF6* dengan menggunakan teknik CRISPRi mengurangkan sedikit ekspresi *KLF6*. Manakala penyasaran lima penggalak super sekaligus mampu mengurangkan ekspresi *KLF6* sebanyak ~60%. Ini menunjukkan bahawa penggalak super *KLF6* menyokong ekspresi *KLF6* secara kuat dan *KLF6* merupakan gen penting dalam patogenesis ccRCC (Syafuruddin et al. 2019).

2.7 PENYAHKAWALATURAN PROSES TRANSKRIPSI DALAM KANSER

Program transkripsi gen dalam sel eukariot dikawal atur dengan sangat ketat melalui interaksi yang dinamik antara elemen kawalan yang terdiri daripada promoter, penggalak dan penebat (Lee & Young 2013). Wilayah promoter terletak berhampiran dengan tapak permulaan proses transkripsi dan diikat oleh *RNA Polymerase II*, faktor dan kofaktor umum yang bertindak untuk memulakan proses transkripsi. Kehadiran komponen transkripsi basal ini ke wilayah promoter bergantung kepada aktiviti dan isyarat daripada kawasan penggalak (Lee & Young 2013). Kawasan penggalak diikat oleh faktor transkripsi yang khusus dan spesifik untuk mengaktifkan transkripsi gen tersebut disamping kofaktor transkripsi lain seperti mediator, P300/CBP dan BRD4 (Ong & Corces 2011; Spitz & Furlong 2012). Interaksi khusus antara kawasan penggalak dan promoter dalam memandu ekspresi gen hanya akan berlaku di dalam kawasan yang dipanggil kejiranan terlindung (*insulated neighborhood*) di mana proses ini dikawal atur oleh protein CTCF dan kompleks kohesin (Kagey et al. 2010).

Penyahkawalaturan dalam proses transkripsi boleh menyebabkan sel normal menjalani transformasi menjadi sel kanser dan memperolehi fenotip seperti yang dinyatakan oleh Hanahan dan Weinberg (Hanahan & Weinberg 2000, 2011). Disregulasi dalam proses transkripsi gen ini boleh mengakibatkan sel pengaktifan gen yang bersifat pro-onkogenik atau perencatan ekspresi gen penindas tumor di dalam sel, di mana kedua-dua kondisi ini adalah antara faktor penting yang menggalakkan pertumbuhan dan perkembangan kanser (Bradner, Hnisz & Young 2017). Terdapat beberapa faktor yang menyumbang kepada disregulasi atau gangguan dalam proses transkripsi yang menyumbang kepada pembentukan dan perkembangan kanser. Perkara ini boleh berlaku apabila terdapat mutasi pada faktor transkripsi itu sendiri. Sebagai contoh, faktor transkripsi MYC yang berfungsi sebagai onkogen dan faktor transkripsi

TP53 adalah antara gen yang kerap dilaporkan mengalami mutasi di dalam sel kanser (Dang 2012; Gabay, Li & Felsher 2014). Faktor transkripsi ini memainkan peranan penting dalam mengawal atur kitaran hidup dan pembahagian sel. Perubahan genetik pada gen MYC adalah disebabkan oleh proses amplifikasi atau translokasi kromosom manakala mutasi dalam gen TP53 disebabkan oleh perubahan nukleotida tunggal (Gabay, Li & Felsher 2014; Kasthuber & Lowe 2017).

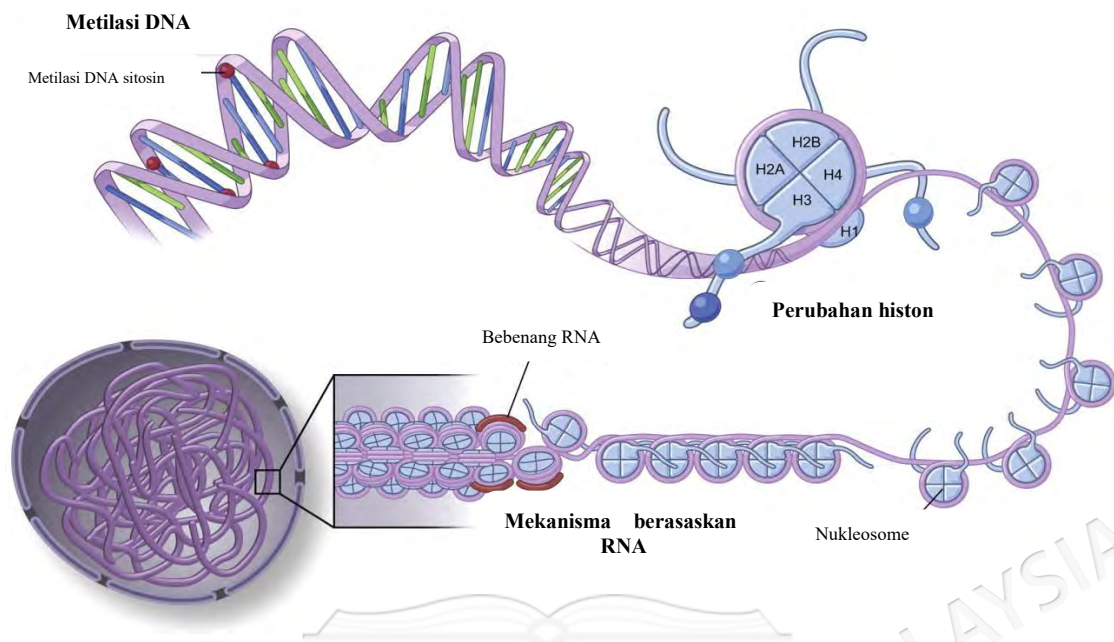
Di samping itu, faktor transkripsi merupakan efektor terminal untuk beberapa tapak laluan isyarat onkogenik seperti RTK-RAS, PI3K-AKT-mTOR dan WNT (Sanchez-Vega et al. 2018). Mutasi pada komponen hulu atau agonis yang mengaktifkan tapak laluan isyarat ini kerap dilaporkan dalam banyak jenis kanser manusia seperti mutasi gen PIK3C α dalam kanser payudara, mutasi gen BRAF dalam melanoma dan mutasi gen KRAS dalam kanser kolorektal dan paru-paru (Sanchez-Vega et al. 2018). Oleh yang demikian, gangguan pada tapak laluan isyarat onkogenik ini akan menyebabkan pengekspresan faktor transkripsi secara tidak normal yang seterusnya akan menyumbang kepada pertumbuhan dan perkembangan kanser. Kehilangan fungsi pengawalatur hulu juga boleh menjadi punca terjadinya aktiviti faktor transkripsi yang tidak terkawal. Sebagai contoh, penyahaktifan gen penindas tumor *VHL* dalam ccRCC menyebabkan penstabilan dan akumulasi faktor transkripsi HIF2 α yang merupakan elemen penting dalam pembentukan ccRCC (Sato et al. 2013; *The Cancer Genome Atlas Research Network* 2013). Sebagai tambahan, perubahan nukleotida dalam jujukan wilayah penggalak boleh membentuk tapak pengikat baru untuk faktor transkripsi yang berpotensi mengaktifkan program transkripsi pro-tumorigenik secara abnormal (Mansour et al. 2014).

Perubahan epigenetik yang membabitkan disregulasi dalam modifikasi protein histon atau status metilasi DNA juga menyumbang kepada penyahkawalaturan proses transkripsi yang boleh menyumbang dan menggalakkan pertumbuhan kanser (Soshnev, Josefowicz & Allis 2018). Sebagai contoh, metilasi DNA yang tidak normal sama ada hipometilasi dalam kawasan pengawalaturan onkogen atau hipermetilasi gen penindas tumor boleh disebabkan oleh mutasi yang terlibat dalam penambahan (*DNA methyltransferases*, DNMT) atau penyingkiran (*ten eleven translocation*, TET) kumpulan metil di kepulauan CpG (Baxter et al. 2014). Modifikasi protein histon yang

mengawal pembukaan dan penutupan struktur kromatin merupakan mekanisme penting dalam pengaktifan atau penenyapan ekspresi gen. Mutasi dalam famili enzim pengubahsuaian protein histon seperti *histone acetyltransferases/deacetylase* dan *histone methyltransferases/demethylases* boleh menyebabkan penyahkawalaturan modifikasi histon yang seterusnya boleh memberi implikasi dalam pembentukan dan perkembangan kanser (Baxter et al. 2014). Mekanisma pengawalaturan proses epigenetik dibincangkan dengan lebih terperinci dalam subseksyen 2.8.

2.8 MEKANISMA PENGAWALATURAN PROSES EPIGENETIK

Kajian genetik adalah kajian mengenai variasi atau perubahan jujukan DNA yang memberikan implikasi kepada fungsi atau aktiviti gen. Antara contoh dalam perubahan DNA tersebut adalah mutasi titik (*point mutation*), penyesaran DNA (*deletion*), penyisipan DNA (*insertion*) dan translokasi DNA (*translocation*). Sebaliknya, epigenetik pula merupakan kajian mengenai variasi yang boleh diwarisi dalam fungsi atau aktiviti gen yang bukan disebabkan oleh perubahan langsung dalam struktur kromatin atau jujukan DNA (Moore, Lé & Fan 2013). Dalam sel eukariot, metilasi DNA di kepulauan CpG dan pengubahsuaian histon adalah mekanisme yang mengawal atur perubahan epigenetik dan merupakan komponen penting dalam memacu pengaktifan atau penenyapan ekspresi gen tertentu (Gjaltema & Rots 2020). Rajah 2.8 menunjukkan ilustrasi mekanisme pengawalaturan proses epigenetik dalam manusia.



Rajah 2.8 Mekanisma epigenetik yang mengawalatur proses transkripsi gen. Ilustrasi menunjukkan mekanisme epigenetik iaitu (i) metilasi DNA, (ii) modifikasi protein histon dan struktur kromatin, dan (iii) penenyapan ekspresi gen oleh RNA bukan pengekod.

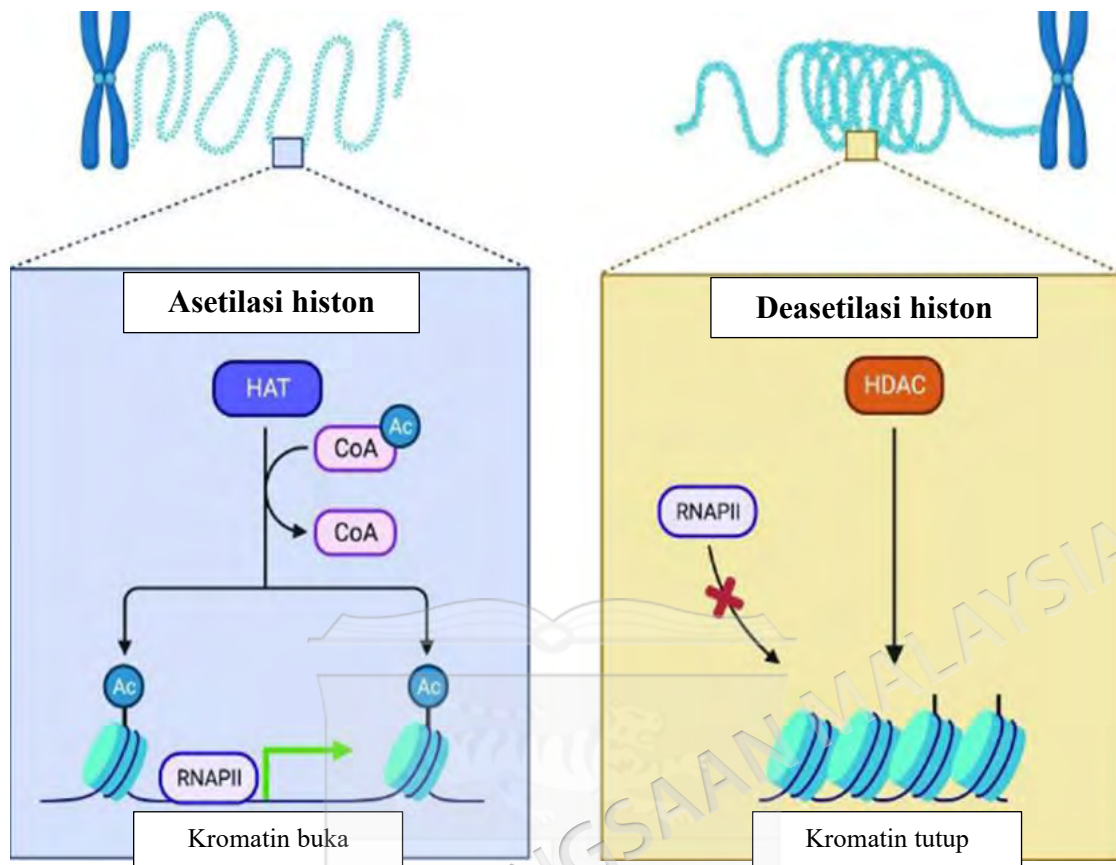
Sumber: Diubahsuai dari (Yan, Matouk & Marsden 2010)

2.8.1 Modifikasi histon

Pengawalaturan ekspresi gen sangat berkait rapat dengan pengubahsuaian protein histon. Histon merupakan keluarga protein yang berperanan untuk memberi sokongan struktur kepada kromosom. Bebenang ganda dua heliks DNA dibalut sebanyak dua kali mengelilingi oktamer histon untuk membentuk struktur yang dipanggil sebagai nukleosom. Nukleosom mengandungi lapan molekul histon yang terikat antara satu sama lain dan mempunyai ~146 pasangan bes DNA yang kemudiannya membentuk kromatin. Disebabkan struktur kromatin yang padat, perubahan kumpulan kimia pada ekor oktamer histon (*histone tail*) menentukan pembukaan atau penutupan kromatin bagi membolehkan faktor dan kofaktor transkripsi, *RNA Polymerase* dan komponen-komponen lain untuk mengakses jujukan DNA bagi mengaktifkan proses transkripsi (Soshnev, Josefowicz & Allis 2018).

Secara spesifiknya, tri-metilasi pada sisa lisin 4 protein histon 3 (H3K4me3) dan asetilasi sisa lisin 27 protein histon 3 (H3K27ac) menandakan kawasan transkripsi aktif. Sebaliknya, metilasi sisa lisin 79 protein histon 3 (H3K79me) dan di-/tri-metilasi sisa lisin 36 protein histon 3 (H3K36me2/3) menandakan kawasan gen yang telah ditranskripsi. Selain itu, di-metilasi atau tri-metilasi sisa lisin 9 protein histon 3 (H3K9me2/3) dan tri-metilasi sisa lisin 27 protein histon 3 (H3K27me3) menandakan kawasan gen yang telah ditindas atau tidak aktif (Gjaltema & Rots 2020). Rajah 2.9 menunjukkan ilustrasi asetilasi dan deasetilasi sisa amino asid protein histon 3 yang mengawal atur pengaktifan dan penyahaktifan proses transkripsi.

Pembangunan teknologi CRISPR/dCas9 untuk tujuan penyuntingan epigenetik dengan menyasarkan modifikasi histon adalah berguna dalam mengkaji elemen pengawalaturan proses epigenetik dan fungsi gen dalam kanser. Penggunaan dCas9-hHDAC3 untuk menyisihkan kumpulan asetil di kawasan H3K27ac dalam wilayah promoter berupaya untuk mengubah struktur kromatin dan menindas ekspresi gen (Kwon & others 2017). Selain itu, terdapat beberapa kajian menggunakan dCas9 yang dikonjugat bersama *histone acetyltransferase* P300 (dCas9-P300) untuk mendorong pembentukan H3K27ac pada kawasan penggalak (Chen et al. 2017; Hilton & others 2015; Kuscu et al. 2019), sama ada dengan penyasaran elemen tunggal atau disampaikan dalam himpunan saringan CRISPR untuk mengkaji hubungan antara wilayah promoter dan penggalak dalam mengawal atur proses transkripsi gen (Klann et al. 2017).



Rajah 2.9 Perbezaan asetilasi histon dan deasetilasi histon. Asetilasi residu lisin pada histon melibatkan penambahan kovalen kumpulan asetil pada kedudukan ϵ rantai sisi lisin, yang menghasilkan struktur kromatin terbuka dan membolehkan wilayah DNA diakses oleh faktor dan ko-faktor pengawalaturan transkripsi gen. Sebaliknya, deasetilasi lisin melibatkan penyingkiran kumpulan asetil, menyebabkan struktur kromatin menjadi lebih padat, tertutup dan tidak dapat diakses oleh faktor dan ko-faktor pengawalaturan transkripsi gen.

Sumber: Diubahsuai dari (Stein & Riber 2023)

2.8.2 Metilasi DNA

Metilasi DNA merupakan pengubahsuaian kimia terhadap jujukan DNA oleh famili enzim *DNA methyltransferases* (DNMTs). DNMTs bertanggungjawab untuk memangkin pemindahan kumpulan metil dari S-adenyl methionine (SAM) kepada karbon kelima dalam sisa sitosin untuk menghasilkan 5-metilsitosin (5mC) (Moore, Le & Fan 2013). Kebanyakan proses metilasi DNA berlaku pada nukleotida sitosin, sebelum nukleotida guanin dan kawasan ini dinamakan sebagai kepulauan CpG. Metilasi DNA di kepulauan CpG dalam kawasan promoter sering dikaitkan dengan penindasan transkripsi (Bird 1980). Pengaktifan dan penindasan transkripsi sering

dikaitkan dengan hipo- dan hiper-metilasi pada kepulauan CpG. Hipometilasi pada onkogen kebiasaannya mengaktifkan dan menjadi penggalak kepada ekspresi gen ini yang seterusnya akan menyokong pembentukan dan perkembangan kanser. Sebaliknya, hipermetilasi pada gen penindas tumor akan menyebabkan penyahaktifkan gen ini dan menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkawal (Baxter et al. 2014). Sebagai contoh dalam ccRCC, hiper-metilasi pada kawasan promoter *VHL* menyebabkan penindasan gen *VHL* yang seterusnya menyebabkan pengumpulan HIF2 α yang bersifat pro-onkogenik (Herman et al. 1994).

Demetilasi DNA ialah proses penyingkiran kumpulan metil daripada nukleotida sitosin yang berlaku sama ada melalui pengoksidaan atau deaminasi. Demetilasi DNA boleh berlaku melalui demetilasi DNA pasif di mana sitosin termetilasi dicairkan daripada genom kerana ketiadaan enzim penyelenggaraan metilasi. Selain itu, demetilasi DNA aktif juga boleh berlaku yang melibatkan pengoksidaan 5mC oleh enzim TET ke dalam derivatif teroksida 5mC (Wu & Zhang 2017). Enzim TET, yang merupakan komponen utama dalam laluan demetilasi DNA aktif, mempunyai peranan penting sebagai penindas tumor. Kehilangan protein TET dan molekul 5-hmC yang berkaitan dengannya sering dikaitkan dengan transformasi malignan dan perkembangan kanser (An et al. 2015; Kudo et al. 2012). Kepentingan demetilasi DNA menjadi jelas dalam konteks penyakit, terutamanya dalam kanser. Kajian lanjut mengenai mekanisme demetilasi DNA boleh memberikan penemuan penting yang berpotensi membuka jalan kepada perkembangan terapi kanser yang lebih berkesan.

2.8.3 Kawasan promoter dan penggalak

Kawasan promoter DNA adalah kawasan tempat bermulanya proses transkripsi gen melalui pengikatan *RNA polymerase* bersama dengan kompleks faktor transkripsi umum. Kebiasaannya, wilayah promoter terletak di hulu atau pada penghujung 5' kawasan permulaan transkripsi (Lin et al. 2019). Jujukan promoter akan menentukan arah proses transkripsi di mana transkripsi gen boleh berlaku dari kedua-dua arah, sama ada dari bebenang *sense* atau bebenang *anti-sense* (Andersson et al. 2014).

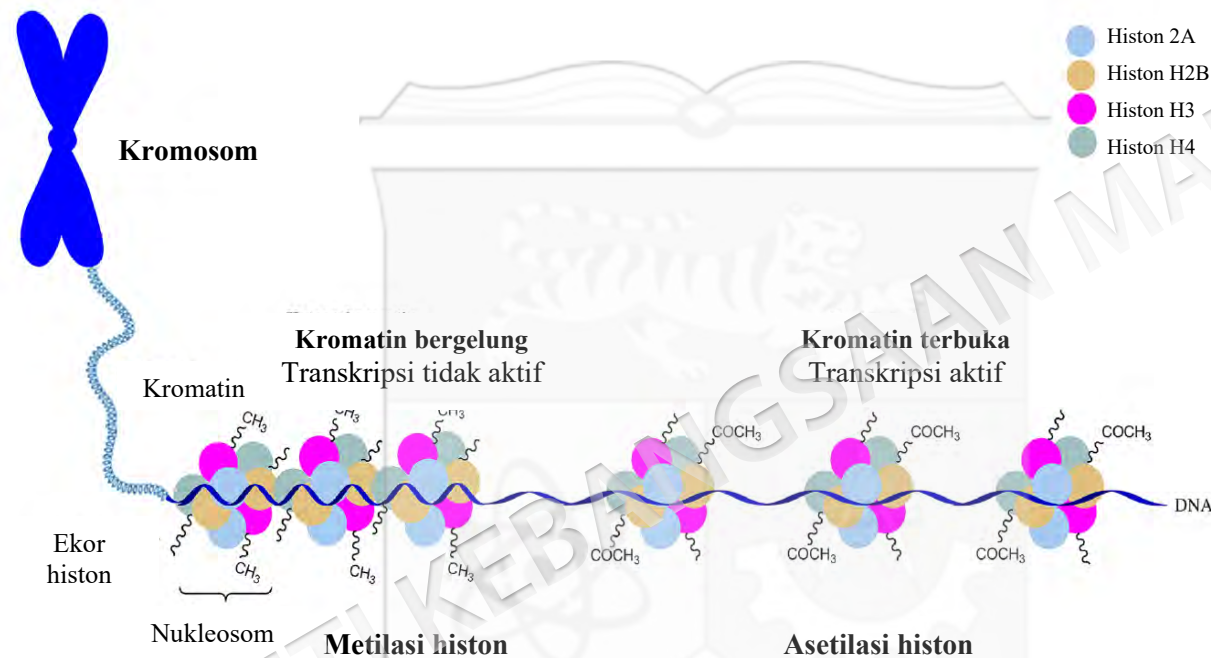
Pada asalnya, penggalak dikenali sebagai elemen pengawalaturan yang akan menggalakkan ekspresi gen tanpa mengambil kira orientasi, posisi dan juga jarak dengan lokus gen hiliran. Penggalak boleh meningkatkan kadar transkripsi gen yang mungkin mempunyai promoter yang lemah atau boleh menyediakan maklumat tambahan yang penting yang tidak dikodkan dalam promoter gen tersebut (Plank & Dean 2014). Penggalak mempunyai sifat yang sangat spesifik kepada jenis, keadaan sel atau dalam tindakbalas terhadap perubahan persekitaran tertentu (Bulger & Groudine 2011; Ong & Corces 2011). Oleh itu, sesuatu gen itu mungkin dikawal atur oleh penggalak yang berbeza dari satu jenis sel ke sel yang lain dan boleh diikat oleh faktor transkripsi yang berbeza (Natoli 2010; Rodrigues et al. 2018). Pengawalaturan yang khusus mengikut keadaan ini memerlukan genom untuk disusun secara khusus dalam turutan struktur kromatin yang tinggi yang meletakkan penggalak proksimal kepada promoter gen sasaran dalam ruang tiga dimensi (Gorkin, Leung & Ren 2014).

Struktur kromatin dan juga aktiviti penggalak boleh berubah secara dinamik semasa proses pembezaan selular (*cellular differentiation*) dan perkembangan embrio mengikut kepada perubahan yang diperlukan dalam program pengekspresan gen yang tertentu (Chen & Dent 2013). Pengawalaturan struktur penggalak yang aktif di dalam satu sel pada suatu masa yang tertentu boleh didefinisikan dengan menggabungkan beberapa faktor: (1) faktor transkripsi dan kofaktor sel yang sedia ada; (2) tapak pengikat faktor transkripsi pada penggalak; (3) keadaan kromatin lokal pada penggalak; (4) struktur tiga dimensi yang menentukan kedekatan elemen pengawalaturan yang terlibat (Sabari et al. 2018).

Terdapat perbezaan dalam ikatan faktor transkripsi dan pengubahsuaian histon antara kawasan promoter dan penggalak (Muerdter et al. 2018). Penggalak mengikat P300 pada tahap yang lebih tinggi di mana P300 adalah kofaktor yang kebiasaannya dikaitkan dengan penggalak aktif dan mempunyai nisbah H3K27ac kepada H3K4me3 yang lebih tinggi. Nisbah modifikasi histon ini mempunyai hubungkait dengan aktiviti penggalak dalam sel selanjut yang berbeza (Dao et al. 2017; Heintzman & Ren 2009).

2.8.4 Kawasan kromatin terbuka (*open chromatin*)

Kawasan kromatin terbuka (OCR: *open chromatin region*) adalah kawasan genom manusia yang boleh menghubungkan jujukan DNA dengan elemen pengawalaturan hulu (Yao et al. 2015). Kebolehcapaian kromatin memainkan peranan penting dalam pengawalaturan gen dalam sel dan seterusnya kepada aktiviti fisiologi manusia. Nukleosom pula merupakan salah satu komponen dalam struktur kromatin, dimana ianya terdiri daripada oktamer histon yang dikelilingi lebih kurang ~146 bp jujukan DNA. Kajian mendapati bahawa jenis kanser yang berbeza mempunyai landskap kawasan kromatin terbuka yang berbeza (Snyder et al. 2016). Dengan mengenalpasti landskap kawasan kromatin terbuka yang khusus dalam jenis kanser tertentu atau yang spesifik kepada jenis sel atau tisu, beberapa perkara dapat dikaji seperti mekanisme pengawalaturan epigenetik, pemprofilan biopenanda yang berpotensi untuk strategi klinikal dan juga menganalisa heterogeniti dan subjenis kanser (Flavahan, Gaskell & Bernstein 2017). Analisis korelasi ekspresi gen dan landskap kawasan kromatin terbuka membuktikan bahawa wujudnya interaksi jarak jauh antara elemen pengawalaturan dengan wilayah promotor gen (Lorzadeh et al. 2016). Rajah 2.10 menunjukkan struktur kromatin terbuka dan modifikasi dalam histon.



Rajah 2.10 Struktur kromatin dan modifikasi histon. Kromatin terdiri daripada unit asas yang dipanggil nukleosom. Setiap nukleosom terdiri daripada empat pasangan histon, iaitu H2A, H2B, H3, dan H4, yang membentuk suatu oktamer. Ekor N-terminal protein histon boleh mengalami modifikasi pasca translasi (PTMs) pada residu asid amino tertentu. Modifikasi ini boleh mempengaruhi struktur kromatin. Eukromatin, juga dikenali sebagai “kromatin terbuka,” ialah struktur yang mudah diakses dan membolehkan transkripsi aktif. Sebaliknya, heterokromatin, atau “kromatin tertutup,” adalah lebih padat dan kurang boleh diakses, menjadikan transkripsi kurang aktif. Metilasi histon boleh mengaktifkan atau menekan transkripsi gen bergantung pada lokasi ia berlaku. Sebaliknya, asetilasi histon mengurangkan interaksi antara histon yang berdekatan serta interaksi antara histon dan DNA, yang membawa kepada pembentukan eukromatin.

Sumber: Diubahsuai dari (de Oliveira & Guerra-Sá 2020)

2.8.5 BRD4

BRD4 sebahagian daripada keluarga bromodomain dan ekstra terminal protein (BET) merupakan pembaca epigenetik (*epigenetic reader*) yang memainkan peranan untuk mengenalpasti sisa lisin yang telah diasetilasi dan berperanan untuk mengumpul faktor transkripsi dan juga kofaktor untuk mengaktifkan proses transkripsi (Filippakopoulos et al. 2010; Nicodeme et al. 2010; Zhang et al. 2019). BRD4 berkongsi dua tandem bromodomain (BD1, BD2) dengan ahli yang lain di dalam keluarga. BRD4 memainkan peranan penting dalam mengawal gen yang diaktifkan oleh penggalak super, di mana ia mengikat kawasan penggalak super dan merekrut kompleks protein yang diperlukan untuk transkripsi gen-gen kritikal, termasuk gen-gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanser. Secara amnya, kajian telah membuktikan bahawa tumbesaran dan perkembangan kanser sangat bergantung tinggi kepada gen yang bergantung kepada penggalak super (Bradner, Hnisz & Young 2017; Lovén et al. 2013). Oleh itu, penyasaran terapeutik kanser kepada kofaktor yang terlibat dalam mencetuskan dan mengekalkan penggalak super seperti BRD4 telah dibuktikan secara am sebagai novel dan sangat berkesan (Lovén et al. 2013; Sabari et al. 2018; Shorstova, Foulkes & Witcher 2021).

Peranan BRD4 sebagai protein pengawalatur di dalam kitaran sel dilaporkan buat kali pertama semasa proses mitosis untuk mengenalpasti gen yang bersedia untuk transkripsi G1 bagi membolehkan kitaran sel bergerak (Dey et al. 2009; Yang, He & Zhou 2008). Aktiviti transkripsi BRD4 diperlukan untuk penentuan identiti sel dan embriogenesis. BRD4 juga berperanan dalam pengekalan pembaharuan sendiri dan pluripotensi sel stem embrio (ESCs) dalam fasa awal embriogenesis dengan bekerjasama dengan faktor transkripsi ESC seperti NANOG dan OCT4 (Di Micco et al. 2014; Liu et al. 2014; Wu et al. 2015).

BRD4 dikenalpasti sebagai kofaktor utama untuk kompleks pengantara yang berinteraksi dengan faktor transkripsi dan protein epigenetik yang terlibat dalam mengawal atur dan modifikasi sktruktur kromatin (Bhagwat et al. 2016; Donner et al. 2010). *Histone acetyltransferases* seperti P300/CBP direkrut oleh faktor transkripsi yang menggalakkan asetilasi histon. Seterusnya, BRD4 pula direkrut ke wilayah

penggalak aktif yang dikaitkan dengan histon yang telah diasetilasi dan terikat dengan faktor transkripsi di wilayah penggalak ini (Junwei & Vakoc 2014).

2.8.6 P300

Protein pengikat *histone acetyltransferase* CREB (CBP) dan protein P300 sering dirujuk sebagai entiti tunggal (CBP/P300). Kedua-dua enzim ini berkongsi tahap homologi jujukan yang besar, dan kedua-duanya mengandungi domain homolog berbilang, termasuk domain interaksi kinase teraruh (KIX: *kinase-inducible domain interacting*), *histone acetyltransferases* (HAT) dan *bromodomain* (Jin et al. 2019). CBP/P300 diperlukan untuk asetilasi histon secara global di wilayah promotor, penggalak dan penggalak super (Narita et al. 2021; Raisner et al. 2018; Wang et al. 2018). CBP/P300 telah dibuktikan sebagai pengawalatur penting ketika peningkatan ekspresi onkogen melalui pengaktifan transkrip penggalak dan penggalak super. Tambahan pula, molekul kecil perencat CBP/P300 telah dihasilkan dan kajian menunjukkan keberkesanannya sebagai anti-kanser dalam beberapa jenis kanser (Hogg et al. 2021; Huang et al. 2019).

Asetilasi histon dan peraturan transkripsi oleh CBP/P300 dimodulasi oleh protein pembaca histon BRD4, protein pengubahsuaian histon dan faktor transkripsi lain yang berkaitan (Lai et al. 2017; Ortega et al. 2018; Wu, Kamikawa & Donohoe 2018). CBP/P300 berinteraksi dengan BRD4 untuk mendorong pemangkinan H3K27ac, dan BRG1 kemudiannya direkrut ke kawasan histon yang telah diasetilasi (Wu, Kamikawa & Donohoe 2018). Dengan kerjasama BRD4 dan BRG1, CBP/P300 memainkan peranan penting dalam mendorong H3K27ac dan transkripsi gen pluripotensi seperti OCT4 dan NANOG dalam sel stem embrionik (Wu, Kamikawa & Donohoe 2018).

Pelbagai kajian telah mencadangkan bahawa P300 dan CBP memainkan peranan yang bertindih tetapi berbeza dalam pengawalan kelangsungan hidup sel. Tambahan pula, CBP diperlukan untuk pembaharuan sendiri sel, manakala P300 diperlukan untuk pembezaan sel stem hematopoietik (Rebel et al. 2002). Mutasi somatik sama ada P300 atau CBP ditemui dalam pelbagai sel malignan. Kehilangan P300 dalam sel tumor yang mengalami mutasi CBP membawa kepada kematian sintetik (*synthetic*

death) (Barretina et al. 2012; Ogiwara et al. 2016). Imunopresipitasi kromatin yang digabungkan dengan kajian penjujukan genom (ChIP-seq) telah mengenal pasti tapak pengikatan P300 dan CBP yang bertindih tetapi berbeza secara keseluruhannya, menunjukkan bahawa kedua-dua protein ini mungkin berfungsi secara berbeza dengan mengawal atur penggalak gen yang berbeza (Martire et al. 2020).

2.9 PENGALAK SUPER DAN KANSER

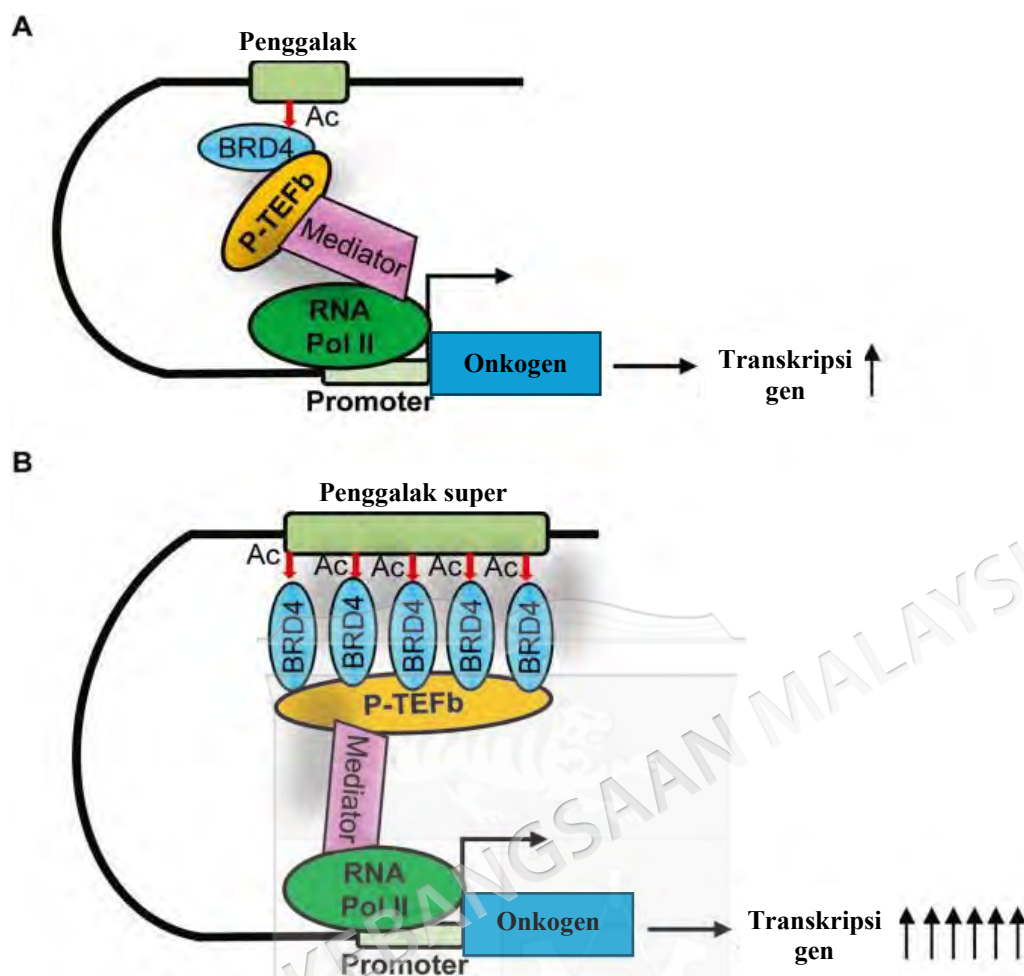
Proses transkripsi DNA terbahagi kepada 3 sub-proses iaitu permulaan, pemanjangan dan penamatan. Proses permulaan memerlukan penglibatan *RNA polimerase II* bersama dengan komponen lain seperti penggalak. Penggalak ialah jujukan bukan pengekodan ~100–1000 bp yang terdiri daripada motif faktor transkripsi yang mengikat DNA manakala penggalak super (*super enhancer* - SE) mempunyai purata saiz lebih besar iaitu kira-kira 20 kb. Faktor transkripsi mengikat dan mengaktifkan penggalak untuk memulakan transkripsi gen. Pada asasnya, penggalak dan penggalak super adalah serupa dari segi penglibatan komponen yang mengikatnya iaitu faktor transkripsi, kofaktor, mediator, pengawalatur kromatin dan kompleks *RNA polimerase II* (Simicevic & Deplancke 2017).

Penggalak super diperkaya dengan asetilasi sisa histon 3 lisin 27 (H3K27ac) dan monometilasi histon H3 lisin 4 (H3K4me1) dengan penyusutan isyarat histon H3 lisin 4 trimetilasi (H3K4me3). Modifikasi histon yang disebutkan di atas merupakan penanda bagi wilayah kromatin terbuka dan transkripsi aktif gen (Sengupta & George 2017). Di samping itu, penggalak super diikat dengan tinggi oleh molekul modifikasi kromatin seperti protein P300, pembaca epigenetik BRD4, dan faktor dan kofaktor transkripsi yang berkaitan. Kofaktor transkripsi dan mediator membantu penggalak distal untuk mengikat wilayah promoter sasaran melalui pembentukan gelung kromatin (*chromatin loop*).

Penemuan penggalak super yang pertama dilaporkan dalam sel stem embrio tikus (mESCs) yang diikat pada kadar yang tinggi oleh faktor transkripsi berkaitan pluripotensi OCT4, SOX2 and NANOG (Chen et al. 2008). Di samping itu, faktor transkripsi KLF dan ESrrb yang bertanggungjawab dalam pembentukan identiti sel secara khusus juga ditemui mengikat wilayah penggalak super (Buecker & Wysocka

2012). Berikutan pemerhatian awal ini, penggalak super telah dikaji secara meluas dalam pengawalan identiti sel, ekspresi gen serta memacu fenotip kanser. Penggalak super yang berkaitan dengan kanser dikatakan sensitif terhadap gangguan pada salah satu wilayah penggalak atau komponen hulu yang mengawal atur landskap penggalak super (Sengupta & George 2017).

Dalam mESC, kehilangan konstituen penggalak super di lokus NANOG atau SOX merendahkan ekspresi gen sasaran dan mengganggu beberapa gen pluripotensi penting yang terlibat dalam pembezaan dan penentuan identiti sel. Kehilangan penggalak super mengurangkan ekspresi gen berkaitan kanser dan menjejaskan beberapa ciri onkogenik. Walau bagaimanapun, dalam karsinoma sel skuamosa, pertindihan penggalak super menyebabkan ekspresi berlebihan pada faktor transkripsi onkogenik yang kritikal, yang kemudiannya mengaktifkan gen berkaitan kanser lain (Whyte et al. 2013). Rajah 2.11 menunjukkan perbezaan antara penggalak dan penggalak super dalam mengaktifkan transkripsi gen.



Rajah 2.11 Ilustrasi penggalak biasa (A) dan penggalak super (B) yang terlibat dalam pengaktifan transkripsi gen. Penggalak super berbeza daripada penggalak biasa berdasarkan saiznya yang lebih besar, isyarat H3K27ac yang lebih tinggi (penanda kromatin terbuka dan transkripsi aktif), serta diikat oleh lebih banyak faktor transkripsi (TF), kofaktor, dan BRD4. BRD4 mengenali histon H3K27 yang telah diasetilasi dan merekrut faktor pemanjangan transkripsi positif B (P-TEFb) dan mediator. Proses ini mengaktifkan RNA polymerase II dan pengikatan pada promoter gen, seterusnya meningkatkan transkripsi. Oleh kerana penggalak super diikat oleh lebih banyak molekul BRD4 dan faktor lain, ia membawa kepada tahap transkripsi yang jauh lebih tinggi, terutamanya bagi onkogen yang dikaitkan dengan penggalak super, berbanding dengan gen yang dikawal oleh penggalak biasa.

Sumber: Diubahsuai dari (Qian et al. 2023)

2.10 PENGENALAN KLF6

Lokus gen KLF6 manusia terletak dalam lengan pendek kromosom 10 (10p15). Gen KLF6 mempunyai empat ekson dengan keseluruhan panjang 7 kb yang mengekod protein yang mempunyai 283 asid amino (Koritschoner et al. 1997; Slavin et al. 1999). KLF6 mempunyai domain pengaktifan NH₂ yang kaya dengan prolin dan serin dimana ia mengandungi struktur 3 COOH-terminal C₂H₂ jarian zinkum yang membantu dalam pengawalaturan genetik. Jaringan zinkum ini diikat kepada “kotak GC” dan “kotak CACCC” dan menggalak kawasan sasaran gen. KLF6 juga boleh mengawal atur transkripsi gen melalui interaksi protein-protein (Song et al. 2003). KLF6 telah dilaporkan terlibat dalam pengawalaturan tumbesaran dan pembangunan tisu, percambahan dan pembezaan sel dan pembentukan semula vaskular (Botella et al. 2002; Fischer et al. 2001; Inuzuka et al. 1999; Li et al. 2005; Park et al. 2005). Terdapat beberapa laluan klasik yang telah diketahui: pengaktifan P21 melalui mod P53-sendiri, pengurangan kompleks cyclin D1/CDK4 melalui interaksi antara Cyclin D1, menghalang aktiviti C-Jun proto-onkoprotein, pengurangan ekspresi VEGF, menaikkan pengawalaturan Ecadherin dan pengurangan apoptosis (Benzeno et al. 2004; Difeo et al. 2009; Ito et al. 2004; Narla et al. 2001; Slavin et al. 2004).

2.10.1 Peranan KLF6 dalam fisiologi normal dan tumorigenesis

Dalam proses fisiologi normal, KLF6 berperanan dalam pembezaan dan pertumbuhan sel. Kajian sebelum ini mendapati bahawa kemunculan ekspresi KLF6 sangat konsisten sepanjang proses pertumbuhan embrio dan tisu termasuk di dalam sel buah pinggang, mata, prostat dan beberapa organ lain (Fischer et al. 2001; Laub et al. 2001; Leow et al. 2009; Nakamura et al. 2004). Kajian lain juga telah mengesahkan kepentingan KLF6 dalam mengawal atur pembezaan sel. KLF6 menggalak pembezaan trophoblast, sel pendahulu dalam pertumbuhan plasenta, dengan transaktivasi ekspresi *beta-chorionic gonadotropin* dan gen glikoprotein yang spesifik semasa mengandung (Racca et al. 2011). Tambahan pula, KLF6 berperanan dalam paksi GP130-STAT3 selaku efektor hiliran pada sistem saraf sentral, mengaktifkan ekspresi importin- α 5 yang merupakan keperluan bagi pembezaan sel progenitor oligodendrosit dan pemielinan neuron (Laitman et al. 2016).

Semasa proses respon imuniti dan inflamasi, makrofaj yang merupakan antara sel imun badan bertindak untuk mengesan dan memusnah organisma asing melalui proses fagositosis atau pengaktifan sel imun efektor lain yang berkaitan. Makrofaj terbahagi kepada dua jenis sama ada fenotip M1 (pro-inflamasi) atau fenotip M2 (antiinflamasi). Makrofaj berinteraksi dengan NF- κ B dan menyekat ekspresi reseptor gamma *peroxisome proliferator-activated* (PPAR γ) dan sel-B limfoma 6 (BCL6). KLF6 juga dilaporkan mempunyai peranan dalam mengawal atur polarisasi makrofaj kepada fenotip M1 dan mengaruh gen proinflamasi (Date et al. 2014; Kim et al. 2016). Selain itu, peranan KLF6 dalam mengawal atur ekspresi *HIF1* dan laluan respon transkripsi hipoksik dalam makrofaj juga telah dilaporkan. Pengaktifan laluan ekspresi *HIF1* membolehkan makrofaj untuk beradaptasi dan bertahan dalam kecederaan yang hipoksik melalui pengaktifan respon pro-inflamasi (Kim et al. 2020).

Peranan KLF6 dalam mengawal atur kecederaan tisu dan penyembuhan luka juga telah dilaporkan dalam kajian sebelum ini. KLF6 telah dibuktikan untuk mengaktifkan ekspresi gen TGF- β secara langsung apabila tisu mengalami kecederaan selain mengawal atur ekspresi komponen tapak laluan isyarat TGF- β termasuk COLIA1, PLA2 dan ENG (Botella et al. 2002; Kojima et al. 2000; Ratzliff et al. 1998). Tahap ekspresi KLF6 juga ditemukan tinggi dalam individu yang mempunyai kegagalan hati akut dan model tikus. KLF6 menggalak proses autofagi untuk membuang sel yang tercedera sebelum pembentukan hati dengan mengaktifkan secara langsung gen yang berkait rapat dengan autofagi seperti gen ATG7 dan BECLIN1 (Sydor et al. 2017).

Dalam kanser, tahap ekspresi gen KLF6 adalah tinggi dalam leukemia myeloid akut (AML), kanser renal subjenis ccRCC dan *papillary*, glioblastoma multiforme, dan kanser pankreas. Selain itu, analisis data genomik TCGA yang lebih terkini mendedahkan bahawa KLF6 jarang mengalami mutasi atau dinyahaktifkan dalam kesemua jenis kanser yang dianalisis (Gao et al. 2013). Menurut kajian terbaru oleh Syafruddin dan rakan-rakan, proses transkripsi gen KLF6 dalam ccRCC diaruh oleh penggalak super yang menghasilkan ekspresi tinggi dalam tisu ccRCC dan sel selanjara. Seterusnya, KLF6 juga dilaporkan berperanan dalam mengaktifkan ekspresi PDGF β yang kemudiannya mengaktifkan isyarat mTORC1 di samping mengawal atur ekspresi

faktor transkripsi utama, SREBF1 dan SREBF2, yang terlibat dalam metabolisme lipid (Syafuruddin et al. 2019).

2.11 FAKTOR TRANSKRIPSI MEF2C

Myocyte Enhancer Factor 2 C (MEF2C) merupakan gen penting dalam keluarga faktor penggalak miosit (MEF2), yang juga mengandung MEF2A, MEF2B dan MEF2D. Keluarga MEF2 merupakan sub-keluarga faktor pengawalaturan transkripsi MADS-BOX (*MCM-1-agamous-deficiens-serum response factor*). Faktor transkripsi keluarga MEF2 ini memainkan peranan penting dalam embriogenesis dan modifikasi epigenetik yang mengawal ekspresi gen semasa proses pembezaan dan pertumbuhan sel (Flavell et al. 2008). Gen MEF2C manusia terletak pada kawasan kromosom 5q14.3 dan proteinnya mempunyai 5 teras domain: domain MADS, domain MEF2, domain pengaktifan transkripsi 1 (TAD1) dan 2 (TAD2), serta isyarat lokalisasi nuklear (NLS). Domain MADS dan MEF2 menjadi pengantara untuk dimerisasi MEF2C, ikatan DNA, dan pengrekrutan kofaktor. TAD1 dan TAD2 kedua-duanya terlibat dalam pengambilan kofaktor seperti *histone acetyltransferase* P300 dan CBP, atau kopenindas seperti *histone deacetylases* kelas II (HDACs) yang mengawal atur transkripsi (Assali, Harrington & Cowan 2019).

Kesemua ahli keluarga MEF2 terutamanya MEF2C mempunyai ekspresi yang tinggi dalam neuron sistem saraf pusat (Leifer et al. 1993). Selain itu, kadar ekspresi gen MEF2C yang tinggi turut diperhatikan dalam *T-cell acute lymphoblastic leukemia* (T-ALL) (Homminga et al. 2011; Kawashima-Goto et al. 2015). MEF2C juga dikaitkan dengan kecacatan jantung kongenital disebabkan oleh fungsinya dalam mengawal ekspresi *teratocarcinoma-derived growth factor 1* (*Tdgf1*), untuk perkembangan jantung pada peringkat awal embrionik. Keabnormalan dalam ekspresi *MEF2C* dan *Tdgf1* yang berkaitan dengannya membawa kepada kecacatan perkembangan dan masalah jantung kongenital (Barnes et al. 2016). MEF2C juga boleh berinteraksi secara fizikal dengan Suv39h1, dan interaksi ini menyumbang kepada pengawalan ekspresi miogenik, modifikasi metilasi histon, dan pembezaan mioblas. Tambahan lagi, aktiviti transkripsi MEF2 boleh dihalang oleh Suv39h1 secara kebergantungan kepada dos (Jin et al. 2016).

Di samping itu, penyakit lain berkaitan MEF2C juga dinamakan sebagai *MEF2C haploinsufficiency*. Penyakit ini berlaku disebabkan gangguan genetik yang disebabkan oleh mutasi pada gen MEF2C. Mutasi ini selalunya melibatkan penghapusan sebahagian kromosom pada 5q14.3 menyebabkan ketidakfungsian protein MEF2C yang penting dalam kefungsi sistem muskuloskeletal, kardiovaskular, neurologi, kraniofasial, dan imun (Berland & Houge 2010). Kebiasaannya, gejala penyakit ini mula berlaku apabila pesakit berusia antara satu hingga dua tahun (Cooley Coleman et al. 2022). Disebabkan gen MEF2C penting dalam perkembangan dan fungsi sel otak, kebanyakan pesakit sindrom MEF2C mempunyai simptom kecacatan dan kelewatan perkembangan intelektual, kesukaran untuk bertutur, pertuturan atau tiada pertuturan, hipotonia, autisme, masalah jantung, sawan dan kepala bersaiz kecil (Zweier & Rauch 2012). Pada masa kini, tiada rawatan khusus untuk menangani penyakit ini. Pesakit dirawat berdasarkan simptom yang kelihatan. Ubat anti-sawan digunakan untuk mengawal sawan, melatonin mungkin digunakan untuk masalah tidur, serta terapi fizikal, pekerjaan, dan pertuturan diberikan untuk menangani kelewatan perkembangan (Vrečar et al. 2017).

BAB III

KAEDAH KAJIAN

3.1 BAHAN DAN RADAS

3.1.1 Bahan kimia, reagen dan kit

Reagen yang digunakan untuk pengkulturan sel adalah media RPMI 1640 dengan L-Glutamin (Nacalai Tesque, Jepun), media DMEM (4.5g/l Glucose) dengan L-Glutamin dan Natrium Piruvat (Nacalai Tesque, Jepun), D-PBS (-) tanpa Ca dan Mg (Nacalai Tesque, Jepun), larutan 2.5g/l-Trypsin (Nacalai Tesque, Jepun), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, AS), larutan campuran Penisilin-Streptomisin (Nacalai Tesque, Jepun). Larutan 0.4% tripan biru (Gibco, AS) digunakan untuk tujuan pengiraan sel.

Bagi transfeksi sel, media serum dikurangkan Opti-MEM (Gibco, AS) dan reagen transfeksi *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific, AS) digunakan. Reagen yang digunakan untuk eksperimen berkaitan transduksi partikel lentiviral ke dalam sel adalah *Polybrene* (Millipore, AS), larutan antibiotik Puromisin (Sigma-Aldrich, AS), larutan antibiotik Higromisin B (Nacalai Tesque, Jepun) dan larutan antibiotik Blastisidin (Invivogen, AS). Reagen lain yang berkaitan eksperimen sel kultur adalah dimetilsulfoksida (DMSO) (Nacalai Tesque, Jepun), *AlamarBlue™ Cell Viability Reagent* (Thermo Fisher Scientific, AS), JQ1 (Sigma-Aldrich, AS), A-485 (Sigma-Aldrich, AS), *sunitinib* (APExBIO), *everolimus* (APExBIO), serbuk reagen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Thermo Fisher Scientific, AS) dan larutan kristal violet (Sigma-Aldrich, AS).

Reagen untuk amplifikasi DNA (PCR) dan gel elektroforesis DNA adalah *AccuPrime Pfx SuperMix* (Thermo Fisher Scientific, AS), penanda DNA 1 kb (Thermo

Fisher Scientific, AS), 6x pewarna DNA (Thermo Fisher Scientific, AS), pewarna DNA Fluorosafe (First base, Singapura), serbuk agarosa (Sigma-Aldrich, AS), dan 50x penimbal TAE pH 8.5 (Thermo Fisher Scientific, AS).

Reagen untuk eksperimen rekombinan DNA dan pengklonan adalah enzim *BbsI-HF* (New England Biolabs, AS), enzim *EcoRI* (New England Biolabs, AS), enzim *XhoI* (New England Biolabs, AS), enzim *XbaI* (New England Biolabs, AS), enzim *DpnI* (New England Biolabs, AS), enzim *AarI* (New England Biolabs, AS), enzim *Antartic phosphatase* (New England Biolabs, AS), enzim *T4 polynucleotide kinase* (New England Biolabs, AS), enzim *T4 ligase* (New England Biolabs, AS), penimbal *T4 ligase* (New England Biolabs, AS), bakteri kompeten E.coli DH5 α (New England Biolabs, AS), serbuk Luria-Bertani (LB) (Apical Scientific, Malaysia), serbuk agar Luria-Bertani (Apical Scientific, Malaysia) dan ampicilin (Sigma-Aldrich, AS).

Reagen yang digunakan untuk eksperimen pemblotan Western adalah *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, AS), β -merkaptotanol (Sigma-Aldrich, AS), 4x penimbal sampel Laemmli (BioRad, AS), 30% larutan akrilamida dan bis-akrilamida (BioRad, AS), ammonium persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, AS), N,N,N',N'-tetrametiletana-1,2-diamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, AS), polioksietilena sorbitan monolaurat (Tween-20) (Nacalai Tesque, Jepun), glicin (Bio-Rad, AS), serbuk tris (First Base, Singapura), *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, AS), albumin serum lembu (BSA) (Sigma-Aldrich, AS), 10x RIPA dengan koktel perencat protease (Nacalai Tesque, Japan), koktel perencat phosphatase (Thermo Fisher Scientific, AS), natrium dodesil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, AS) dan penanda protein *PM2610 ExcelBand™ Enhanced 3-color* (Smobio, Taiwan).

Reagen untuk qPCR dan ChIP-qPCR adalah 10x RIPA dengan koktel perencat protease (Nacalai Tesque, Japan), 16% formaldehid (Thermo Scientific, AS), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, AS), HEPES (Sigma-Aldrich, AS), albumin serum lembu (BSA) (Sigma-Aldrich, AS), natrium bikarbonat (Sigma-Aldrich, AS), *Pierce™ ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads* (Thermo Fisher Scientific, AS), *LunaScript® RT SuperMix* (New England Biolabs, AS), *Luna® Universal Probe qPCR Master Mix*

(New England Biolabs, AS) dan *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, AS).

Reagen lain dan berkaitan yang digunakan dalam kajian ini adalah *DNA Monarch® Gel Extraction kit* (New England Biolabs, AS), *Monarch PCR and DNA Cleanup kit* (New England Biolabs, AS), *Monarch® Plasmid Miniprep Kit* (New England Biolabs, AS), *TRIzol® RNA Extraction Reagent* (Thermo Fisher Scientific, AS). Bahan kimia yang digunakan pula adalah klorofom (Nacalai Tesque, Jepun), etanol (Sigma-Aldrich, AS), metanol (Nacalai Tesque, Japan), isopropanol (Sigma-Aldrich, AS), sodium klorida (NaCl) (Sigma-Aldrich, AS), asid asetik (Nacalai Tesque, Jepun) dan 37% asid hidroklorik (Sigma-Aldrich, AS).

3.1.2 Plasmid

Plasmid pKLV-U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP (selepas ini dirujuk sebagai pKLV-Puro) adalah sumbangan daripada Kosuke Yusa (Addgene #50946) (Koike-Yusa et al. 2014). Manakala plasmid pKLV-U6gRNA(BbsI)-PGKhygro2ABFP (selepas ini dirujuk sebagai pKLV-Hygro) telah dimodifikasi daripada plasmid pKLV-U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP dalam kajian terdahulu (Syafruddin et al. 2019). Plasmid pHR-SFFV-KRAB-dCas9-P2A-mCherry (selepas ini dirujuk sebagai dCas9-KRAB) adalah sumbangan daripada Jonathan Weissman (Addgene #60954) (Gilbert et al. 2014). Plasmid dCas9-hHDAC3 adalah sumbangan daripada Zhaolan Zhou (Addgene #98591). Plasmid pLVX-Puro diperolehi daripada Clontech (Addgene #632164) manakala plasmid pLVX-Hygro telah dimodifikasi daripada pLVX-Puro dalam kajian terdahulu (Rodrigues et al. 2018).

Bagi penghasilan partikel lentiviral, plasmid psPAX2 (Addgene #12260) dan pMD2.G (Addgene #122259) telah digunakan dan adalah sumbangan daripada Didier Trono. Plasmid sGEP adalah hadiah daripada Johannes Zuber (Addgene #111170) (Fellmann et al. 2013). Plasmid tetO-MEF2C adalah sumbangan daripada John Gearhart (Addgene #46031) (Addis et al. 2013). Gambar rajah peta plasmid yang digunakan dalam kajian ini ditunjukkan dalam Lampiran A.

3.1.3 Konstruk sgRNA dan shRNA, dan jujukan primer

Kesemua konstruk sgRNA dan shRNA, dan jujukan primer yang digunakan dalam kajian ini diperolehi daripada IDT, Singapura dan boleh dirujuk dalam Jadual 3.1 dan Jadual 3.2.

Jadual 3.1 Konstruk sgRNA dan shRNA

Konstruk	Jujukan (5' - 3')
iMEF2C	ATCGAAGACAACACCGAGACATCTTCGGGCTGCTATGTTTTAGAGCGC AGGTGTCGCCACCTGCGAAACACCGGCGCCGAGGCCGCTCGGAAGGT TTTACAGTCTTCTCG
shMEF2C	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAAGATGTTATAACTAAGTTATAGTGAAGC CACAGATGTATAACTTAGTTATAACATCTTGTGCTACTGCCTCGGA
Fragmen <i>sgRNA</i> <i>scaffold-U6 promoter</i>	ATCGCTCGAGCACCTGCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT AAGGCTAGTCCGTTACAACCTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTT TTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGT CGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATA CGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACA CAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGG GTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTA CCGTAACCTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA GGACGAAACACCGGGGGCAGGTGCTCGAGGCTA

Jadual 3.2 Senarai primer yang digunakan

Primer	Jujukan (5'-3')
<i>XhoI</i> -MEF2C kehadapan	ATCGCTCGAGATGGGGAGAAAAAAGATTCA
<i>XbaI</i> -MEF2C berbalik	ATCGTCTAGATCATGTTGCCCATCCTTCAG
<i>XhoI</i> -Flag-MEF2C kehadapan	ATCGCTCGAGATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACA AGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAGGGC TCCGGAGGGAGAAAAAAGATTCA
<i>XhoI</i> -shMEF2C kehadapan	TGAACTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG
<i>EcoRI</i> -shMEF2C berbalik	TCTCGAATTCTAGCCCCTTGAAGTCCGAGGCAGTAGGC
KLF6 cDNA PCR kehadapan	ATGGACGTGCTCCCCATGTG
KLF6 cDNA PCR berbalik	ACATGAAGAGGCACCTCTGA
ChIP qPCR iSE-1 kehadapan	GAAGTTGAGTCCCGGTGAAA
ChIP qPCR iSE-1 berbalik	ATACCCGTCCTGGGAAAATC
ChIP qPCR iSE-2 kehadapan	TCTGTAGCTGCTGAGGCTGA
ChIP qPCR iSE-2 berbalik	CACGGTGACAAATTGTGCTG

bersambung...

...sambungan

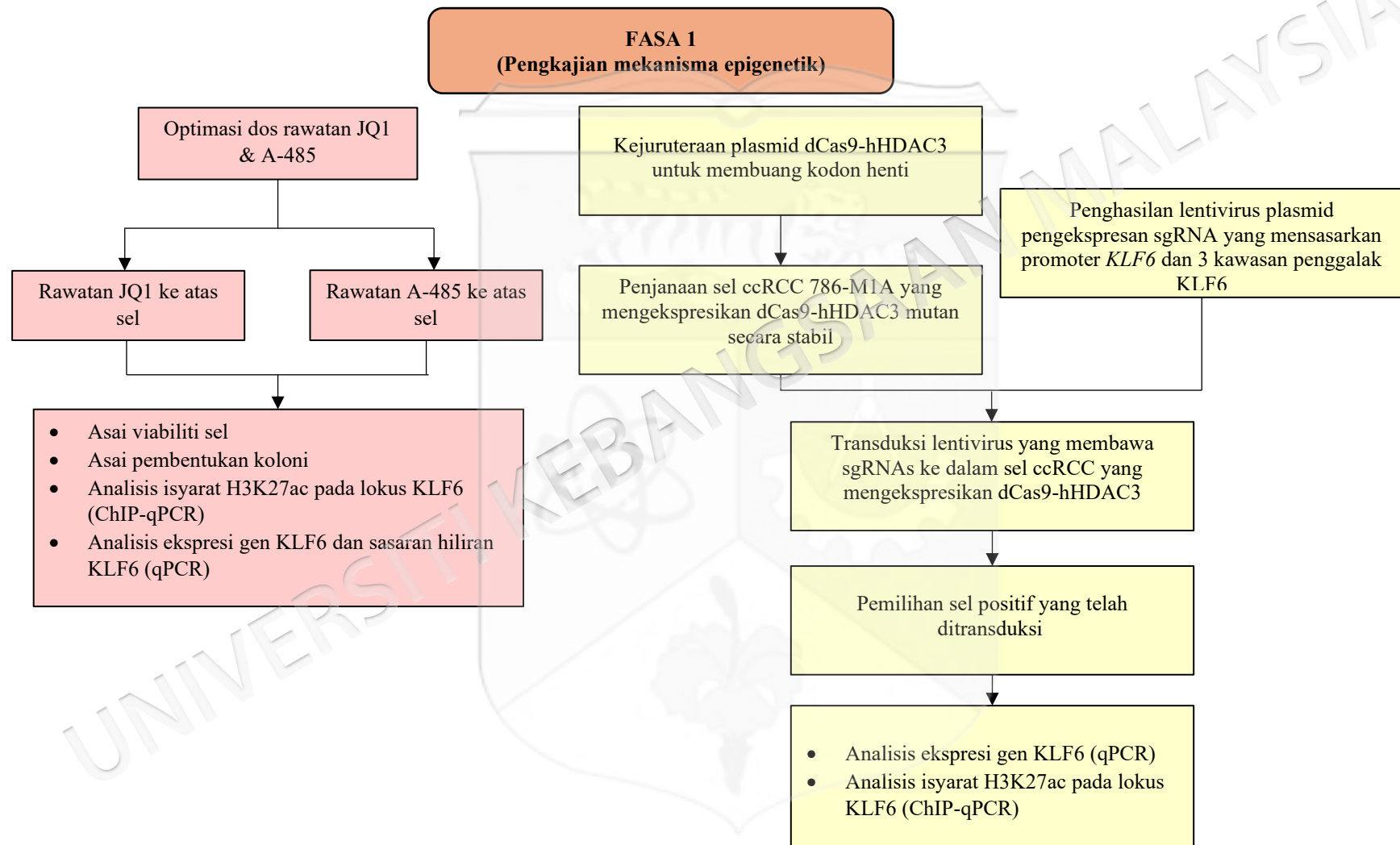
ChIP qPCR iSE-3 hadapan	CAGGGAGTGGAAGCTGATGT
ChIP qPCR iSE-3 berbalik	CACGCTTGCTGATTTCAAAG
MEF2C CDS hadapan	TACCCCAGTGGTTTCCGTAG
MEF2C CDS berbalik	TCTGAGTTTGTCCGGCTCTC
Ch-qPCR MEF2C Bind hadapan	CTCACAGCGCGGACTCCTCC
Ch-qPCR MEF2C Bind berbalik	GATTGGAAAGTGGCCTCGCA
Promoter CMV	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
Promoter U6	GAGGGCCTATTTCCTATGATTCC

3.1.4 Radas dan instrumen makmal

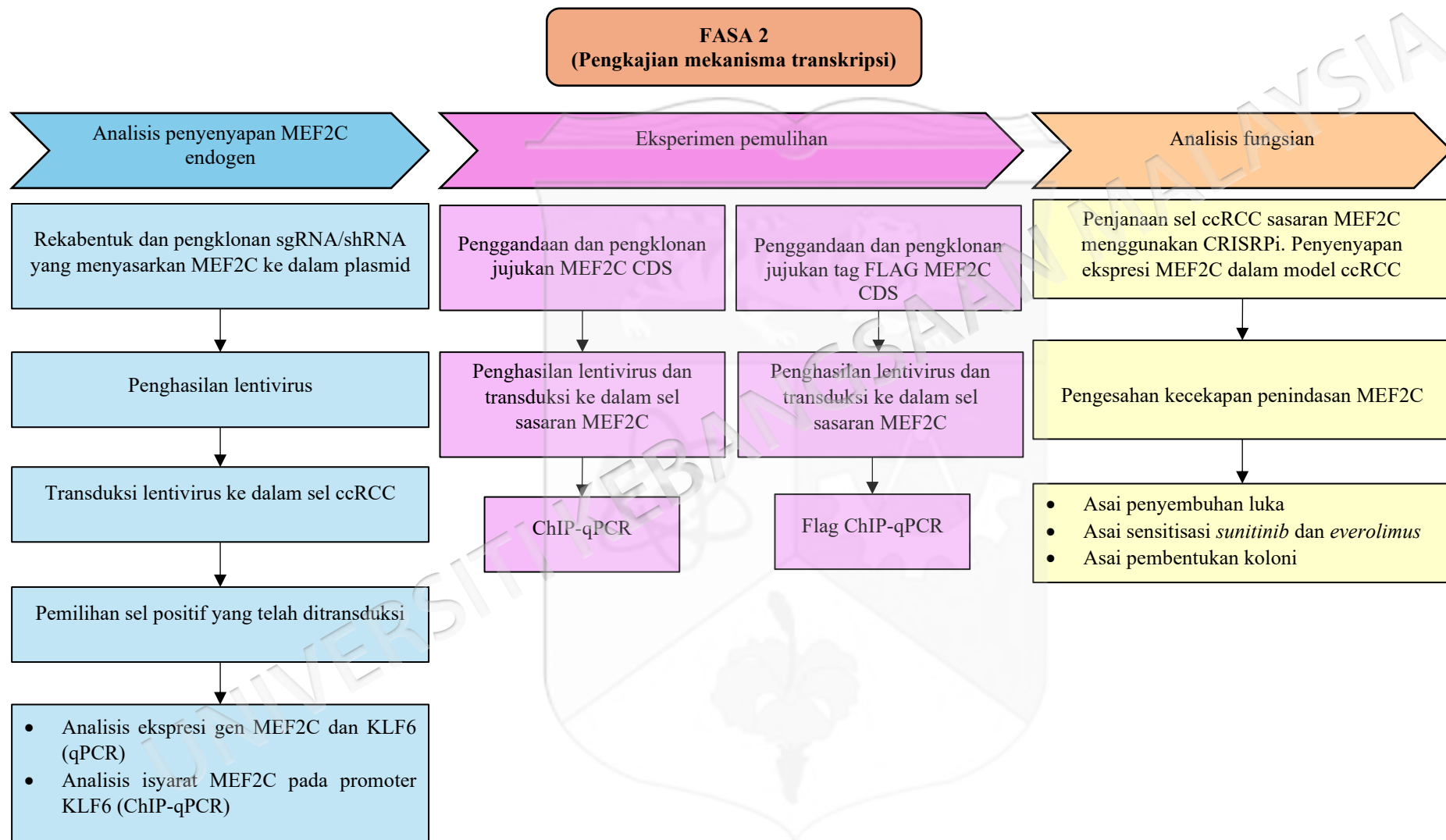
Radas dan instrumen makmal yang diguna pakai dalam kajian ini adalah mesin *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection* (Bio-Rad, AS), spektrofotometer *NanoDrop 2000C* (Thermo Scientific, AS), tangki elektroforesis gel mendatar (Bio-Rad, AS), sistem dokumentasi gel *Quantum-ST4* (Vilber Lourmat, Perancis), mesin pembaca mikroplat *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific, AS), mesin sistem pengimejan *ChemiDoc MP* (Bio-Rad, AS), mesin inkubator *New Brunswick™ Innova 44* (Eppendorf, Germany), mesin pengitar haba T100 (Bio-Rad, AS), mikroskop terbalik *Nikon TS100* (Nikon, AS), kabinet aliran udara lamina (Nuaire, AS), inkubator *CO₂ Galaxy 170R* (Eppendorf, Germany), kabinet keselamatan biologi kelas II (Nuaire, AS), penggoncang orbit asas IKA Ks260 (Merck, AS), set elektroforesis gel *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, AS), mesin *Eppendorf Biophotometer plus* (Eppendorf, Germany),imbangan analitik (Mettler Toledo, Switzerland), mesin pengempar 5424R dan 5810R (Eppendorf, Jerman), mesin *Applied Biosystem R 7500 Fast Real Time PCR* (Thermo Fisher Scientific, US), pek kuasa *BioRad 300* (Bio-Rad, US), dan sistem pembersihan air Direct-Q ® 3 UV (Merck, Germany), mesin *Branson Ultrasonics Sonifier* (Branson, AS) dan mesin *Invitrogen Countess Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific, AS).

3.2 REKABENTUK EKSPERIMEN

Secara keseluruhannya, kajian ini dibahagikan kepada dua fasa. Fasa pertama merangkumi kajian mekanisma epigenetik yang mengawal atur modifikasi histon serta pembukaan dan penutupan wilayah kromatin. Fasa kedua pula adalah berkaitan kajian mekanisma pengaturan transkripsi KLF6, dengan tumpuan untuk mengenalpasti faktor transkripsi hulu yang menyokong pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC. Ringkasan metodologi umum bagi kedua-dua fasa ini dijelaskan dalam Rajah 3.1 dan Rajah 3.2. Bagi mencapai objektif kajian untuk mengenalpasti komponen yang mengawal atur landskap penggalak super *KLF6* dan mengaruh pengekspresan tinggi gen KLF6, model in vitro sel selanjat ccRCC manusia digunakan adalah 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101. Di antara ketiga-tiga sel selanjat ini, 786-M1A merupakan sel selanjat utama yang digunakan dalam eksperimen melibatkan kejuruteraan genetik dan epigenetik. Sel selanjat 786-M1A ini juga telah digunakan dengan meluas dalam kajian ketua penyelidik yang terdahulu (Abuhamad et al. 2023; Patel et al. 2022; Rodrigues et al. 2018; Syafruddin et al. 2019). Maklumat dan ciri sel selanjat ccRCC manusia yang dinyatakan di atas akan dibincangkan dengan terperinci dalam subseksyen 3.3.1.



Rajah 3.1 Fasa 1 pengkajian mekanisme epigenetik yang merangkumi metodologi yang dilaksanakan dalam kajian seperti asai in vitro, qPCR, ChIP-qPCR dan CRISPR-dCas9-hHDAC3.



Rajah 3.2 Fasa 2 pengkajian mekanisme transkripsi yang merangkumi metodologi yang dilaksanakan dalam kajian seperti CRISPR-dCas9-KRAB, qPCR, ChIP-qPCR dan asai in vitro.

3.3 SEL KULTUR

3.3.1 Sel selanjar ccRCC dan kondisi pengkulturan

Sel selanjar ccRCC manusia 786-M1A dan OS-LM1B telah diperolehi daripada Dr. Sakari Vanharanta (Universiti Cambridge, UK). Sel selanjar 786-M1A adalah subpopulasi metastatik sel selanjar 786-O manakala OS-LM1B pula merupakan subpopulasi metastatik sel selanjar OS-RC2 yang telah diisolasi dan dicirikan oleh Vanharanta et al. (Vanharanta et al. 2013). Sel selanjar UOK101 diperolehi daripada Marston Linehan (*National Cancer Institute*, AS). Sel selanjar ccRCC manusia yang digunakan dalam kajian ini disahkan negatif mikoplasma dengan menggunakan *e-Myco™ Mycoplasma PCR Detection Kit* (Intron, Kirkland, WA, AS). Selain itu, tiada sel selanjar yang digunakan dalam kajian ini disenaraikan dalam pangkalan data sel selanjar yang disalahidentifikasi oleh *The International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC). Kesemua sel selanjar ccRCC manusia yang digunakan dalam kajian ini dikultur di dalam media RPMI-1640 yang mengandungi 10% FBS dan 1% penisilin-streptomisin (PenStrep).

Bagi penghasilan partikel lentiviral, sel selanjar embrio buah pinggang manusia HEK293T digunakan. Berbeza dengan sel selanjar ccRCC manusia, sel selanjar HEK293T dikultur di dalam media DMEM yang mengandungi 10% FBS dan 1% PenStrep. Sel selanjar ini dikultur dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan kandungan 5% CO₂. Apabila sel selanjar ini mencapai kepadatan 80%-90%, sel ini akan sama ada disubkultur, diplat atau dibekukan bergantung kepada keperluan eksperimen yang berkaitan. Kepadatan sel didefinisikan sebagai peratusan luas permukaan pertumbuhan yang diliputi oleh sel. Maklumat sel yang digunakan dalam kajian ini ditunjukkan dalam Lampiran B.

3.3.2 Pencairan sel krio

Sel yang telah dibekukan di dalam media pembekuan kultur sel yang mengandungi 90% FBS dan 10% *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) dicairkan dengan merendamkan tiub krio secara perlahan dalam bekas air pada suhu 37 °C. Sel ampaian yang telah dicairkan dipindah masuk ke dalam tiub emparan 15 mL yang mengandungi 3 mL media sel kultur

yang telah disuamkan. Sel seterusnya dipelet melalui pengemparan pada kelajuan 1200 putaran per minit (rpm) selama 5 minit pada suhu bilik. Media sel kultur dibuang dengan berhati-hati untuk memastikan sel yang dipelet di bahagian bawah tiub emparan tidak terganggu atau tertanggal. Tiga mililiter media sel kultur diletakkan ke dalam tiub emparan untuk mengarau sel yang seterusnya dipindahkan ke atas piring petri 6 cm². Piring petri yang mengandungi sel yang telah dinyahbekukan diletakkan dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan bekalan 5% CO₂.

3.3.3 Subkultur sel selanjara

Apabila kultur sel mencapai kepadatan sel sekitar 80-90%, proses tripsinasi akan dijalankan untuk menanggalkan sel yang melekat pada permukaan telaga atau piring petri sebelum disubkultur atau diplat untuk kegunaan eksperimen hiliran. Media pertumbuhan akan dibuang dan sel dibilas dengan 2-5 mL 1x PBS. Kemudian, 0.2-1 mL tripsin-EDTA ditambah ke atas sel dan diinkubasi selama 5 minit dalam inkubator 37 °C bagi membolehkan penanggalan sel daripada permukaan telaga atau piring petri. Selepas sel-sel tertanggal sepenuhnya, 1-3 mL media pertumbuhan ditambah untuk menyahaktifkan tripsin, dan sel akan dipelet melalui pengemparan selama 5 minit pada kelajuan 1,200 rpm. Supernatan kemudian dibuang, dan 1 mL media pertumbuhan ditambah ke dalam tiub emparan dan sel dikarau semula. Ampaian sel kemudian dibahagikan kepada isipadu media pertumbuhan yang sesuai dan dimasukkan ke dalam plat telaga atau piring petri baru. Sel-sel yang telah disubkultur ini diinkubasi dalam inkubator 37 °C dengan atmosfera lembab 5% CO₂.

3.3.4 Pengawetan krio sel selanjara

Pengawetan krio sel selanjara dilakukan bagi menyimpan sel apabila tidak digunakan dan memastikan ketersediaan stok sel terutama sekali sel yang dijana melalui teknik kejuruteraan genetik untuk eksperimen pada masa hadapan. Bagi mengawet sel selanjara secara krio, kultur sel yang telah mencapai kepadatan 80-90% ditripsinasi seperti yang diperincikan dalam subseksyen 3.3.3. Seterusnya, ampaian sel dipelet melalui pengemparan selama 5 minit pada kelajuan 1,200 rpm. Sel yang telah dipelet kemudiannya dikarau bersama media pembekuan. Seterusnya, ampaian sel yang telah dikarau dengan media pembekuan dipindahkan ke dalam tiub krio. Tiub krio ini

diletakkan di dalam bekas beku (*Mr. Frosty*) yang diisi dengan isopropil alkohol dan disimpan pada suhu -80°C semalaman. Tiub krio dipindahkan ke dalam cecair nitrogen untuk penyimpanan jangka panjang. DMSO bertindak sebagai agen penyejuk kriogenik untuk mengurangkan titik beku media dan membenarkan kadar penyejukan yang lebih perlahan. Penyejukan berperingkat adalah penting untuk mengurangkan risiko pembentukan kristal ais yang boleh menyebabkan kerosakan sel dan mengurangkan kadar viabiliti sel. Kadar penyejukan terbaik bagi sel adalah pada kadar $1^{\circ}\text{C}/\text{minit}$.

3.3.5 Pengiraan sel menggunakan *Invitrogen Countess Automated Cell Counter*

Jumlah sel dan kadar viabiliti ditentukan melalui pengiraan yang menggunakan kaedah pewarnaan tripan biru. Sel yang hidup akan kelihatan lutsinar dan jelas manakala sel yang mati akan berwarna biru apabila diperhatikan di bawah mikroskop. Secara khusus, $10\ \mu\text{L}$ ampai sel dicampur dengan $10\ \mu\text{L}$ larutan tripan biru (kadar nisbah 1:1). Seterusnya $10\ \mu\text{L}$ campuran sel dan tripan biru ini dipipet ke dalam slaid *Countess* dan kemudiannya slaid dimasukkan ke dalam mesin *Invitrogen Countess Automated Cell Counter*. Mesin *Countess* secara automatik memaparkan jumlah sel (sel/mL) dan kadar viabiliti sel (%).

3.4 PENGESAHAN FUNGSI MOLEKUL BRD4 DAN P300 DALAM MENYOKONG PENGGALAK SUPER *KLF6* DAN EKSPRESI *KLF6* SECARA PENYASARAN KIMIA

Bagi mengkaji keterlibatan dan fungsi pengawalaturan epigenetik BRD4 dan P300 dalam menyokong pembentukan landskap penggalak super *KLF6* dan mengaruh ekspresi *KLF6* dalam sel selanjara ccRCC, aktiviti BRD4 dan P300 disasarkan dengan menggunakan perencat kimia JQ1 dan A-485. JQ1 menyasarkan molekul BRD4 manakala molekul P300 disasarkan oleh A-485. Kesan penyasaran molekul BRD4 dan P300 ini ke atas fenotip sel selanjara ccRCC dinilai melalui asai viabiliti sel dan asai pembentukan koloni. Di samping itu, analisis qPCR dijalankan untuk menentukan kesan penyasaran BRD4 dan P300 terhadap tahap ekspresi gen *KLF6* dan sasaran hilirannya. Akhir sekali, analisis ChIP-qPCR dijalankan untuk mengkuantifikasi tahap isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super *KLF6*.

3.4.1 Rawatan JQ1 dan A-485 terhadap asai viabiliti sel

Kadar pertumbuhan dan viabiliti sel selanjara ccRCC yang dirawat dengan perencat kimia JQ1 dan A-485 dinilai menggunakan reagen asai viabiliti sel *AlamarBlue*. Sebagai permulaan, perencat kimia JQ1 dan A-485 disediakan terlebih dahulu. Serbuk JQ1 dilarutkan dalam DMSO untuk menghasilkan stok 3.6 mM. Stok ini kemudiannya dilarutkan bersama media untuk menghasilkan larutan kerja 1 μM , 10 μM dan 20 μM . Manakala serbuk A-485 dilarutkan dalam DMSO untuk menghasilkan stok 3.7 mM. Stok ini kemudiannya dilarutkan bersama media untuk menghasilkan larutan kerja 1 μM dan 10 μM .

Secara umumnya, rawatan JQ1 atau A-485 ke atas sel ccRCC dilakukan secara berasingan. Pertama sekali, asai ini dilakukan dengan memplat sebanyak 0.5×10^3 sel 786-M1A, 1×10^3 sel OS-LM1B, dan 1×10^3 sel UOK101 dalam 100 μL media pertumbuhan di dalam plat telaga 96. Bilangan setiap sel ccRCC yang diplat ini telah melalui proses pengoptimuman. Sel selanjara ccRCC yang diplat ini dikultur semalaman bagi mencapai tahap konfluensi 70% sebelum rawatan JQ1 atau A-485 dijalankan. Pada keesokan harinya, media pertumbuhan dibuang dan larutan kerja perencat kimia ditambah ke atas sel. Selain itu, media baru yang dicampur bersama DMSO juga ditambah ke atas sel. Sel selanjara yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia.

Seterusnya, sel diinkubasi selama 72 jam. Selepas 72 jam, media ditukar kepada 120 μL media baru yang mengandungi nisbah 1:10 reagen *AlamarBlue* kepada media dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C dengan atmosfera lembab 5 % CO_2 terlindung daripada cahaya. Selepas 2 jam, 100 μL media dipindahkan ke dalam plat hitam bertelaga 96 dan flouresen diukur pada gelombang pengujaan 560 nm dan pada gelombang pancaran 590 nm menggunakan pembaca mikroplat *Varioskan Flash*. Sebagai permulaan, tiga telaga media tanpa sel telah disediakan sebagai kawalan kosong. Setiap kumpulan rawatan mempunyai lima telaga. Bagi menentukan jumlah sel yang diplat secara tepat, gelombang pengujaan diambil pada hari 0 (24 jam selepas kultur). Pengiraan bermula dengan menolak bacaan purata kawalan kosong daripada setiap bacaan telaga rawatan untuk membuang latar belakang gelombang pengujaan yang

tidak diingini. Kemudiannya bacaan selepas 72 jam direlatifkan kepada bacaan pada hari 0. Seterusnya, bacaan sel yang dirawat dengan perencat kimia direlatifkan dengan bacaan sel kawalan.

3.4.2 Rawatan JQ1 dan A-485 terhadap asai pembentukan koloni

Asai pembentukan koloni adalah asai untuk menentukan kemampuan satu sel tunggal untuk bertumbuh dan membentuk koloni sel. Secara umumnya, rawatan JQ1 atau A-485 ke atas sel ccRCC dilakukan secara berasingan. Eksperimen ini bermula dengan memplat sebanyak 1×10^3 sel selanjar 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101 di dalam setiap plat telaga 6 bersama larutan kerja perencat kimia dan diinkubasi pada suhu 37°C selama tujuh hari untuk membenarkan pembentukan koloni. Ketika proses tripsinisasi, sel perlu diampai dengan teliti bagi menghasilkan ampaian sel tunggal. Bagi eksperimen yang menggunakan perencat kimia JQ1 dan A-485, larutan kerja setiap perencat kimia dicampur bersama media berdasarkan kepekatan perencat kimia yang diperlukan. Selain itu, media baru yang dicampur bersama DMSO juga ditambah ke atas sel. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia. Langkah penetapan, pewarnaan dan bacaan serapan larutan pewarna dilakukan pada hari ketujuh.

Selepas tujuh hari, media dibuang dengan cara aspirasi dan sel dibilas dengan 1 mL 1x PBS sebanyak dua kali. Larutan PBS kemudiannya dibuang dan sel ditetapkan dengan 500 μL campuran 10% metanol dan 10% asid asetik dengan nisbah 1:1. Plat telaga 6 ini diletakkan di atas penggoncang mendatar selama 20 minit pada suhu bilik. Koloni kemudian diwarnakan dengan 500 μL larutan pewarna kristal ungu dan plat telaga 6 ini diletakkan semula di atas penggoncang mendatar selama 30 minit pada suhu bilik. Larutan pewarna kristal ungu yang tidak melekat kemudian dibuang dan sel dibilas dengan air paip yang mengalir. Plat telaga 6 ditempatkan di dalam ketuhar pengering sehingga kering.

Gambar koloni kemudian direkod dengan menggunakan mesin sistem pengimejan *ChemiDoc MP*. Bagi mengambil bacaan serapan larutan pewarna kristal ungu, 600 μL 10% asid asetik ditambah ke dalam setiap telaga dan plat digoncang selama 10 minit untuk mengelusi larutan pewarna. Dua ratus mikroliter daripada larutan

pewarna yang dielusi dipindahkan kepada plat telaga 96 yang jernih dan kemudian bacaan serapan diukur pada 590 nm menggunakan pembaca mikropelat *Varioskan Flash*. Data dinormalkan kepada bacaan serapan sel kawalan and dikalikan dengan 100% seperti formula dibawah:

$$\text{Serapan relatif (\%)} = \frac{(\text{Bacaan sel yang dirawat})}{(\text{Bacaan sel kawalan})} \times 100\%$$

3.4.3 Pengekstrakan RNA

Pengekstrakan RNA daripada sel yang telah dipelet dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol[®]. Pengekstrakan dilakukan mengikut prosedur yang dicadangkan oleh syarikat pengeluar. Sebanyak 1 mL 1x PBS sejuk ditambah ke dalam tiub emparan 1.5 mL yang mengandungi sel yang telah dipelet. Tujuan penambahan 1x PBS sejuk ini adalah untuk membasuh sel pelet dan membuang lebihan media pertumbuhan. Tiub emparan ini seterusnya diempar pada kelajuan 1,200 x g selama 5 minit pada suhu 4 °C. Setelah selesai emparan, supernatan dibuang dan 200 µL reagen TRIzol[®] ditambah ke dalam sel pelet sambil dikaruh secara kasar bagi tujuan penghomegenan dan pemecahan sel. Campuran lisat ini kemudiannya diinkubasi selama 5 minit pada suhu bilik. Setelah inkubasi, 40 µL klorofom ditambah ke dalam sampel dan tiub emparan digoncang dengan laju. Sampel kemudian diinkubasi selama 3 minit sebelum diempar pada kelajuan 12,000 x g selama 15 minit pada suhu 4 °C bagi menghasilkan tiga lapisan fasa. Fasa tersebut bermula dari lapisan cecair atas yang jernih (mengandungi RNA), interfasa (mengandungi DNA) dan fasa organik merah (mengandungi protein).

Cecair lapisan teratas yang mengandungi RNA dipindahkan secara berhati-hati ke dalam tiub emparan baru tanpa mengganggu dua lapisan bawah. RNA dimendakkan daripada cecair lapisan yang jernih dengan menambahkan 100 µL 100% isopropanol dan diinkubasi selama 10 minit pada suhu 4 °C kemudian diempar pada kelajuan 12,000 x g selama 10 minit pada suhu yang sama. Supernatan dibuang dengan berhati-hati tanpa mengganggu pelet mendapan RNA yang seperti gel. Pelet RNA ini dibasuh dengan 200 µL 75% etanol sejuk dan kemudian diempar pada kelajuan 7,500 x g selama 5 minit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan pelet RNA dikeringkan pada suhu bilik selama

5 minit. Setelah itu, 40 μL air bebas RNase dan DNase (*RNase-free water*) dipipet dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 5 minit. Kepekatan dan ketulenan RNA yang telah diekstrak dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. RNA digunakan secara terus untuk sintesis cDNA bagi proses hiliran seperti analisis qPCR atau amplifikasi urutan pengekodan protein (*protein coding sequence*) atau disimpan dalam peti sejuk beku -80°C untuk kegunaan pada masa hadapan.

3.4.4 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan kit *LunaScript® RT SuperMix*, berdasarkan protokol syarikat pengeluar. Sampel RNA yang telah diekstrak dan reagen sintesis cDNA diletakkan di atas ais sepanjang eksperimen dijalankan. Untuk mensintesis cDNA, campuran tindakbalas disediakan dalam tiub PCR 0.2 mL dengan mencampurkan 2 μL reagen *LunaScript® RT SuperMix*, 500 ng sampel RNA dan ditambah dengan air bebas RNase dan DNase bagi mencapai 10 μL isipadu akhir. Campuran tindakbalas ini diinkubasi dalam mesin pengitar haba T100 dengan menggunakan kondisi tindakbalas transkripsi berbalik yang dinyatakan Jadual 3.3. Setelah selesai, produk sintesis cDNA digunakan untuk proses analisis qPCR atau disimpan dalam peti sejuk -20 °C untuk kegunaan pada masa hadapan.

Jadual 3.3 Kondisi bagi tindakbalas transkripsi berbalik

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Penyepuhan	25	2	1
Sintesis cDNA	55	10	
Penyahaktifan haba	95	1	
Suhu tahanan	4	∞	

3.4.5 Analisis tahap ekspresi *KLF6* dan sasaran hiliran *PDGFβ* menggunakan qPCR

Kaedah qPCR digunakan untuk menentukan tahap ekspresi gen *KLF6* dan *PDGFβ* yang merupakan sasaran hiliran bagi gen *KLF6*. Reagen *Luna® Universal Probe qPCR Master Mix* dan prob ekspresi gen TaqMan 20x digunakan untuk eksperimen qPCR. Perincian prob TaqMan 20x yang digunakan dalam kajian ini disenaraikan seperti dalam Jadual 3.4. Di samping itu, resipi campuran reagen untuk eksperimen qPCR ditunjukkan dalam Jadual 3.5.

Jadual 3.4 Senarai prob TaqMan

Prob	ID asai
KLF6	Hs00810569_m1, FAM-MGB, XS, NFQ
PDGFβ	Hs00966522_m1, FAM-MGB, XS, NFQ
MEF2C	Hs00231149_m1, FAM-MGB, XS, NFQ
ACTB	Hs03023943_g1, FAM-MGB, S, NFQ

Jadual 3.5 Penyediaan reagen untuk qPCR

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL	Kepekatan akhir
<i>qPCR master mix</i> 2x	2.5	1x
Prob TaqMan 20x	0.25	1x
cDNA (1:10)	2	
Jumlah	5	

Langkah pertama dalam penyediaan reagen qPCR adalah dengan menyediakan campuran induk gen yang berbeza yang merangkumi *qPCR master mix* dan prob TaqMan berdasarkan bilangan telaga yang diperlukan. Campuran induk ini kemudiannya dipipet ke dalam telaga plat 96. Seterusnya, cDNA dicairkan bersama air dengan nisbah 1:10. Larutan cDNA ini dipipet ke dalam setiap telaga yang mempunyai campuran induk. Plat telaga 96 ini ditutup dengan kedap filem optik dan diempar dalam penggempar sejuk 5810R dengan kelajuan 1,000 x g selama 1 minit. Amplifikasi qPCR dijalankan mengikut Jadual 3.6 menggunakan mesin *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection*.

Jadual 3.6 Kondisi qPCR bagi analisis ekspresi gen

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Penyahasian awal	95	1 minit	1
Penyahasian	95	15 saat	40 - 45
Pemanjangan	60	30 saat (+bacaan plat)	

Data mentah daripada analisis qPCR (nilai Ct) yang diperolehi diimport dalam format *.xlsx*. Analisis tahap ekspresi gen dan lipat ganda perubahan dilakukan secara pengkuantitian relatif (*relative quantification*). Formula yang digunakan adalah $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yang diadaptasi dari Schmittgen dan Livak 2008. Definisi setiap simbol adalah seperti berikut:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen kajian}) - Ct (\text{gen rujukan})$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct (\text{sampel yang dirawat}) - Ct (\text{sampel yang tidak dirawat})$$

$$\text{Lipat ganda perubahan} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.4.6 Analisis tahap isyarat H3K27ac pada lokus *KLF6* menggunakan ChIP-qPCR

Analisis tahap isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super *KLF6* dijalankan dengan menggunakan asai imunopresipitasi kromatin (ChIP) yang digabungkan dengan teknik qPCR. ChIP adalah teknik imunopresipitasi yang kerap digunakan untuk mengkaji interaksi fizikal antara protein dan DNA dalam sesuatu jenis sel. Siasatan ini dilakukan untuk mendapatkan maklumat berkaitan regulasi transkripsi melalui pengubahsuaian histon (modifikasi epigenetik) atau interaksi pengikatan antara faktor transkripsi dengan wilayah DNA tertentu. Asai ini mempunyai beberapa langkah iaitu paut silang sel (*cells fixation*) untuk memelihara kompleks DNA-protein, lisis sel dan pengekstrakan kompleks DNA-protein, fragmentasi asid nukleik menggunakan sonifikasi, imunopresipitasi menggunakan antibodi yang berkaitan, paut silang berbalik dan pembersihan sampel DNA untuk analisis hiliran serta analisis qPCR. Ramuan penimbal yang digunakan dalam asai ini boleh dirujuk pada Lampiran C.

a. Paut silang sel untuk memelihara kompleks DNA-protein

Sebagai permulaan, pelet sel yang telah dirawat dengan JQ1 atau A-485 serta sel kawalan diinkubasi dalam 10 mL larutan 1% formaldehid selama 10 minit pada suhu bilik sambil berpusing. Formaldehid digunakan untuk memelihara struktur DNA dan komponen lain di dalam sel. Bagi menyahaktifkan reaksi formaldehid, 1 mL 0.125M glisin telah ditambah kemudian diinkubasi selama 5 minit pada suhu bilik sambil berpusing. Sel yang telah dipaut silang diempar pada kelajuan 1,200 x g selama 5 minit dan kemudian dibasuh menggunakan 15 mL 1x PBS. Langkah basuhan dilakukan sebanyak dua kali. Selepas basuhan yang terakhir, sel kemudiannya diempar dan disimpan dalam peti sejuk beku -80 °C untuk eksperimen selanjutnya atau digunakan secara terus untuk pengekstrakan kompleks DNA-protein yang dipaut silang.

b. Lisis sel dan pengekstrakan kompleks DNA-protein

Sebelum meneruskan proses selanjutnya, sel yang disimpan dalam peti sejuk beku -80 °C dicairkan terlebih dahulu. Sel yang telah dipaut silang dan penimbal lisis diletakkan di atas ais sepanjang eksperimen dijalankan. Dalam langkah ini, sel dilisis untuk mengekstrak kompleks DNA-protein. Pertama, 2 mL penimbal lisis ditambah ke dalam sel dan dipipet sebanyak 10 kali dan diinkubasi selama 5 minit. Larutan sel ini dihomogenkan menggunakan alat penghomogen. Alat penghomogen ini terdiri daripada tiub kaca silinder, anak lesung A dan anak lesung B. Perbezaan anak lesung A dan B adalah saiz diameternya di mana anak lesung A mempunyai diameter yang lebih kecil berbanding anak lesung B. Campuran sel dan penimbal lisis kemudiannya dipipet ke dalam tiub kaca silinder dan ditumbuk menggunakan anak lesung A sebanyak 10 kali. Kemudian, campuran sel ini ditumbuk menggunakan anak lesung B sebanyak 10 kali lalu dipindahkan ke dalam tiub emparan 15 mL.

c. Fragmentasi asid nukleik menggunakan sonifikasi

Seterusnya, proses sonifikasi dilakukan bagi menghasilkan fragmen pendek DNA. Tiub emparan 15 mL yang mengandungi sel yang dilisis diletakkan di atas ais bagi mengekalkan suhu dan mengelakkan sampel rosak disebabkan oleh haba tinggi yang terhasil daripada proses sonifikasi. Proses sonifikasi ini menggunakan mesin *Branson*

Ultrasonics Sonifier berdasarkan ketetapan masa 30 saat buka/30 saat tutup sebanyak 15 kitaran. Sel lisat kemudiannya diempar pada kelajuan 14,000 rpm selama 20 minit pada suhu 4 °C. Supernatan yang mengandungi fragmen DNA (lisat kompleks DNA-protein) disimpan untuk proses selanjutnya. Sepuluh mikroliter daripada supernatan disimpan, diasingkan dan dilabel sebagai “input” yang akan digunakan dalam analisis qPCR.

d. Imunopresipitasi menggunakan antibodi yang berkaitan

Seterusnya, untuk langkah imunopresipitasi, manik protein A/G bermagnet dikonjugat bersama antibodi H3K27ac dan IgG, masing-masing. Sebelum memulakan proses imunopresipitasi, 100 µL manik protein A/G bermagnet diekuilibrasi dengan 1 mL larutan 0.5% BSA dalam 1x PBS sebanyak tiga kali. Selepas ekuilibrasi terakhir, 500 µL larutan 0.5% BSA dipipet ke dalam pelet manik. Sejurus selepas itu, 10 µg antibodi H3K27ac atau 1 µg antibodi IgG ditambah dalam tiub 2 mL berasingan dan dikonjugat dengan manik protein A/G bermagnet yang telah diekuilibrasi seterusnya diinkubasi di atas penggoncang berputar sekurang-kurangnya 4 jam dalam bilik sejuk yang bersuhu 4 °C. Senarai antibodi yang digunakan dalam eksperimen ChIP boleh dirujuk pada Jadual 3.7.

Seterusnya, manik protein A/G bermagnet yang telah dikonjugat dengan antibodi dibasuh dengan 1 mL larutan 0.5% BSA sebanyak tiga kali. Selepas basuhan terakhir, lisat kompleks DNA-protein ditambah ke dalam manik protein A/G bermagnet yang telah berkonjugat dan diinkubasi semalaman di atas penggoncang berputar pada suhu 4 °C. Pada hari berikutnya, manik yang telah diinkubasi dibasuh sebanyak tiga kali dengan 1 mL larutan penimbal garam rendah dan sekali dengan 1 mL larutan penimbal garam tinggi.

Jadual 3.7 Antibodi yang digunakan dalam ChIP-qPCR

Antibodi	Pengeluar dan nombor katalog	Protein sasaran
<i>Rabbit polyclonal to Histone H3 (acetyl K27) - ChIP Grade</i>	AB4729 (Abcam, UK)	H3K27ac
<i>Rabbit IgG, polyclonal – Isotype Control</i>	AB37415 (Abcam, UK)	IgG

e. Paut silang berbalik dan pembersihan sampel DNA untuk analisis hiliran

Bagi mengelusi DNA yang melekat pada manik bermagnet, 100 μL penimbal elusi ditambah kemudian diinkubasi dan diempar dengan kelajuan 1,000 rpm pada suhu 65 °C selama 3 jam. Proses penulenan DNA dilakukan menggunakan kit *Monarch PCR and DNA Cleanup*. Rajah 3.3 menunjukkan langkah ringkas asai ChIP.

f. Analisis qPCR

qPCR dilakukan bagi menentukan tahap isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super *KLF6* setelah dirawat dengan salah satu perencat kimia JQ1 atau A-485 serta sel kawalan, dengan menggunakan *SYBRTM Green PCR Master Mix* dan primer ChIP qPCR iSE_1, ChIP qPCR iSE_2, dan ChIP qPCR iSE_3 seperti di Jadual 3.2. Campuran reagen qPCR disediakan seperti dalam Jadual 3.8. Langkah pertama dalam penyediaan reagen qPCR adalah dengan menyediakan campuran induk primer yang berbeza yang merangkumi *SYBRTM Green PCR Master Mix*, primer hadapan dan primer berbalik berdasarkan bilangan telaga yang diperlukan. Campuran induk ini kemudiannya dipipet ke dalam telaga plat qPCR 96. Seterusnya, DNA yang telah dituliskan dipipet ke dalam setiap telaga yang mempunyai campuran induk. Plat telaga qPCR 96 ini ditutup dengan kedap filem optik dan diempar dalam penggempar sejuk 5810R dengan kelajuan 1,000 x g selama 1 minit. Amplifikasi qPCR dijalankan mengikut Jadual 3.9. qPCR dijalankan dengan menggunakan mesin *Applied Biosystem 7500 Fast Real Time PCR*.

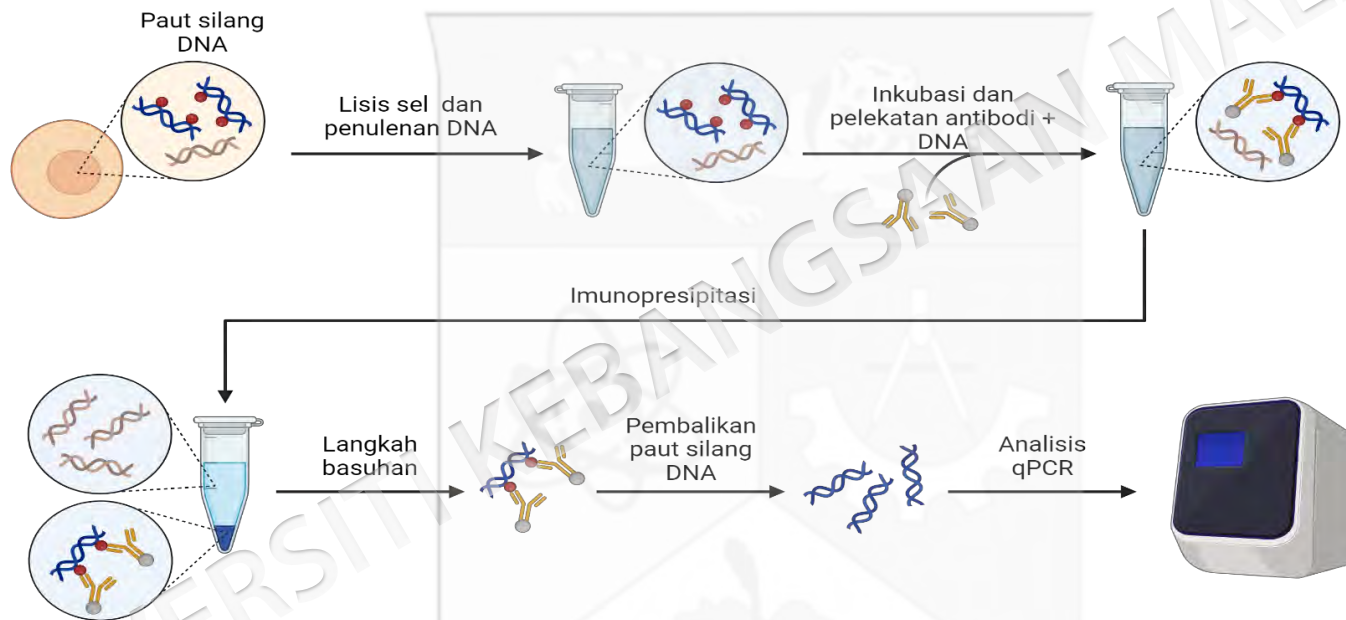
Jadual 3.8 Penyediaan reagen untuk qPCR

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
<i>SYBRTM Green PCR Master Mix</i>	2.5
Primer hadapan (10 μM)	0.5
Primer berbalik (10 μM)	0.5
Air bebas RNase dan DNase	0.5
DNA tulen	1
Jumlah	5

Jadual 3.9 Kondisi qPCR bagi analisis primer yang dipilih

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Pengaktifan awal haba	50	2 minit	1
Pengaktifan	95	2 minit	1
Penyahhasilan	95	3 saat	} 40
Pemanjangan	60	30 saat (*bacaan plat)	

Asai imunopresipitasi kromatin (ChIP)-qPCR



Rajah 3.3 Langkah ringkas dalam asai imunopresipitasi kromatin (ChIP) - qPCR. Eksperimen ini mempunyai beberapa langkah utama iaitu paut silang sel, lisis sel dan pengekstrakan kompleks DNA-protein, fragmentasi asid nukleik menggunakan sonifikasi, imunopresipitasi menggunakan antibodi, paut silang berbalik dan pembersihan sampel DNA untuk analisis aliran qPCR.

3.4.7 Pengekstrakan dan kuantifikasi protein

Pengekstrakan protein daripada sel pelet yang telah dirawat dengan JQ1 atau A-485 serta sel kawalan dilakukan menggunakan penimbal lisis RIPA yang mengandungi 1:100 koktel perencat enzim protease dan 1:100 koktel perencat enzim fosfatase. Penimbal lisis RIPA yang ditambah ke dalam pelet sel bergantung kepada saiz pelet iaitu di antara 50 μL – 200 μL . Campuran sel pelet dan penimbal lisis RIPA divorteks dengan kelajuan tinggi selama 10 saat dan diinkubasi selama 30 minit di atas ais. Sel lisat kemudiannya diempar pada kelajuan 14,000 rpm selama 20 minit pada suhu 4 °C. Supernatan yang mengandungi protein dipindahkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL yang baru. Sampel protein disimpan dalam peti sejuk beku -80 °C untuk kegunaan eksperimen hiliran.

Bagi menentukan kepekatan protein, asai kuantifikasi protein berasaskan kolorimetrik asid bikinoninik atau *bicinchoninic acid* (BCA) digunakan. Set protein piawaian BSA dengan julat kepekatan antara 20-2000 $\mu\text{g/mL}$ disediakan berpandukan resipi yang diberikan untuk menghasilkan lengkung piawai. Ujian dijalankan dalam plat telaga 96. Pertama sekali, 25 μL protein piawaian dipipet ke dalam plat telaga 96. Kemudian, sampel protein yang telah diekstrak dicairkan dengan menambah 1 μL sampel protein ke dalam 24 μL air tanpa RNase di dalam plat telaga 96. Reagen kerja BCA disediakan dengan mencampurkan 50 bahagian reagen BCA A dengan 1 bahagian reagen BCA B mengikut bilangan telaga yang diperlukan. Seterusnya, 200 μL campuran reagen kerja BCA ditambah ke dalam setiap plat telaga yang mengandungi protein piawaian dan sampel protein. Plat telaga 96 tersebut ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 minit. Kemudian, bacaan penyerapan diukur pada 562 nm menggunakan mesin pembaca mikroplat *Varioskan Flash*. Kepekatan sampel protein ditentukan daripada formula yang dijana daripada lengkung piawai.

3.4.8 Pemblotan Western

a. Pemisahan protein menggunakan kaedah elektroforesis

Gel digunakan untuk pemisahan protein berdasarkan saiz dengan menggunakan kaedah elektroforesis. Sepuluh peratus gel SDS-PAGE disediakan mengikut resipi dalam Lampiran D sebelum proses elektroforesis menggunakan apparatus *Mini-PROTEAN 3 Cell* dilakukan. Gel SDS-PAGE ini disediakan dengan menggunakan plat kaca berjarak 1.5 mm dan sikat 10 telaga. Selepas kepekatan protein sampel ditentukan, jisim protein yang sama diambil bagi setiap sampel dan dicampurkan dengan penimbal sampel Laemmli 1x yang mengandungi 8% β -merkaptoetanol. Seterusnya, campuran sampel protein dididihkan pada suhu 95 °C di atas blok termal selama 5 minit.

Campuran protein yang telah dididihkan serta penanda berat molekul protein *ExcelBand™ Enhanced 3-color High Range* dimuatkan ke dalam gel SDS-PAGE 10%. Penimbal larian pemblotan Western dimuatkan ke dalam tangki penimbal apparatus *Mini-PROTEAN 3 Cell* untuk mewujudkan medan elektrik yang membolehkan penolakan protein melalui gel semasa proses elektroforesis. Resipi penimbal larian pemblotan Western disediakan dalam Lampiran D. Pada awalnya, elektrik disalurkan menggunakan pek kuasa pada voltan tetap 80 V. Apabila penanda berat molekul protein telah masuk ke dalam gel pemisah, voltan dinaikkan kepada 120 V. Proses elektroforesis diberhentikan sejeurus penanda berat molekul protein berada di bahagian bawah gel.

b. Pemindahan protein ke atas membran pemindahan nitroselulosa

Protein yang telah dipisahkan dipindahkan ke atas membran pemindahan nitroselulosa 0.2 μ M. Sebelum pemblotan Western dilakukan, membran, kertas turas dan pad fiber direndam di dalam penimbal pemindahan. Kaedah pemindahan basah dan sejuk digunakan menggunakan penimbal pemindahan yang telah didinginkan. Resipi penimbal pemindahan disediakan dalam Lampiran D. Selepas proses elektroforesis selesai, gel dikeluarkan daripada tangki penimbal dan gel penyusun dibuang. Sandwich pemindahan disusun mengikut turutan bermula daripada pad fiber, kertas turas, gel pemisah, membran, kertas turas dan pad fiber (Rajah 3.4B). Penimbal pemindahan

dimuatkan ke dalam tangki penimbal dan elektrik disalurkan pada arus tetap 300 mA selama 90 minit. Selepas 90 minit, membran diwarnakan dengan pewarna Ponceau yang berwarna merah gelap untuk memeriksa sama ada protein telah dipindahkan dengan sempurna tanpa gangguan gelembung udara. Seterusnya, membran tersebut diinkubasi pada suhu bilik di dalam penimbal penghalang yang komposisinya adalah 5% susu tepung tanpa lemak yang dilarut dalam 0.1% Tween-20 dan TBS 1x (TBS-T) dengan goncangan sederhana selama 1 jam.

c. Inkubasi antibodi dan visualisasi

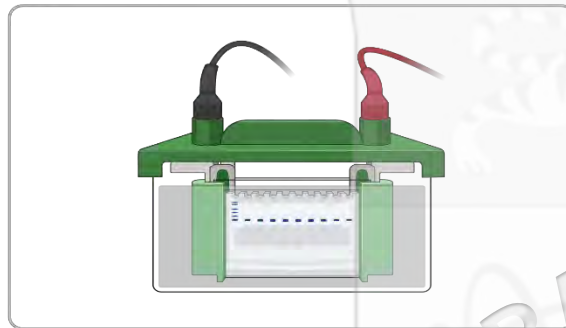
Membran ini kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C dengan antibodi primer pada kepekatan 1:1000 yang dicairkan dalam penimbal penghalang. Pada hari berikutnya, antibodi yang tidak terikat dibuang dengan mencuci membran tiga kali selama 5 minit dengan 0.1% TBS-T yang digoncang pada suhu bilik. Seterusnya, membran diinkubasi dengan antibodi sekunder pada nisbah pencairan 1:1000 pada suhu bilik selama 1 jam, diikuti dengan tiga kali pusingan pencucian dengan 0.1% TBS-T. Pengesanan isyarat pada membran dilakukan menggunakan *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* dengan menambahkan reagen chemiluminisen yang dipertingkatkan (ECL) dalam nisbah 1:1 selama 1 minit dan divisualisasikan menggunakan Sistem Pengimejan *Chemidoc MP* pada pelbagai titik masa pendedahan. Antibodi yang digunakan dalam kajian ini dan nisbah pencairan disenaraikan dalam Jadual 3.10.

Jadual 3.10 Senarai antibodi primer dan sekunder yang digunakan dalam pemblotan Western

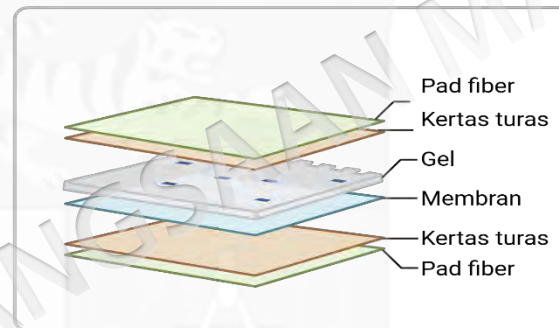
Antibodi	Jenis antibodi	Pengeluar dan nombor katalog	Nisbah pencairan	Protein sasaran
<i>Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Rabbit mAb</i>	Antibodi primer	#4857 (Cell Signaling Technology, AS)	1:3000	P-S6
<i>S6 Ribosomal Protein Mouse mAb</i>	Antibodi primer	#2317 (Cell Signaling Technology, AS)	1:1000	S6
<i>Beta Actin Antibody</i>	Antibodi primer	Sc-69879 (Santa Cruz, AS)	1:5000	Beta-actin
<i>Polyclonal rabbit anti-mouse IgG/HRP</i>	Antibodi sekunder	Nr.P 0260 (Dako, AS)	1:1000	Antibodi primer yang dibiakkan di dalam tikus
<i>Polyclonal swine anti-rabbit IgG/HRP</i>	Antibodi sekunder	Nr.P 0217 (Dako, AS)	1:1000	Antibodi primer yang dibiakkan di dalam arnab

Pemblotan Western

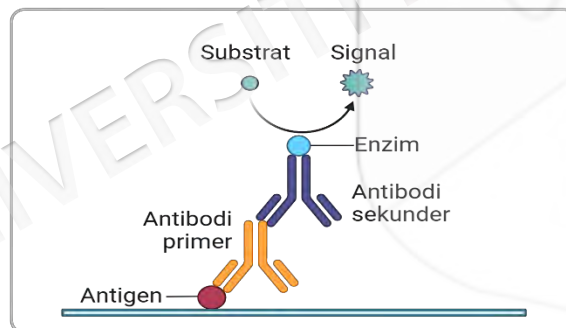
(A) Pemisahan



(B) Pemindahan



(C) Inkubasi antibodi



(D) Visualisasi



Rajah 3.4

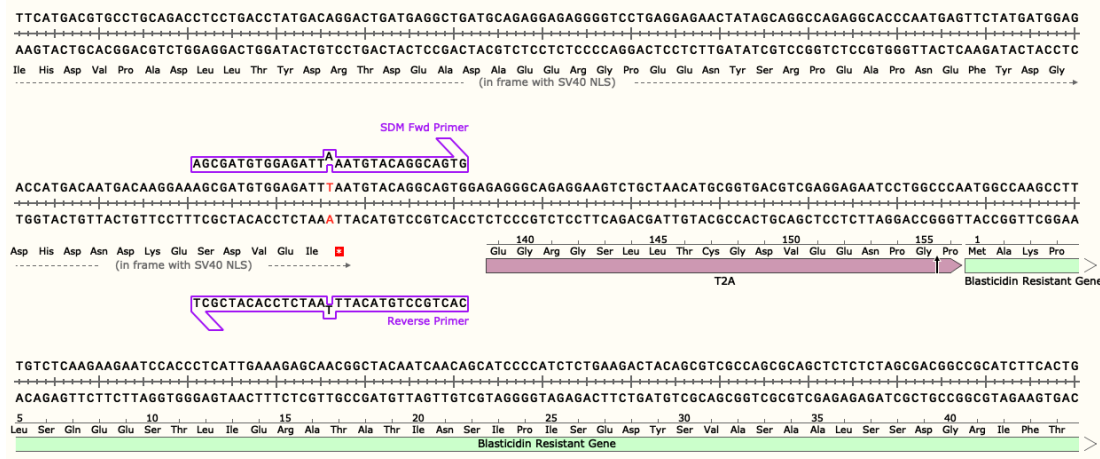
Langkah ringkas dalam pemblotan Western. Eksperimen ini mempunyai beberapa langkah utama iaitu pemisahan protein menggunakan kaedah elektroforesis SDS-PAGE, pemindahan protein ke atas membran, inkubasi antibodi dan visualisasi.

3.5 DEASETILASI HISTON PADA LOKUS PENGALAK SUPER *KLF6*

Teknik CRISPR-dCas9 digunakan untuk mengesahkan bahawa deasetilasi histon pada lokus penggalak super *KLF6* boleh mengakibatkan perubahan pada tahap isyarat H3K27ac dan seterusnya mengurangkan ekspresi *KLF6*. Secara khususnya, dCas9 yang dikongjugasi dengan enzim *histone deacetylase* digunakan untuk mengdeasetilasi histon di wilayah promoter dan beberapa wilayah penggalak pada lokus *KLF6* yang dipandu oleh RNA panduan tunggal (*single guide RNA*). Kesan deasetilasi histon pada wilayah yang disasarkan ini dinilai melalui analisis ekspresi gen *KLF6* dan tahap isyarat H3K27ac.

3.5.1 Mutagenesis terarah pada plasmid dCas9-hHDAC3

Plasmid yang mengekod dCas9 yang dikongjugasi dengan enzim *histone deacetylase*, dCas9-hHDAC3, diperolehi daripada repositori plasmid Addgene. Namun begitu, plasmid ini mempunyai kodon henti TAA di antara jujukan dCas9-hHDAC3 dan gen rintangan terhadap antibiotik blastisidin. Kodon henti ini akan diekspres oleh promoter yang sama di hulu dCas9-hHDAC3. Oleh kerana kehadiran kodon henti di antara jujukan ini, gen rintangan terhadap blastisidin tidak dapat diekspres dan ditranslasi kepada protein. Hal ini menyebabkan proses pemilihan sel yang telah ditransduksi dengan plasmid ini menggunakan antibiotik blastisidin tidak dapat dilakukan. Maka, mutagenesis terarah perlu dilakukan bagi menukarkan kodon henti TAA ini kepada AAA yang mengekod amino asid alanin. Perisian *SnapGene Viewer* (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>) digunakan untuk visualisasi jujukan plasmid dCas9-hHDAC3, dan mereka bentuk primer dan merancang strategi untuk eksperimen mutagenesis terarah ini. Rajah 3.5 menunjukkan lokasi primer yang telah direka bentuk sebelum mutagenesis terarah dimulakan. Primer hadapan dan berbalik direka bersaiz 31 bp dan mempunyai jujukan pengapit bersaiz 15 bp kiri dan kanan. Lokasi nukleotida T yang ingin ditukar kepada A direka berada di tengah-tengah primer. Senarai primer hadapan dan berbalik ditunjukkan dalam Jadual 3.11.



Rajah 3.5 Lokasi primer hadapan dan berbalik yang digunakan dalam mutagenesis terarah plasmid dCas9-hHDAC3.

Jadual 3.11 Primer yang digunakan dalam mutagenesis terarah

Primer	Jujukan (5' – 3')
Kehadapan	AGCGATGTGGAGATTAAATGTACAGGCAGTG
Berbalik	CACTGCCTGTACATTAAATCTCCACATCGCT

Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi keseluruhan plasmid dan memperkenalkan nukleotida baharu A berpandukan primer yang telah direka. PCR gradien yang menguji suhu penyepuhlingdapan yang berbeza-beza dilakukan untuk menentukan suhu yang optimum dan saiz produk yang dihasilkan adalah tepat. Campuran bagi tindakbalas PCR gradien ini diperincikan dalam Jadual 3.12. Tiga peratus DMSO digunakan dalam penyediaan reagen PCR untuk menghalang struktur sekunder dalam templat DNA atau primer DNA serta merendahkan suhu penyepulindapan. Program tindakbalas ditunjukkan dalam Jadual 3.13. Tindakbalas PCR gradien ini dijalankan dengan menggunakan mesin pengitar haba T100.

Jadual 3.12 Penyediaan reagen untuk PCR gradien

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
AccuPrime Pfx	22.5
Templat plasmid (1 μM)	1
0.1 μM Primer hadapan	0.5
0.1 μM Primer berbalik	0.5
3% DMSO	0.78
Air bebas RNase dan DNase	0.72
Jumlah	26

Jadual 3.13 Program PCR bagi analisis primer

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Pra-penyahaslian	95	2 minit	1
Penyahaslian	95	15 saat	15
Penyepuhan (kecerunan suhu)	A: 58 B: 60 C: 62	30 saat	
Pemanjangan	68	15 minit (1 minit per kb)	
Suhu tahanan	4		1

Produk PCR seterusnya dirawat menggunakan enzim *DpnI* selama 1 jam pada suhu 37 °C. Enzim *DpnI* mengenalpasti jujukan 5'-Gm6ATC di mana jujukan ini spesifik kepada DNA yang dimetilasi dan dihemimetilasi. *DpnI* digunakan untuk mencerna plasmid DNA templat yang mengandungi jujukan 5'-Gm6ATC tanpa mengganggu plasmid DNA yang telah menjalani mutagenesis terarah (produk amplifikasi PCR). Hal ini kerana plasmid DNA templat yang diisolasi daripada *Escherichia coli* (*E.coli*) mempunyai metilasi Dam dan seterusnya rentan kepada pencernaan *DpnI*.

3.5.2 Penghasilan *E.coli* yang kompeten secara kimia

Proses penghasilan *E.coli* yang kompeten bermula dengan menginkubasi 50 µL *E.coli* strain DH5α (NEB #C2897) komersil yang kompeten secara kimia dalam 5 mL media LB semalaman sambil digoncang pada kelajuan 200 rpm pada suhu 37 °C. Pada hari berikutnya, bakteria *E.coli* disubkultur 1:100 dalam media LB baru dan diinkubasi selama sehingga kepadatan optik (600 nM) mencapai antara 0.6 - 0.65. Kepadatan optik diukur menggunakan radas *Eppendorf Biophotometer plus*. Kultur bakteria kemudian diinkubasi di atas ais selama 30 minit dan kemudian dibahagikan ke dalam empat tiub konikal 50 mL. Seterusnya, kultur bakteria diempar pada kelajuan 3,500 rpm selama 10 minit pada suhu 4 °C. Sebanyak 100 mL CaCl₂ 50mM yang sejuk ditambah ke dalam pelet bakteria dan diinkubasi di atas ais selama 15 minit. Kultur bakteria kemudian diempar dengan kelajuan 3,500 rpm selama 10 minit pada suhu 4 °C. Seterusnya, 17 mL CaCl₂ 50mM yang sejuk dan 3 mL 100% gliserol ditambah ke dalam pelet bakteria. Bacteria kompeten dialikuot dan disimpan dalam freezer -80 °C.

3.5.3 Transformasi bakteria

Plasmid untuk ditransformasikan ditambah ke dalam bakteria *E.coli* kompeten yang telah dihasilkan. Campuran ini diinkubasi di atas ais selama 30 minit dan seterusnya kejutan haba dikenakan pada suhu 42 °C selama 1 minit. Tiub kemudiannya dipindahkan dengan segera ke atas ais dan dibiarkan selama 5 minit sebelum ditambah 300 µL media LB segar. Seterusnya, tiub diinkubasi pada suhu 37 °C sambil digoncang pada kelajuan 200 rpm selama 1 jam. Campuran bakteria kemudian disebar di atas plat agar LB yang disuplemen dengan 1:1000 ampisilin dan diinkubasi semalaman pada suhu 37 °C. Pada hari berikutnya, koloni yang terbentuk di atas plat agar LB + ampisilin diinokulasi ke dalam 3 mL media LB yang telah disuplemen dengan 1:1000 ampisilin, dan diinkubasi pada suhu 37 °C sambil digoncang pada kelajuan 200 rpm semalaman. Proses pengekstrakan plasmid dilakukan pada hari berikutnya.

3.5.4 Pengekstrakan plasmid menggunakan kit *Monarch® Plasmid Miniprep*

Plasmid yang telah ditransformasi diekstrak menggunakan kit *Monarch® Plasmid Miniprep*. Kultur bakteria dipindahkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL dan diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 30 saat. Langkah ini diulang sehingga kesemua kultur bakteria telah dipelet. Supernatan dibuang dan pelet bakteria kemudiannya dikaruh dalam 200 µL penimbal homogenisasi plasmid. Sel dilisis dengan menggunakan 200 µL penimbal lisis plasmid. Tiub emparan 1.5 mL ini digoncang perlahan-lahan sehingga warna bertukar ke merah jambu gelap. Seterusnya, lisat bakteria dineutralkan dengan menambah 400 µL penimbal peneutralan plasmid. Tiub diterbalikkan secara perlahan sehingga warna bertukar kekuningan dan mendakan terhasil. Tiub diinkubasi selama 2 minit. Mendakan ini dijelaskan dengan mengempar lisat bakteria pada kelajuan 12,000 rpm selama 2 minit.

Supernatan kemudiannya dipipet dan dipindahkan ke dalam turus *Monarch* dan diempar selama 1 minit. Selepas aliran terus dibuang, turus *Monarch* dimasukkan semula ke dalam tiub pengumpulan dan ditambah 200 µL penimbal pembasuh plasmid satu kemudian diempar selama 1 minit. Langkah basuhan diteruskan dengan menambah 400 µL penimbal pembasuh plasmid dua dan diempar selama 1 minit. Turus *Monarch* dipindahkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL yang bersih. Setelah itu, 30 µL air bebas

RNAse dan DNAse dipipet di tengah membran turus dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu bilik sebelum diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 menit bagi mendapatkan plasmid. Kepekatan dan ketulenan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Plasmid yang telah diekstrak kemudiannya digunakan untuk pengesahan mutasi melalui penjujukan *Sanger* berpanduan jujukan primer CMV Promoter.

3.5.5 Penghasilan partikel lentiviral plasmid dCas9-hHDAC3

Proses penghasilan lentivirus dan transduksi ini adalah untuk menjana sel selanjar 786-M1A yang mempunyai ekspresi dCas9-hHDAC3 yang stabil untuk jangka masa yang lama. Sebanyak 1×10^6 sel selanjar HEK293T diplat dalam telaga plat 6 sehari sebelum transfeksi. Pertamanya, 1.5 μg plasmid dCas9-hHDAC3 mutan atau 1.5 μg plasmid asal dCas9-hHDAC3 dicampur dengan plasmid pembungkusan lentiviral, 1.3 μg psPAX2 dan 0.5 μg pMD2.G dalam media DMEM tanpa serum dan antibiotik untuk mendapatkan jumlah isipadu keseluruhan 160 μL . Seterusnya, 10 μL reagen transfeksi *Lipofectamine 2000* dicairkan dalam 150 μL media DMEM tanpa serum dan antibiotik kemudian dititis perlahan-lahan diikuti dengan inkubasi selama 5 minut pada suhu bilik.

Lipofectamine 2000 yang telah dicairkan ditambah secara titisan ke dalam campuran plasmid dan seterusnya diinkubasi selama 30 minut pada suhu bilik. Kemudian, 320 μL campuran *lipofectamine*-plasmid dipipet secara titisan ke dalam telaga HEK293T yang mengandungi media lengkap. Selepas itu, HEK293T ini diinkubasi selama 72 jam dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan atmosfera lembab 5 % CO₂. Media dari transfeksi sel HEK293T disedut menggunakan picagari 2 mL dan ditapis menggunakan penapis picagari 0.45 μM . Media lentivirus ini dimasukkan ke dalam tiub krio 2 mL dan digunakan secara terus untuk proses transduksi atau disimpan dalam peti sejuk beku, -80°C sebelum tindakan selanjutnya.

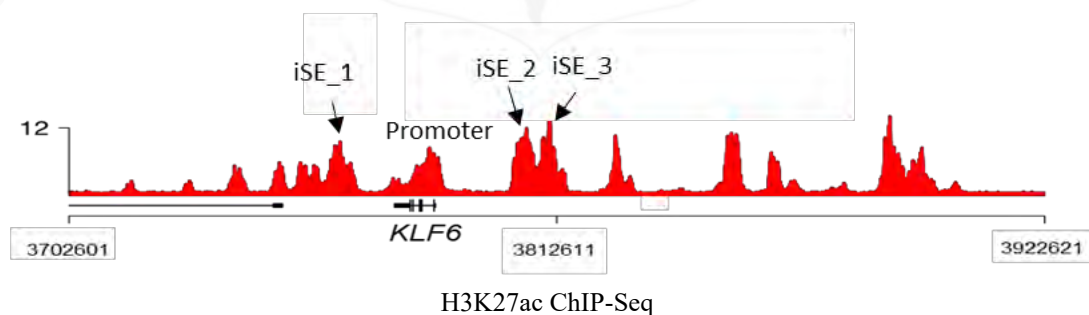
3.5.6 Transduksi plasmid dCas9-hHDAC3 ke dalam sel ccRCC

Sehari sebelum proses transduksi, sel selanjar 786-M1A telah diplatkan ke dalam plat bertelaga 6. Sel selanjar ccRCC ini dikultur semalaman bagi mencapai tahap konfluensi 70% pada keesokan harinya. Sebanyak 150 μL media yang mengandungi partikel

lentiviral ditambah ke dalam sel dan disuplemen dengan 8 $\mu\text{g/mL}$ *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dengan dCas9-hHDAC3 mutan dan dCas9-hHDAC3 asal dipilih menggunakan 30 $\mu\text{g/mL}$ blastisidin. Di samping itu, telaga yang mengandungi sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan blastisidin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati.

3.5.7 Penghasilan partikel lentiviral plasmid pKLV-Puro_sgRNA

Bagi menilai kesan deasetilasi histon dengan menggunakan kaedah CRISPR terhadap tahap ekspresi gen *KLF6* dan juga isyarat H3K27ac pada lokus penggalak super *KLF6*, empat konstruk sgRNA diklon dalam plasmid pKLV-Puro. Plasmid ini menyasarkan promoter *KLF6*, kawasan penggalak 1 (iSE_1), kawasan penggalak 2 (iSE_2) dan kawasan penggalak 3 (iSE_3). Keempat-empat plasmid ini telah direka dan dijana dalam kajian sebelum ini (Syafuruddin et al. 2019). Kedudukan empat kawasan sasaran ini boleh dirujuk pada Rajah 3.6.



Rajah 3.6 Ilustrasi wilayah penggalak konstituen yang disasarkan oleh iSE_1, iSE_2 dan iSE_3 pada lokus *KLF6*.

Sumber: Diubahsuai dari (Syafuruddin et al. 2019)

Penghasilan partikel lentiviral plasmid pKLV-Puro_Promoter KLF6, pKLV-Puro_iSE_1, pKLV-Puro_iSE_2, dan pKLV-Puro_iSE_3 dilakukan dengan menggunakan sel HEK293T. Prosedur untuk eksperimen ini adalah sama seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.5 kecuali 1.5 µg DNA plasmid pKLV-Puro_sgRNA (promoter KLF6, iSE_1, iSE_2 dan iSE_3) atau 1.5 µg plasmid kosong pKLV-Puro digunakan. Selepas itu, media yang mengandungi partikel lentiviral ditapis dan disimpan pada suhu -80 °C sebagai persediaan untuk proses transduksi.

3.5.8 Transduksi plasmid pKLV-Puro_sgRNA ke dalam sel ccRCC

Sel selanjara 786-M1A yang mengekspreskan dCas9-hHDAC3 secara stabil (786-M1A_dCas9-hHDAC3) diplatkan dalam plat telaga 6 dengan kepadatan 3×10^5 selama 24 jam sebelum transduksi. Pada keesokan harinya, sebanyak 150 µL media yang mengandungi partikel lentiviral ditambah ke dalam sel dengan kehadiran 8 µg/mL reagen *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik 4 µg/mL puromisin untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandungi sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan puromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati.

3.5.9 Analisis tahap ekspresi gen KLF6 menggunakan qPCR

Penentuan kadar ekspresi gen KLF6 selepas deasetilasi histon pada empat kawasan sasaran lokus KLF6 dijalankan menggunakan teknik qPCR seperti yang telah diterangkan pada seksyen 3.4.5.

3.5.10 Analisis tahap isyarat H3K27ac pada lokus *KLF6* menggunakan ChIP-qPCR

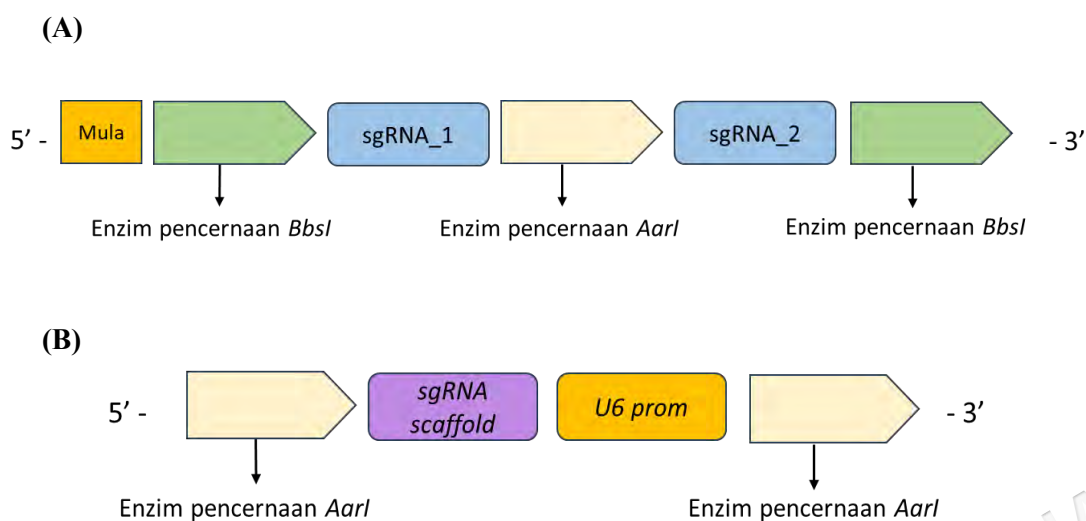
Penentuan tahap isyarat H3K27ac selepas deasetilasi histon pada empat kawasan sasaran lokus *KLF6* dijalankan menggunakan teknik ChIP-qPCR seperti yang telah diterangkan pada seksyen 3.4.6.

3.6 PENYENYAPAN EKSPRESI MEF2C DALAM SEL CCRCC

Dalam kajian ini, dua pendekatan berbeza telah digunakan untuk menyenyapkan ekspresi MEF2C dalam sel selanjut ccRCC, iaitu teknologi gangguan CRISPR (CRISPRi) dan teknologi gangguan RNA (RNAi). Pemilihan kedua-dua kaedah ini adalah berdasarkan perbezaan mekanisme tindakan serta keperluan untuk mengesahkan kesan spesifik penyenyapan MEF2C terhadap fenotip sel. Jika kedua-dua kaedah menghasilkan kesan biologi yang sama terhadap pertumbuhan atau ekspresi sasaran gen hiliran, ini menyokong pemerhatian bahawa kesan tersebut benar-benar berpunca daripada penyenyapan MEF2C dan bukannya kesan bukan spesifik dari salah satu kaedah sahaja. Selain itu, CRISPRi menyenyapkan ekspresi MEF2C di peringkat transkripsi, manakala RNAi bertindak di peringkat pasca-transkripsi. Jika hanya satu kaedah digunakan, terdapat kemungkinan bahawa kompensasi selular boleh berlaku, mengaburkan kesan sebenar penyenyapan MEF2C.

3.6.1 Rekabentuk dan pengklonan iMEF2C ke dalam plasmid pKLV-Hygro

Konstruk iMEF2C direka dengan tujuan untuk mengekspresikan dua sgRNA yang menyasarkan MEF2C secara serentak. Konstruk iMEF2C ini diklon atau diligasikan ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Ilustrasi konstruk iMEF2C ditunjuk seperti dalam Rajah 3.7. Konstruk iMEF2C ini mempunyai dua sgRNA yang digunakan untuk memandu dCas9-KRAB. Enzim pencernaan *AarI* direka untuk berada di antara dua jujukan sgRNA dengan enzim pencernaan *BbsI* mengapit keseluruhan konstruk tersebut. Enzim pencernaan *BbsI* digunakan untuk meligasi konstruk iMEF2C ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Sementara itu, enzim pencernaan *AarI* digunakan untuk menyambungkan tambahan fragmen “*sgRNA scaffold-U6 promoter*” ke dalam plasmid pKLV-Hygro yang telah bersambung dengan konstruk iMEF2C. Penyisipan fragmen ini ke dalam plasmid menghasilkan turutan jujukan plasmid bermula dengan U6 promoter, sgMEF2C, *sgRNA scaffold*, U6 promoter, sgMEF2C dan *sgRNA scaffold* yang membolehkan plasmid diekspresi dan ditranslasi oleh dua U6 promoter yang setiap satunya mengekspresi sgMEF2C.



Rajah 3.7

Ilustrasi (A) konstruk iMEF2C yang direka bentuk untuk mengekspresikan dua sgRNA yang menyasarkan MEF2C secara serentak. Konstruk ini mengandungi jujukan sgRNA yang diapit oleh tapak enzim pencernaan *BbsI* untuk membolehkan penyisipan ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Selain itu, tapak enzim *AarI* diletakkan di antara dua sgRNA bagi memudahkan penyisipan fragmen tambahan pada langkah pengklonan seterusnya. (B) fragmen “*sgRNA scaffold-U6 promoter*” yang turut mengandungi tapak enzim *AarI* pada kedua-dua hujungnya. Tapak enzim ini direka bagi memastikan juntaian yang serasi dengan plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-*AarI* semasa proses ligasi, membolehkan penyambungan fragmen ini untuk menghasilkan konstruk akhir pKLV-Hygro_iMEF2C.

Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi iMEF2C berpandukan primer yang telah direka. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.14. PCR dilakukan dengan menggunakan mesin pengitar haba T100.

Jadual 3.15 menunjukkan program PCR yang telah digunakan.

Jadual 3.14 Penyediaan reagen untuk amplifikasi iMEF2C

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
AccuPrime Pfx Supermix	22.5
Templat iMEF2C (1 μM)	2
10 μM Primer hadapan	1
10 μM Primer berbalik	1
Jumlah	26.5

Jadual 3.15 Kondisi PCR untuk amplifikasi iMEF2C

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Pra-penyahasian	95	5 minit	1
Penyahasian	95	15 saat	35
Penyepuhan	65	25 saat	
Pemanjangan	68	30 saat	
Pemanjangan akhir	68	5 minit	1

3.6.2 Penulenan konstruk iMEF2C menggunakan kit *Monarch PCR and DNA Cleanup*

Penulenan konstruk iMEF2C yang telah diamplifikasi dilakukan menggunakan kit *Monarch PCR and DNA Cleanup*. Pertama sekali, turus *Monarch* dimasukkan ke dalam tiub pengumpulan dan sampel dipipet ke dalam turus *Monarch*. Tiub pengumpulan ini diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Selepas aliran terus dibuang, turus dimasukkan semula ke dalam tiub pengumpulan dan 200 μ L penimbal pembasuh DNA dipipet ke atas membran turus. Tiub kemudiannya diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Langkah basuhan ini diulang sebanyak dua kali. Seterusnya, turus dipindahkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL yang steril. Dua puluh mikroliter penimbal elusi DNA dipipet ke atas membran turus dan diinkubasi selama 1 minit. Tiub kemudiannya diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Aliran terus yang berada pada tiub emparan 1.5 mL adalah konstruk iMEF2C yang telah ditulenan. Kepekatan dan ketulenan konstruk iMEF2C yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*.

3.6.3 Pencernaan iMEF2C dan plasmid pKLV-Hygro

Plasmid pengepresan pKLV-Hygro dan konstruk iMEF2C dipotong dengan 10 unit/ μ g enzim pencernaan *BbsI* untuk membentuk juntaian serasi yang membolehkan kedua-dua komponen ini diligasikan. Campuran reagen untuk pencernaan plasmid disediakan seperti dalam Jadual 3.16. Campuran reagen disediakan mengikut cadangan pengeluar dengan syarat pencernaan pada 37 °C selama 2 jam dan 65 °C selama 20 minit dalam mesin pengitar haba T100. Sebelum ligasi, plasmid yang telah dicerna dengan *BbsI* ini dirawat dengan *Antartic Phosphatase* (AnP) bagi menghalang ligasi sendiri. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.17. Campuran tindakbalas ini diinkubasi menggunakan mesin pengitar haba T100 pada suhu 37 °C selama 1 jam dan

kemudiannya diinkubasi pada suhu 70 °C selama 5 minit. Penulenan hasil pencernaan sgMEF2C dilakukan dengan menggunakan kit *Monarch PCR and DNA Cleanup* mengikut prosedur pada seksyen 3.6.2. Manakala, plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna dan dirawat divisualisasi dan dipisahkan menggunakan elektroforesis gel.

Jadual 3.16 Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Plasmid (2 μg)	x
10 unit/ μg <i>BbsI</i>	1
Penimbal <i>Cutsmart</i> (10x)	5
Air bebas RNase dan DNase	x
Jumlah	50

Jadual 3.17 Penyediaan reagen untuk rawatan *Antartic Phosphatase* (AnP)

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Plasmid yang dicerna	50
<i>Antartic phosphatase</i> (5 unit/ μL)	2
Penimbal <i>Antartic phosphatase</i> (10x)	6
Air bebas RNase dan DNase	2
Jumlah	60

3.6.4 Elektroforesis gel dan penulenan plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction*

Keberkesanan pencernaan plasmid pKLV-Hygro dinilai dan divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel. Secara umum, gel agaros 1% disediakan dengan mencampurkan 0.35g serbuk agaros dengan 35 mL penimbal *Tris-Acetate-EDTA* (TAE) 1x. Serbuk agaros ini kemudiannya dilarutkan dalam ketuhar gelombang mikro. Larutan agaros ini kemudian disejukkan di bawah air paip yang mengalir dan diikuti dengan menambah pewarna DNA *Fluorosafe* ke dalam larutan agaros dalam nisbah 1:10000. Larutan agaros ini kemudiannya dicurahkan ke dalam acuan gel dan dibiarkan keras sebelum sikat bergigi dikeluarkan. Seterusnya, gel ditempatkan ke dalam tangki elektroforesis yang mengandungi penimbal TAE 1x. 6x pewarna DNA (*loading dye*) ditambah ke dalam setiap sampel. Seterusnya, setiap sampel dimuatkan ke dalam setiap telaga gel agaros, dan 4 μL penanda DNA 1 kb dimuatkan ke dalam telaga pertama gel. Gel ini dibiarkan dalam arus voltan 120 V selama 20 minit dan kemudian dilihat di

bawah sistem dokumentasi gel *Quantum-ST4* untuk visualisasi DNA. Imej gel ini diambil dan plasmid pKLV-Hygro yang dikehendaki dipotong.

Penulenan plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna pula dilakukan menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction*. Fragmen plasmid pKLV-Hygro yang telah dipotong ditimbang dan dimasukkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL. Selepas itu, 700 μ L penimbal pelarut gel *Monarch* ditambah ke dalam tiub emparan dan diinkubasi pada suhu 50 °C di atas blok termal sehingga gel mencair secara keseluruhan. Turus *Monarch* dimasukkan ke dalam tiub pengumpulan dan sampel dipipet ke dalam turus *Monarch*. Tiub pengumpulan ini diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Selepas aliran terus dibuang, turus dimasukkan semula ke dalam tiub pengumpulan dan 200 μ L penimbal pembasuh DNA dipipet ke atas membran turus. Tiub kemudiannya diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Langkah basuhan ini diulang sebanyak dua kali. Seterusnya, turus dipindahkan ke dalam tiub emparan 1.5 mL yang steril. Dua puluh mikroliter penimbal elusi DNA dipipet ke atas membran turus dan diinkubasi selama 1 minit. Tiub kemudiannya diempar pada kelajuan 12,000 rpm selama 1 minit. Aliran terus yang berada pada tiub emparan 1.5 mL adalah plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna dan dituliskan. Kepekatan dan ketulenan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Plasmid yang telah diekstrak ini seterusnya digunakan dalam penjujukan *Sanger* bagi mengesahkan hasil pencernaan dan kemudian digunakan untuk ligasi bersama konstruk iMEF2C yang telah dicerna dan dituliskan.

3.6.5 Ligasi konstruk iMEF2C dalam plasmid pKLV-Hygro

Konstruk iMEF2C dicerna dan diligasi ke dalam plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna dengan *BbsI* serta dirawat dengan AnP. Proses ligasi ini dilakukan menggunakan *T4 DNA ligase* pada 16 °C dan diinkubasi semalaman, diikuti dengan penyahaktifan haba enzim pada 65 °C selama 10 minit dalam mesin pengitar haba T100. Jadual 3.18 menunjukkan campuran komponen untuk proses ligasi. Jisim minimum selitan DNA dikira menggunakan kalkulator ligasi (<https://nebiocalculator.neb.com>) berdasarkan nisbah selitan DNA kepada plasmid (7:1) dengan parameter yang dinyatakan adalah; panjang DNA sisipan = 110 bp, panjang DNA plasmid = 8118 bp

dan jisim DNA plasmid = 100 ng. Sampel kawalan juga disediakan dengan menggantikan selitan DNA dengan air bebas RNase dan DNase. Plasmid yang telah diklon ini dipanggil pKLV-Hygro_iMEF2C-*AarI*.

Jadual 3.18 Penyediaan reagen untuk ligasi iMEF2C

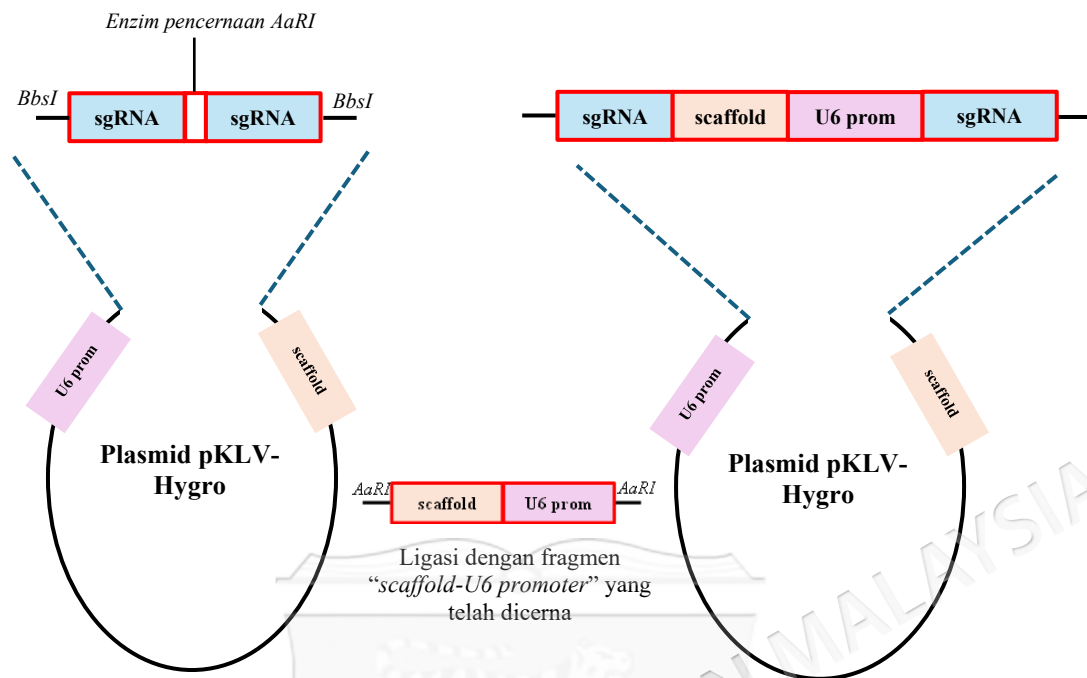
Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Plasmid yang telah dicerna (100ng)	X
Selitan DNA	X
<i>T4 Ligase</i>	1
Penimbal <i>T4 Ligase</i> (10x)	2
Air bebas RNase dan DNase	Ditambah sehingga 20
Jumlah	20

3.6.6 Pencernaan pKLV-Hygro_iMEF2C-*AarI*

Plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-*AarI* dan fragmen “*sgRNA scaffold-U6 promoter*” dicerna dengan menggunakan 10 unit/ μL enzim pencernaan *AarI* seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.3. Pencernaan ini bagi membolehkan plasmid dan fragmen membentuk juntaian yang serasi sebelum diligasi. Sebelum ligasi, plasmid yang telah dicerna dengan *AarI* dirawat dengan *Antartic Phosphatase* (AnP). Campuran reagen bagi proses ini ditunjukkan dalam Jadual 3.17. Hasil pencernaan fragmen dan plasmid pKLV-iMEF2C-*AarI* yang telah dicerna dan dirawat divisualisasi dan dipisahkan menggunakan elektroforesis gel seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Kepekatan dan ketulenan fragmen dan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*.

3.6.7 Ligasi fragmen “*sgRNA scaffold-U6 promoter*” dalam plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-*AarI*

Kemudian, fragmen yang telah dicerna diligasi dan disambung ke dalam plasmid yang telah dipotong dengan *AarI*. Proses ligasi ini dilakukan seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.6.5. Strategi untuk menjana plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C digambarkan dalam Rajah 3.8.



Rajah 3.8

Carta alir strategi pengklonan konstruk iMEF2C ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Langkah pertama melibatkan ligasi konstruk iMEF2C yang telah dicerna ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Seterusnya, plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-AarI yang terhasil dicerna menggunakan enzim *AarI* sebelum fragmen sgRNA scaffold-U6 promoter diligasi ke dalam plasmid tersebut untuk menghasilkan plasmid akhir pKLV-Hygro_iMEF2C yang lengkap.

3.6.8 Transformasi bakteria

Kemudian, plasmid yang telah berjaya diligasi ditransformasi ke dalam bakteria *E.coli* yang kompeten seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.3. Kehadiran fragmen “sgRNA scaffold-U6 promoter” yang berjaya diligasi dalam plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C-AarI seterusnya disahkan menggunakan penjujukan Sanger. Plasmid yang telah diklon ini dipanggil pKLV-Hygro_iMEF2C.

3.6.9 Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC

Penghasilan lentiviral dilakukan dengan menggunakan sel HEK293T. Prosedur untuk eksperimen ini adalah sama seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.5, kecuali 1.5 µg DNA plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C dan 1.5 µg plasmid pKLV-Hygro_NTC (*non-targeting control* - dijana dalam kajian yang lepas) digunakan. Selepas itu, media

yang mengandung partikel lentiviral ditapis dan disimpan pada suhu -80°C sebagai persediaan untuk proses transduksi.

Sel selangar ccRCC_dCas9-KRAB diplatkan pada setiap plat telaga 6 dengan kepadatan 3×10^5 selama 24 jam sebelum transduksi. Sebanyak 150 μL media yang mengandung partikel lentiviral ditambah ke dalam sel dengan kehadiran 8 $\mu\text{g/mL}$ *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Sel ccRCC yang telah berjaya ditransduksi dengan pKLV-Hygro_iMEF2C atau pKLV-Hygro_NTC dipilih menggunakan higromisin 1000 $\mu\text{g/mL}$ untuk menghasilkan sel selangar yang stabil. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandung sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan higromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati. Sel selangar yang telah berjaya ditransduksi diperkenalkan sebagai sel ccRCC_NTC dan sel ccRCC_iMEF2C.

3.6.10 Rekabentuk dan pengklonan shMEF2C

Konstruk shMEF2C dipilih berdasarkan ramalan yang dibuat oleh Fellmann dan rakan-rakan dengan jujukan seperti di Jadual 3.2 dan diklon ke dalam plasmid sGEP (Fellmann et al. 2013). Secara ringkas, konstruk shMEF2C direka untuk mengandung enzim pencernaan *XhoI* di hujung 5' dan *EcoRI* di hujung 3' konstruk tersebut. Konstruk ini diamplifikasi menggunakan primer hadapan *XhoI*-shMEF2C dan primer berbalik *EcoRI*-shMEF2C. Campuran reagen untuk PCR disediakan seperti dalam Jadual 3.19. Seterusnya, tiub PCR diletakkan dalam pengitar haba T100 dengan keadaan program pengkitaran dalam Jadual 3.20.

Jadual 3.19 Penyediaan reagen untuk PCR bagi pengklonan shMEF2C

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Accuprime Pfx	12.5
10 μM primer hadapan	1
10 μM primer berbalik	1
0.1 μM konstruk shMEF2C	1
Air bebas RNase dan DNase	9.5
Jumlah	25

Jadual 3.20 Kondisi program PCR pengklonan shMEF2C

Proses	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Pra-penyahasilan	95	5 minit	1
Penyahasilan	95	15 saat	} 35
Penyepuhan	60	30 saat	
Pemanjangan	68	1 minit	
Pemanjangan terakhir	68	5	1

Konstruk shMEF2C yang telah diampifikasi dianalisis pada gel agaros 1.2% dan saiz konstruk shMEF2C 139 bp telah diperhatikan. Selepas elektroforesis gel, konstruk yang dikehendaki dipotong dan diekstrak menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Kepekatan dan ketulenannya konstruk shMEF2C yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Konstruk shMEF2C yang telah diekstrak seterusnya digunakan untuk kloning dan penjujukan *Sanger*.

3.6.11 Pencernaan konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP

Plasmid sGEP digunakan untuk menyenyapkan ekspresi endogen MEF2C. Konstruk shMEF2C dan plasmid ini dipotong dengan enzim pencernaan yang sama untuk membentuk juntaian yang serasi. Secara ringkas, konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP dicerna dengan enzim pencernaan 10 unit/ μ L *XhoI* dan 10 unit/ μ L *EcoRI*. Campuran reagen disediakan mengikut Jadual 3.21 bagi pencernaan konstruk shMEF2C dan Jadual 3.22 bagi pencernaan plasmid sGEP. Campuran reagen ini diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dan 65 °C selama 20 minit dalam mesin pengitar haba T100. Sebelum ligasi, plasmid sGEP yang telah dicerna dengan *XhoI* dan *EcoRI* dirawat dengan *Antartic Phosphatase* (AnP) mengikut prosedur pada seksyen 3.6.3. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.17. Konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP yang telah dirawat ini divisualisasi menggunakan elektroforesis gel seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP ini kemudiannya dituliskan menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen yang sama. Kepekatan dan ketulenannya konstruk shMEF2C dan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan

spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Plasmid yang telah diekstrak ini seterusnya digunakan untuk ligasi bersama konstruk shMEF2C.

Jadual 3.21 Penyediaan reagen untuk pencernaan konstruk shMEF2C

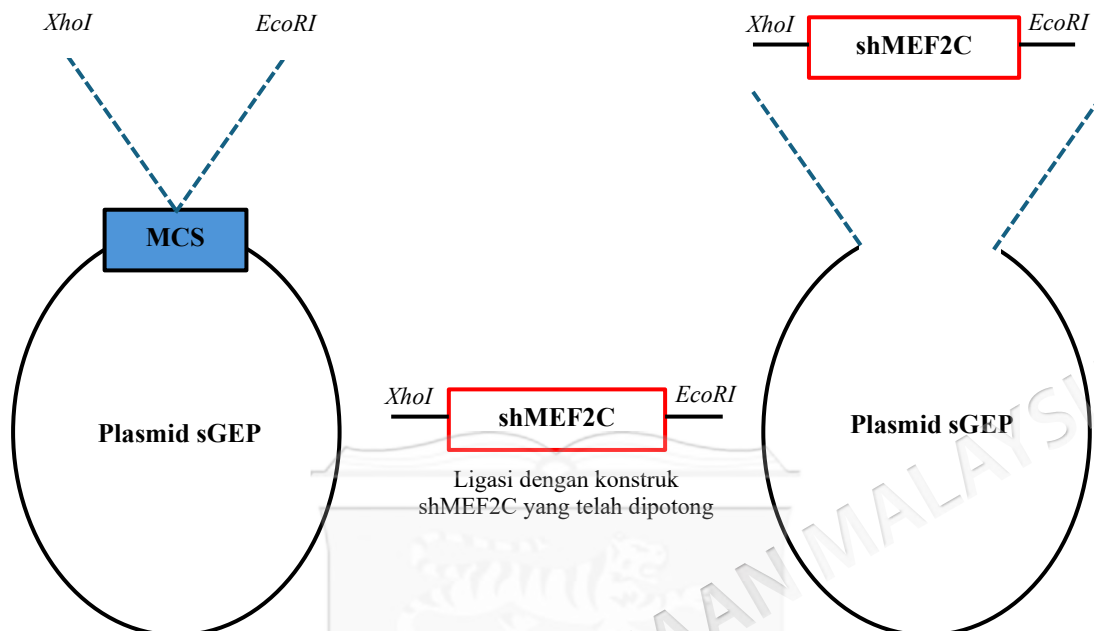
Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Konstruk shMEF2C (1 μg)	X
10 unit/ μL <i>XhoI</i>	1
10 unit/ μL <i>EcoRI</i>	4
Penimbal <i>Cutsmart</i> (10x)	5
Air bebas RNase dan DNase	Ditambah sehingga 50
Jumlah	50

Jadual 3.22 Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid sGEP

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Plasmid sGEP (2 μg)	X
10 unit/ μL <i>XhoI</i>	1
10 unit/ μL <i>EcoRI</i>	4
Penimbal <i>Cutsmart</i> (10x)	5
Air bebas RNase dan DNase	Ditambah sehingga 50
Jumlah	50

3.6.12 Ligasi konstruk shMEF2C dalam plasmid sGEP

Proses ligasi konstruk shMEF2C dan plasmid sGEP yang telah dicerna dilakukan menggunakan *T4 DNA ligase* pada suhu 16 °C dan diinkubasi semalaman, diikuti dengan penyahaktifan haba enzim pada suhu 65 °C selama 10 minit dalam pengitar haba T100. Campuran reagen untuk proses ligasi ini boleh dirujuk dalam Jadual 3.18. Jisim minimum selitan DNA (konstruk shMEF2C) dikira menggunakan kalkulator ligasi (<https://nebiocalculator.neb.com>) berdasarkan nisbah selitan DNA kepada plasmid (7:1) dengan parameter yang dinyatakan adalah; panjang DNA sisipan = 139 bp, panjang DNA plasmid = 8968 bp dan jisim DNA plasmid = 100 ng. Sampel kawalan juga disediakan dengan menggantikan selitan DNA dengan air bebas RNase dan DNase. Strategi untuk menjana plasmid sGEP_shMEF2C digambarkan dalam Rajah 3.9.



Rajah 3.9

Carta alir strategi pengklonan konstruk shMEF2C ke dalam plasmid sGEP. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid sGEP dengan enzim *XhoI* dan *EcoRI*. Seterusnya, konstruk shMEF2C yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid sGEP yang telah dicerna untuk menghasilkan sGEP_shMEF2C.

3.6.13 Transformasi bakteria

Kemudian, plasmid yang telah berjaya diligasi ditransformasi ke dalam bakteria *E.coli* yang kompeten seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.3. Kehadiran konstruk shMEF2C yang berjaya diligasi dalam plasmid sGEP seterusnya disahkan menggunakan penjujukan *Sanger*. Plasmid yang telah diklon ini dipanggil sGEP_shMEF2C.

3.6.14 Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC

Penghasilan lentiviral dilakukan dengan menggunakan sel HEK293T. Prosedur untuk eksperimen ini adalah sama seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.5, kecuali 1.5 µg DNA plasmid sGEP_shMEF2C dan 1.5 µg plasmid kosong sGEP (NTC)

digunakan. Selepas itu, media yang mengandungi partikel lentiviral ditapis dan disimpan pada suhu -80°C sebagai persediaan untuk proses transduksi.

Sel selanjar 786-M1A diplatkan pada setiap plat telaga 6 dengan kepadatan 3×10^5 selama 24 jam sebelum transduksi. Sebanyak 150 μL media yang mengandungi partikel lentiviral ditambah ke dalam sel dengan kehadiran 8 $\mu\text{g/mL}$ *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Sel 786-M1A yang telah berjaya ditransduksi dengan plasmid sGEP_shMEF2C atau plasmid kosong sGEP (NTC) dipilih menggunakan puromisin 4 $\mu\text{g/mL}$ untuk menghasilkan sel selanjar yang stabil. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandungi sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan puromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati. Sel selanjar yang telah berjaya ditransduksi diperkenalkan sebagai sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_shMEF2C.

3.6.15 Analisis tahap ekspresi gen MEF2C dan KLF6

Penentuan kadar ekspresi gen MEF2C dan KLF6 selepas penyenyapan ekspresi endogen *MEF2C* dengan menggunakan teknik CRISPRi dan RNAi dijalankan menggunakan teknik qPCR seperti yang telah diterangkan pada seksyen 3.4.5.

3.6.16 Analisis tahap isyarat MEF2C pada lokus *KLF6* (ChIP-qPCR)

Penentuan tahap isyarat MEF2C selepas penyenyapan ekspresi endogen *MEF2C* pada kawasan promotor *KLF6* dijalankan menggunakan teknik ChIP-qPCR seperti yang telah diterangkan pada seksyen 3.4.6. Eksperimen ini menggunakan primer Ch-qPCR MEF2C Bind kehadapan dan primer Ch-qPCR MEF2C Bind berbalik. Senarai antibodi yang digunakan adalah seperti dalam Jadual 3.23.

Jadual 3.23 Antibodi yang digunakan dalam MEF2C ChIP-qPCR

Antibodi	Pengeluar dan nombor katalog	Protein sasaran
<i>Recombinant Anti-MEF2C antibody – ChIP Grade</i>	AB211493 (Abcam, UK)	MEF2C
<i>Rabbit IgG, polyclonal – Isotype Control</i>	AB37415 (Abcam, UK)	IgG

3.7 PENGEKSPRESAN EKSOGENUS *MEF2C*

3.7.1 Penggandaan dan pengklonan jujukan MEF2C dan FLAG MEF2C

Bagi menyiasat kefungsi biologi MEF2C dalam ccRCC, jujukan yang mengekod protein MEF2C (CDS: *coding sequence*) telah diperkenalkan ke dalam sel 786-M1A_shMEF2C. Plasmid tetO-MEF2C telah diperolehi daripada repositori plasmid Addgene dan digunakan sebagai templat bagi mengamplifikasi jujukan MEF2C CDS. Secara ringkas, teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi MEF2C CDS daripada plasmid ini berpandukan primer kehadapan *XhoI*_MEF2C CDS dan primer berbalik *XbaI*_MEF2C CDS seperti yang tertera pada Jadual 3.2. Primer kehadapan telah direka untuk mempunyai enzim pencernaan *XhoI* sebelum kodon pemula ATG, manakala primer berbalik direka untuk mempunyai enzim pencernaan *XbaI* selepas kodon penghentian TAA. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.24. PCR dilakukan dengan menggunakan mesin pengitar haba T100. Jadual 3.25 menunjukkan program PCR yang telah digunakan. MEF2C CDS yang telah diamplifikasi dianalisis pada gel agaros 1.2% dan saiz produk PCR 1422 bp telah diperhatikan. Selepas elektroforesis gel, konstruk MEF2C CDS yang dikehendaki dipotong dan diekstrak menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Kepekatan dan ketulenan konstruk MEF2C CDS yang

diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*.

Jadual 3.24 Penyediaan reagen untuk amplifikasi MEF2C CDS

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
<i>AccuPrime Pfx Supermix</i>	22.5
Templat plasmid (50 ng)	0.18
10 μM Primer hadapan	1
10 μM Primer berbalik	1
Air bebas RNase dan DNase	0.32
Jumlah	25

Jadual 3.25 Kondisi PCR untuk amplifikasi MEF2C CDS

Proses	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Masa	Kitaran
Pra-penyahaslian	95	5 minit	1
Penyahaslian	95	15 saat	35
Penyepuhan	62	25 saat	
Pemanjangan	68	30 saat	
Pemanjangan akhir	68	5 minit	1

3.7.2 Pencernaan MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro

Plasmid pLVX-Hygro digunakan untuk mengekspresi ekspresi eksogenus *MEF2C*. Konstruk MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro ini dicerna dengan enzim pencernaan yang sama untuk membentuk juntaian yang serasi. Secara ringkas, konstruk MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro dicerna dengan enzim pencernaan 10 unit/ μL *XhoI* dan 10 unit/ μL *XbaI*. Campuran reagen disediakan mengikut Jadual 3.26 bagi pencernaan konstruk MEF2C CDS dan Jadual 3.27 bagi pencernaan plasmid pLVX-Hygro. Campuran reagen ini diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam dan 65 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 minit dalam mesin pengitar haba T100. Sebelum ligasi, plasmid pLVX-Hygro yang telah dicerna dengan *XhoI* dan *XbaI* dirawat dengan *Antartic Phosphatase* (AnP) mengikut prosedur pada seksyen 3.6.3. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.17. Konstruk MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro yang telah dirawat ini divisualisasi menggunakan elektroforesis gel seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Konstruk MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro ini kemudiannya dituliskan menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen yang sama. Kepekatan dan ketulenan konstruk MEF2C CDS dan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan

spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Plasmid yang telah diekstrak ini seterusnya digunakan untuk ligasi bersama konstruk MEF2C CDS.

Jadual 3.26 Penyediaan reagen untuk pencernaan konstruk shMEF2C

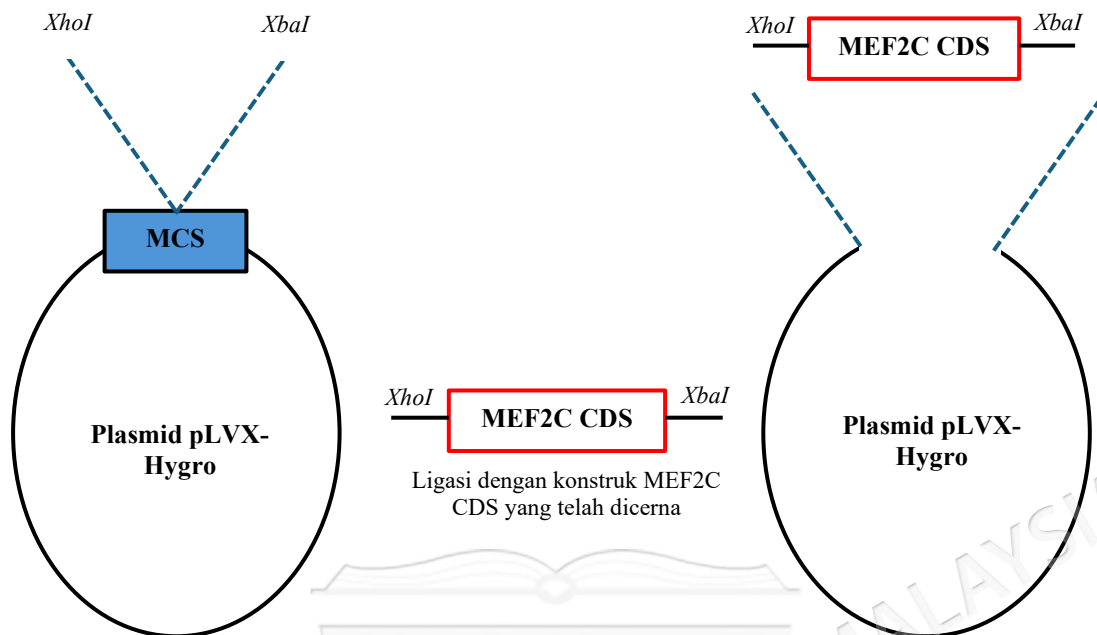
Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Konstruk MEF2C CDS (1 μg)	X
10 unit/ μL <i>XhoI</i>	1
10 unit/ μL <i>XbaI</i>	4
Penimbal <i>Cutsmart</i> (10x)	5
Air bebas RNase dan DNase	Ditambah sehingga 50
Jumlah	50

Jadual 3.27 Penyediaan reagen untuk pencernaan plasmid pLVX-Hygro

Komponen	Isipadu per tindakbalas, μL
Plasmid pLVX-Hygro (2 μg)	X
10 unit/ μL <i>XhoI</i>	1
10 unit/ μL <i>XbaI</i>	1
Penimbal <i>Cutsmart</i> (10x)	5
Air bebas RNase dan DNase	Ditambah sehingga 50
Jumlah	50

3.7.3 Ligasi MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro

Proses ligasi konstruk MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Hygro yang telah dicerna dilakukan menggunakan *T4 DNA ligase* pada suhu 16 °C dan diinkubasi semalaman, diikuti dengan penyahaktifan haba enzim pada suhu 65 °C selama 10 minit dalam pengitar haba T100. Campuran reagen untuk proses ligasi ini boleh dirujuk dalam Jadual 3.18. Jisim minimum selitan DNA (konstruk MEF2C CDS) dikira menggunakan kalkulator ligasi (<https://nebiocalculator.neb.com>) berdasarkan nisbah selitan DNA kepada plasmid (7:1) dengan parameter yang dinyatakan adalah; panjang DNA sisipan = 1422 bp, panjang DNA plasmid = 8102 bp dan jisim DNA plasmid = 100 ng. Sampel kawalan juga disediakan dengan menggantikan selitan DNA dengan air bebas RNase dan DNase. Strategi untuk menjana plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS digambarkan dalam Rajah 3.10.



Rajah 3.10

Carta alir strategi pengklonan konstruk MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Hygro. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid pLVX-Hygro dengan enzim *XhoI* dan *XbaI*. Seterusnya, konstruk MEF2C CDS yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid pLVX-Hygro yang telah dicerna untuk menghasilkan pLVX-Hygro_MEF2C CDS.

3.7.4 Transformasi bakteria

Kemudian, plasmid yang telah berjaya diligasi ditransformasi ke dalam bakteria *E.coli* yang kompeten seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.3. Kehadiran konstruk MEF2C CDS yang berjaya diligasi dalam plasmid pLVX-Hygro seterusnya disahkan menggunakan penjujukan *Sanger*. Plasmid yang telah diklon ini dipanggil pLVX-Hygro_MEF2C CDS.

3.7.5 Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC

Penghasilan lentiviral dilakukan dengan menggunakan sel HEK293T. Prosedur untuk eksperimen ini adalah sama seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.5, kecuali 1.5 µg DNA plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS dan 1.5 µg plasmid kosong pLVX-Hygro (NTC) digunakan. Selepas itu, media yang mengandungi partikel lentiviral ditapis dan disimpan pada suhu -80 °C sebagai persediaan untuk proses transduksi.

Sel selanjara 786-M1A_shMEF2C diplatkan pada setiap plat telaga 6 dengan kepadatan 3×10^5 selama 24 jam sebelum transduksi. Sebanyak 150 μL media yang mengandungi partikel lentiviral ditambah ke dalam sel dengan kehadiran 8 $\mu\text{g/mL}$ *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Sel 786-M1A yang telah berjaya ditransduksi dengan plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS atau plasmid kosong pLVX-Hygro (NTC) dipilih menggunakan higromisin 1000 $\mu\text{g/mL}$ untuk menghasilkan sel selanjara yang stabil. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandungi sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan higromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati. Sel selanjara yang telah berjaya ditransduksi diperkenalkan sebagai sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_MEF2C CDS.

3.7.6 Penghubungan penanda FLAG dalam MEF2C CDS

Teknik PCR digunakan untuk menghubungkan 3x penanda FLAG dalam MEF2C CDS berpanduan primer terhadap *XhoI*-FLAG MEF2C CDS dan primer berbalik *XbaI*_MEF2C CDS seperti yang tertera pada Jadual 3.2. Primer hadapan telah direka untuk mempunyai enzim pencernaan *XhoI* dan 3x penanda FLAG sebelum kodon mula CDS, manakala primer berbalik direka untuk mempunyai enzim pencernaan *XbaI* selepas kodon henti. FLAG MEF2C CDS yang telah diamplifikasi dari plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS ini diklon ke dalam plasmid pLVX-Puro.

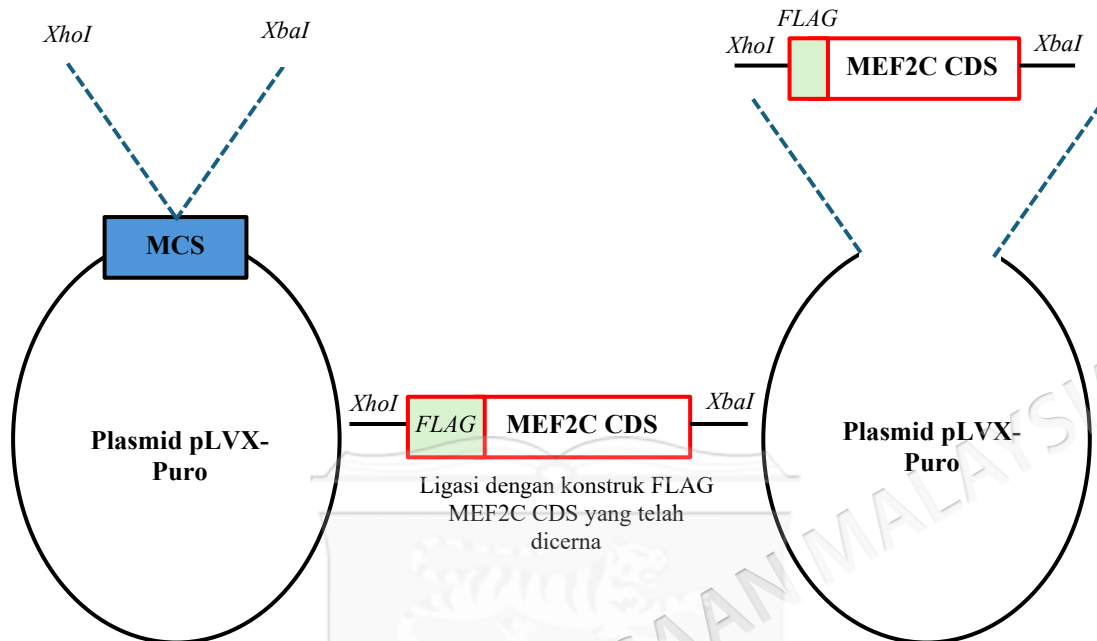
Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.24. PCR dilakukan dengan menggunakan mesin pengitar haba T100. Jadual 3.25 menunjukkan program PCR yang telah digunakan. FLAG MEF2C CDS yang telah diamplifikasi dianalisis pada gel agaros 1.2% dan saiz produk PCR 1488 bp telah diperhatikan. Selepas elektroforesis gel, konstruk FLAG MEF2C CDS yang dikehendaki dipotong dan diekstrak menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Kepekatan dan ketulenan konstruk FLAG MEF2C CDS yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*.

3.7.7 Pencernaan konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro

Plasmid pLVX-Puro digunakan untuk mengekspresi ekspresi eksogenus MEF2C. Konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro ini dicerna dengan enzim pencernaan yang sama untuk membentuk juntaian yang serasi. Secara ringkas, konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro dicerna dengan enzim pencernaan 10 unit/ μ L *XhoI* dan 10 unit/ μ L *XbaI*. Campuran reagen disediakan mengikut Jadual 3.26 bagi pencernaan konstruk FLAG MEF2C CDS dan Jadual 3.27 bagi pencernaan plasmid pLVX-Puro. Campuran reagen ini diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dan 65 °C selama 20 minit dalam mesin pengitar haba T100. Sebelum ligasi, plasmid pLVX-Puro yang telah dicerna dengan *XhoI* dan *XbaI* dirawat dengan *Antartic Phosphatase* (AnP) mengikut prosedur pada seksyen 3.6.3. Campuran bagi tindakbalas ini adalah seperti dalam Jadual 3.17. Konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro yang telah dirawat ini divisualisasi menggunakan elektroforesis gel seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.6.4. Konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro ini kemudiannya dituliskan menggunakan kit *Monarch DNA Gel Extraction* seperti yang diterangkan dalam seksyen yang sama. Kepekatan dan ketulenan konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid yang diekstrak ditentukan secara spektrofotometri menggunakan spektrofotometer *NanoDrop 2000C*. Plasmid yang telah diekstrak ini seterusnya digunakan untuk ligasi bersama konstruk FLAG MEF2C CDS.

3.7.8 Ligasi FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro

Proses ligasi konstruk FLAG MEF2C CDS dan plasmid pLVX-Puro yang telah dicerna dilakukan menggunakan *T4 DNA ligase* pada suhu 16 °C dan diinkubasi semalaman, diikuti dengan penyahaktifan haba enzim pada suhu 65 °C selama 10 minit dalam pengitar haba T100. Campuran reagen untuk proses ligasi ini boleh dirujuk dalam Jadual 3.18. Jisim minimum selitan DNA (konstruk FLAG MEF2C CDS) dikira menggunakan kalkulator ligasi (<https://nebiocalculator.neb.com>) berdasarkan nisbah selitan DNA kepada plasmid (7:1) dengan parameter yang dinyatakan adalah; panjang DNA sisipan = 1488 bp, panjang DNA plasmid = 8102 bp dan jisim DNA plasmid = 100 ng. Sampel kawalan juga disediakan dengan menggantikan selitan DNA dengan air bebas RNase dan DNase. Strategi untuk menjana plasmid pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS digambarkan dalam Rajah 3.11.



Rajah 3.11

Strategi pengklonan konstruk FLAG MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Puro. Carta alir strategi pengklonan konstruk FLAG MEF2C CDS ke dalam plasmid pLVX-Puro. Langkah pertama melibatkan pencernaan plasmid pLVX-Puro dengan enzim *XhoI* dan *XbaI*. Seterusnya, konstruk FLAG MEF2C CDS yang telah dicerna dengan enzim yang sama diligasi dengan plasmid pLVX-Puro yang telah dicerna untuk menghasilkan pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS.

3.7.9 Transformasi bakteria

Kemudian, plasmid yang telah berjaya diligasi ditransformasi ke dalam bakteria *E.coli* yang kompeten seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.3. Kehadiran konstruk FLAG MEF2C CDS yang berjaya diligasi dalam plasmid pLVX-Puro seterusnya disahkan menggunakan penjujukan *Sanger*. Plasmid yang telah diklon ini dipanggil pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS.

3.7.10 Penghasilan partikel lentiviral dan transduksi ke dalam sel ccRCC

Penghasilan lentiviral dilakukan dengan menggunakan sel HEK293T. Prosedur untuk eksperimen ini adalah sama seperti yang telah diterangkan dalam seksyen 3.5.5, kecuali 1.5 µg DNA plasmid pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS dan 1.5 µg plasmid kosong

pLVX-Puro (NTC) digunakan. Selepas itu, media yang mengandungi partikel lentiviral ditapis dan disimpan pada suhu -80 °C sebagai persediaan untuk proses transduksi.

Sel selanjar 786-M1A_shMEF2C diplatkan pada setiap plat telaga 6 dengan kepadatan 3×10^5 selama 24 jam sebelum transduksi. Sebanyak 150 μ L media yang mengandungi partikel lentiviral ditambah ke dalam sel dengan kehadiran 8 μ g/mL *Polybrene*. Selepas diinkubasi semalaman, sel yang telah ditransduksi dibasuh dengan 1x PBS sebanyak dua kali dan ditambah dengan media segar. Sel kemudian diinkubasi lagi semalaman sebelum melalui proses rawatan antibiotik untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi. Sel 786-M1A yang telah berjaya ditransduksi dengan plasmid pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS atau plasmid kosong pLVX-Puro (NTC) dipilih menggunakan puromisin 4 μ g/mL untuk menghasilkan sel selanjar yang stabil. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandungi sel yang tidak ditransduksi juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan puromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati. Sel selanjar yang telah berjaya ditransduksi diperkenalkan sebagai sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_FLAG MEF2C CDS.

3.7.11 Analisis tahap isyarat MEF2C dan FLAG pada kawasan promoter *KLF6* (ChIP-qPCR/FLAG ChIP-qPCR)

Penentuan tahap isyarat MEF2C dan FLAG selepas pengekspresan eksogenus *MEF2C* pada kawasan promoter *KLF6* dijalankan menggunakan teknik ChIP-qPCR seperti yang telah diterangkan pada seksyen 3.4.6. Senarai antibodi yang digunakan dalam eksperimen ini ditunjukkan dalam Jadual 3.28.

Jadual 3.28 Antibodi yang digunakan dalam MEF2C ChIP-qPCR dan FLAG ChIP-qPCR

Antibodi	Pengeluar dan nombor katalog	Protein sasaran
<i>Monoclonal Anti-FLAG® M2 antibody</i>	SIG-F1804 (Sigma-Aldrich, AS)	FLAG
<i>Rabbit IgG, polyclonal – Isotype Control</i>	AB37415 (Abcam, UK)	IgG
<i>Recombinant Anti-MEF2C antibody – ChIP Grade</i>	AB211493 (Abcam, UK)	MEF2C

3.8 PENILAIAN KESAN FENOTIP PENYENYAPAN EKSPRESI FAKTOR TRANSKRIPSI MEF2C DALAM MODEL IN VITRO CCRCC

3.8.1 Asai migrasi sel

Asai migrasi sel adalah asai bagi menentukan kemampuan proliferasi sel. Sel perlu mencapai tahap konfluensi 100% sebelum sel ditoreh secara menegak bagi membentuk ruangan untuk membolehkan sel bermigrasi. Untuk mencapai tahap konfluensi ini, sebanyak 8×10^5 sel 786-M1A_iMEF2C dan 786-M1A_NTC diplatkan ke dalam plat telaga 6. Selepas 24 jam, sel yang melekat pada plat telaga ditoreh dengan menggunakan 200 μ L tip pipet bagi menghasilkan ruangan yang telah dijelaskan di atas. Kemudian media pertumbuhan dibuang dan sel dibilas dengan 1 mL 1x PBS sebanyak dua kali. Pembilasan ini adalah penting untuk membuang sel yang tertanggal daripada permukaan telaga akibat torehan yang dilakukan. Media pertumbuhan baru kemudiannya ditambah dan jarak penyembuhan luka atau migrasi sel direkodkan setiap 4 jam selama 12 jam dengan menggunakan mikroskop *Nikon TS100*. Perisian ImageJ digunakan untuk mengukur jarak luka dan peratusan migrasi sel dikira menggunakan formula berikut:

Peratusan migrasi sel (%)

$$= \frac{\text{jarak luka (0 jam)} - \text{jarak luka (fasa waktu)}}{\text{jarak luka (0 jam)}} \times 100\%$$

3.8.2 Asai viabiliti sel menggunakan perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus*

Kadar viabiliti sel selanjara ccRCC yang telah mengalami penyenyapan MEF2C dinilai dengan menggunakan dua jenis perencat kimia yang diluluskan secara klinikal iaitu perencat kimia angiogenesis *sunitinib* dan perencat kimia mTOR *everolimus*. Sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_iMEF2C dirawat dengan perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus* dengan menggunakan reagen asai viabiliti sel MTT. Sebagai permulaan, perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus* disediakan terlebih dahulu. Serbuk *sunitinib* dan *everolimus* dilarutkan dalam DMSO untuk menghasilkan stok 10 mM. Stok ini kemudiannya dilarutkan bersama DMSO untuk menghasilkan larutan kerja 5 μ M dan

10 μM . Larutan kerja ini dilarutkan sekali lagi dengan nisbah 1:1000 bersama media untuk menghasilkan kepekatan akhir 5 nM dan 10 nM.

Rawatan *sunitinib* dan *everolimus* ke atas dua kumpulan sel ccRCC ini dilakukan secara berasingan. Pertama sekali, asai ini dilakukan dengan memplatkan sebanyak 0.5×10^3 sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C dalam 200 μL media pertumbuhan di dalam plat telaga 96. Bilangan sel ccRCC yang diplatkan ini telah melalui proses pengoptimuman. Sel selanjar ccRCC yang diplatkan ini dikultur semalaman bagi mencapai konfluensi 80% sebelum rawatan *sunitinib* atau *everolimus* dijalankan. Pada keesokan harinya, media pertumbuhan dibuang dan larutan kerja perencat kimia ditambah ke atas sel. Selain itu, media baru yang dicampur bersama DMSO juga ditambah ke atas sel. Sel diinkubasi selama 72 jam.

Selepas 72 jam, reagen MTT disediakan dengan melarutkan 5 mg reagen MTT dalam 1 mL 1x PBS untuk menghasilkan stok 5 mg/mL. Seterusnya, larutan kerja bagi setiap telaga yang mengandungi 30 μL media tanpa serum dan 30 μL stok MTT telah disediakan mengikut bilangan telaga yang diperlukan. Media daripada setiap sel yang dirawat dibuang dan diganti dengan 60 μL larutan kerja. Tiga telaga larutan kerja tanpa sel telah disediakan sebagai kawalan kosong. Plat telaga 96 ini kemudiannya diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37 °C dengan atmosfera lembab 5 % CO_2 terlindung daripada cahaya. Selepas 3 jam, 60 μL DMSO dipipet ke dalam setiap telaga dan digoncang perlahan di atas mesin penggoncang mendatar selama 15 minit. Bacaan serap diukur pada ketumpatan optik 590 nm menggunakan mikroplat *Varioskan Flash*.

Sebagai permulaan, tiga telaga larutan kerja tanpa sel telah disediakan sebagai kawalan kosong. Setiap kumpulan rawatan mempunyai tiga telaga. Pengiraan bermula dengan menolak bacaan purata kawalan kosong daripada setiap bacaan telaga rawatan untuk membuang latar belakang gelombang serapan yang tidak diinginkan. Kemudiannya bacaan sel yang dirawat dengan perencat kimia direlatifkan kepada bacaan sel yang dirawat dengan DMSO. Pengiraan viabiliti sel dikira menggunakan formula:

$$\text{Viabiliti sel (\%)} = \frac{(\text{Bacaan sel yang dirawat})}{(\text{Bacaan sel NTC yang dirawat dengan DMSO})} \times 100\%$$

3.8.3 Asai pembentukan koloni

Asai pembentukan koloni adalah asai untuk menentukan kemampuan satu sel tunggal untuk bertumbuh dan membentuk koloni sel. Eksperimen ini bermula dengan memplatkan sebanyak 1×10^3 sel selanjara 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C di dalam setiap plat telaga 6 dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama tujuh hari untuk membenarkan pembentukan koloni. Ketika proses tripsinisasi, sel perlu diampai dengan teliti bagi menghasilkan ampaian sel tunggal. Langkah penetapan, pewarnaan dan bacaan serapan larutan pewarna dilakukan pada hari ketujuh.

Selepas tujuh hari, media dibuang dengan cara aspirasi dan sel dibilas dengan 1 mL 1x PBS sebanyak dua kali. Larutan PBS kemudiannya dibuang dan sel ditetapkan dengan 500 μ L campuran 10% metanol dan 10% asid asetik dengan nisbah 1:1. Plat telaga 6 ini diletakkan di atas penggoncang mendatar selama 20 minit pada suhu bilik. Koloni kemudian diwarnakan dengan 500 μ L larutan pewarna kristal ungu dan plat telaga 6 ini diletakkan semula di atas penggoncang mendatar selama 30 minit pada suhu bilik. Larutan pewarna kristal ungu yang tidak melekat kemudian dibuang dan sel dibilas dengan air paip yang mengalir. Plat telaga 6 ditempatkan di dalam ketuhar pengering sehingga kering.

Gambar koloni kemudian direkod dengan menggunakan mesin sistem pengimejan *ChemiDoc MP*. Bagi mengambil bacaan serapan larutan pewarna kristal ungu, 600 μ L 10% asid asetik ditambah ke dalam setiap telaga dan plat digoncang selama 10 minit untuk mengelusi larutan pewarna. Dua ratus mikroliter daripada larutan pewarna yang dielusi dipindahkan kepada plat telaga 96 yang jernih dan kemudian bacaan serapan diukur pada 590 nm menggunakan mesin pembaca mikroplat *Varioskan Flash*. Data dinormalkan kepada bacaan serapan sel kawalan and dikalikan dengan 100% seperti formula dibawah:

$$\text{Serapan relatif (\%)} = \frac{(\text{Bacaan sel 786M1A_iMEF2C})}{(\text{Bacaan sel NTC})} \times 100\%$$

3.9 ANALISIS STATISTIK

Semua eksperimen utama dilakukan sebanyak tiga kali melainkan akan dijelaskan pada petunjuk rajah. Data dilaporkan sebagai nilai purata $\pm$ sisihan piawai (SD). Ujian T telah digunakan untuk menganalisis perbezaan signifikan antara dua kumpulan dan Anova sehala digunakan untuk menganalisis perbezaan signifikan antara tiga kumpulan atau lebih. Dalam semua analisis, nilai $P < 0.05$ dianggap signifikan secara statistik. Semua analisis statistik dilaksanakan menggunakan perisian GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., USA).



BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 PERANAN BRD4 DAN P300 DALAM MENYOKONG PENGALAK SUPER *KLF6*

KLF6 adalah pro-onkogen yang memainkan peranan penting dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan sel ccRCC. Secara kefungsiannya, KLF6 bertindak sebagai elemen pengawalaturan hulu yang mengaruh transkripsi gen PDGF β yang seterusnya memacu peningkatan pembentukan saluran darah baharu (angiogenesis) dan mengaktifkan tapak laluan isyarat mTORC1 secara hiper. Kedua-dua mekanisme molekul ini adalah penting dalam patogenesis dan perkembangan kanser renal. Selain itu, tapak laluan isyarat mTORC1 adalah komponen penting dalam pengawalaturan proses metabolisme dan homeostasis lipid dalam sel. Secara kolektifnya, KLF6 adalah faktor transkripsi utama yang terletak di tengah tapak laluan yang terlibat dalam mengawal atur dan menghubungkan kesemua ciri khas ccRCC yang dinyatakan di atas (Abuhamad et al. 2023; Syafruddin et al. 2019).

Selain itu, tahap ekspresi gen KLF6 yang tinggi di dalam sel ccRCC adalah disebabkan oleh kehadiran penggalak super yang besar dan teguh di hulu dan juga hiliran lokus gen ini. Terdapat pelbagai komponen epigenetik yang mengawal atur pembentukan dan pengekal landskap penggalak super. Antara protein yang penting dan dikaji dengan meluas dalam memahami ciri dan fungsi penggalak super di dalam kanser adalah BRD4 dan P300. Namun begitu, penglibatan protein BRD4 dan P300 dalam mengawal atur fungsi penggalak super *KLF6* dalam sel ccRCC masih belum dikaji secara komprehensif. Oleh yang demikian, objektif spesifik pertama kajian ini adalah untuk mengukur kesan perencatan BRD4 dan P300 ke atas isyarat H3K27ac di lokus penggalak super gen KLF6 dan pengaktifan transkripsi gen ini dalam sel selanjara ccRCC.

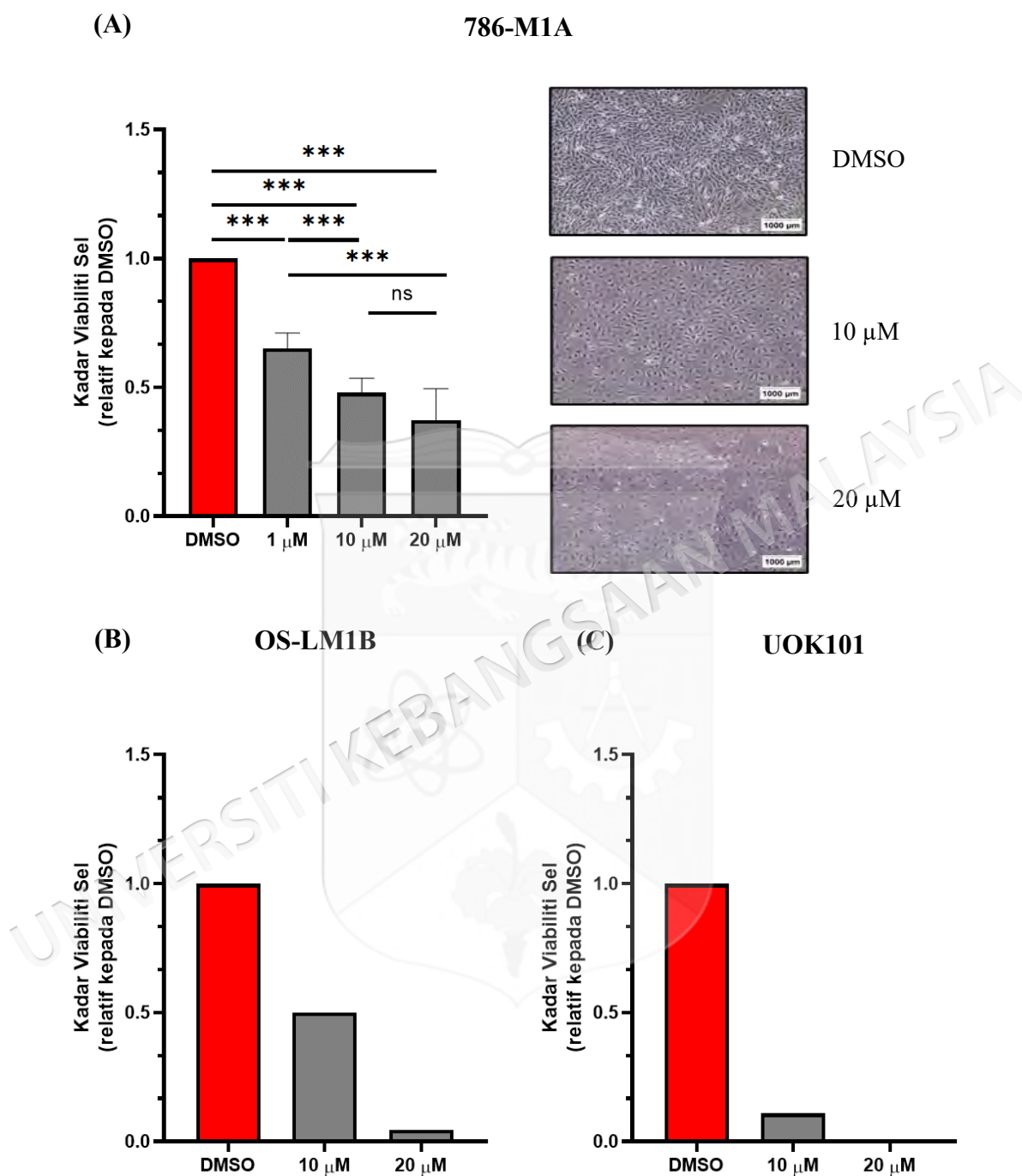
Bagi mencapai objektif ini, protein BRD4 disasarkan dengan menggunakan perencat kimia JQ1. Manakala protein P300 pula disasarkan dengan menggunakan perencat kimia A-485. Sebelum asai untuk mengukur tahap ekspresi gen KLF6 dan isyarat H3K27ac apabila kedua protein ini disasarkan, kadar viabiliti atau pertumbuhan sel ccRCC yang dirawat dengan JQ1 dan A-485 dinilai terlebih dahulu.

4.1.1 Penilaian tahap viabiliti sel ccRCC yang dirawat dengan JQ1 dan A-485

Kadar viabiliti sel ccRCC terhadap JQ1 dan A-485 ditentukan dengan merawat sel ccRCC ini dengan dos kepekatan yang meningkat selama 72 jam. Tempoh rawatan selama 72 jam kebiasaannya digunakan dalam eksperimen melibatkan viabiliti sel untuk melihat kesan hiliran. Bagi eksperimen rawatan JQ1, sel selanjar ccRCC 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101 dirawat dengan tiga kepekatan yang berbeza iaitu 1 μ M, 10 μ M dan 20 μ M. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO adalah kumpulan kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia JQ1. Asai yang telah dijalankan mendapati bahawa kadar pertumbuhan sel 786-M1A yang dirawat dengan JQ1 mengalami penurunan yang signifikan berbanding sel kawalan (yang dirawat dengan DMSO).

Selain itu, kerentanan sel 786-M1A terhadap JQ1 meningkat pada tahap kepekatan yang lebih tinggi. Kepekatan 20 μ M JQ1 mencatatkan penurunan viabiliti paling ketara iaitu kira-kira 60% berbanding dengan sel kawalan (Rajah 4.1A). Asai viabiliti yang sama juga dijalankan ke atas sel OS-LM1B dan UOK101 (Rajah 4.1B dan Rajah 4.1C). Rawatan JQ1 ke atas kedua-dua sel ini menunjukkan peningkatan kerentanan sel selari dengan tahap kepekatan yang lebih tinggi. Kerentanan sel OS-LM1B terhadap JQ1 pada kepekatan 10 μ M mengalami penurunan viabiliti sebanyak 50% manakala kerentanan sel UOK101 terhadap JQ1 mengalami penurunan viabiliti sebanyak 90% berbanding dengan sel kawalan. Sel OS-LM1B dan UOK101 yang dirawat dengan kepekatan dos 20 μ M JQ1 menunjukkan tahap kerentanan yang tinggi berbanding sel 786-M1A. Menariknya, rawatan 20 μ M JQ1 ke atas sel UOK101 mencatatkan penurunan viabiliti sehingga 100%. Pemerhatian daripada eksperimen ini menunjukkan bahawa penyasaran aktiviti BRD4 dengan menggunakan JQ1 menyebabkan penurunan kadar viabiliti atau pertumbuhan sel ccRCC.

Kadar viabiliti sel ccRCC selepas rawatan JQ1



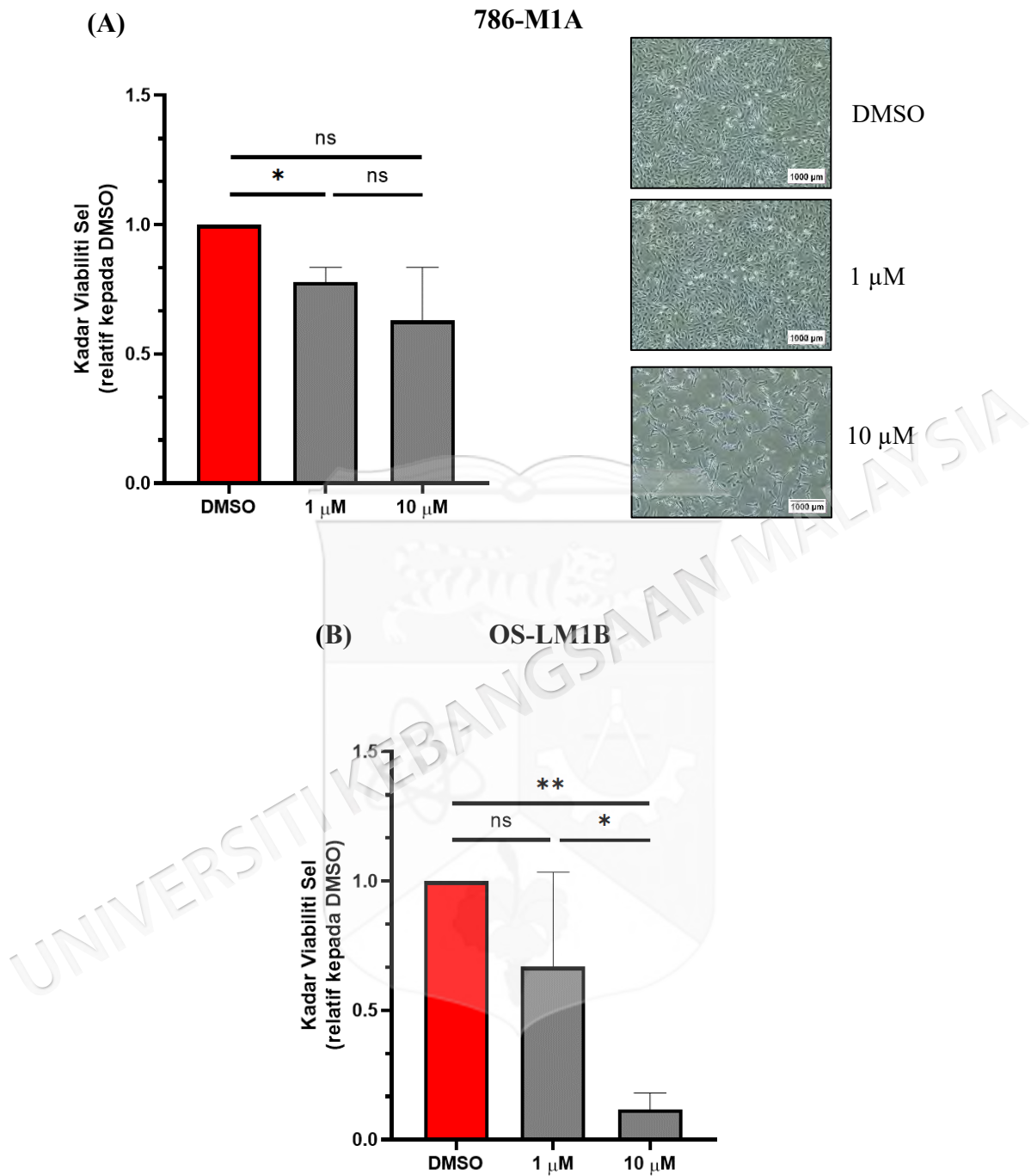
Rajah 4.1

Kesan rawatan JQ1 ke atas viabiliti sel ccRCC selepas 72 jam (A) 786-M1A, magnifikasi 4X (B) OS-LM1B dan (C) UOK101. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B dan UOK101 telah dilakukan sebanyak sekali. $ns > 0.05$, $***P \leq 0.0005$, ANOVA sehalu.

Seterusnya, sel selanjar ccRCC 786-M1A dan OS-LM1B dirawat dengan perencat kimia A-485. Kedua-dua sel ccRCC ini dirawat selama 72 jam dengan dua kepekatan yang berbeza iaitu 1 μM dan 10 μM . Tempoh rawatan selama 72 jam kebiasaannya digunakan dalam eksperimen melibatkan viabiliti sel untuk melihat kesan hiliran. Sama seperti JQ1, sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia A-485. Rawatan A-485 ke atas sel 786-M1A mencatatkan peningkatan tahap kerentanan sel selari dengan pertambahan kepekatan A-485.

Rawatan 10 μM A-485 ke atas sel 786-M1A merekodkan penurunan tahap viabiliti sel sebanyak kira-kira 40% berbanding sel kawalan (Rajah 4.2A). Akan tetapi penurunan viabiliti sel ini tidak signifikan. Manakala rawatan 1 μM A-485 ke atas sel 786-M1A menunjukkan penurunan tahap viabiliti kira-kira sebanyak 20%. Tambahan pula, asai viabiliti yang sama juga dijalankan ke atas sel OS-LM1B. Kepekatan 10 μM A-485 ke atas sel OS-LM1B mencatatkan penurunan tahap viabiliti sebanyak 90% berbanding sel kawalan. Kadar viabiliti sel OS-LM1B yang dirawat dengan 1 μM A-485 turut mengalami penurunan sebanyak 30% (Rajah 4.2B). Pemerhatian daripada eksperimen ini menunjukkan bahawa penyasaran aktiviti P300 dengan menggunakan A-485 menyebabkan penurunan tahap viabiliti atau pertumbuhan sel ccRCC.

Kadar viabiliti sel ccRCC selepas rawatan A-485



Rajah 4.2

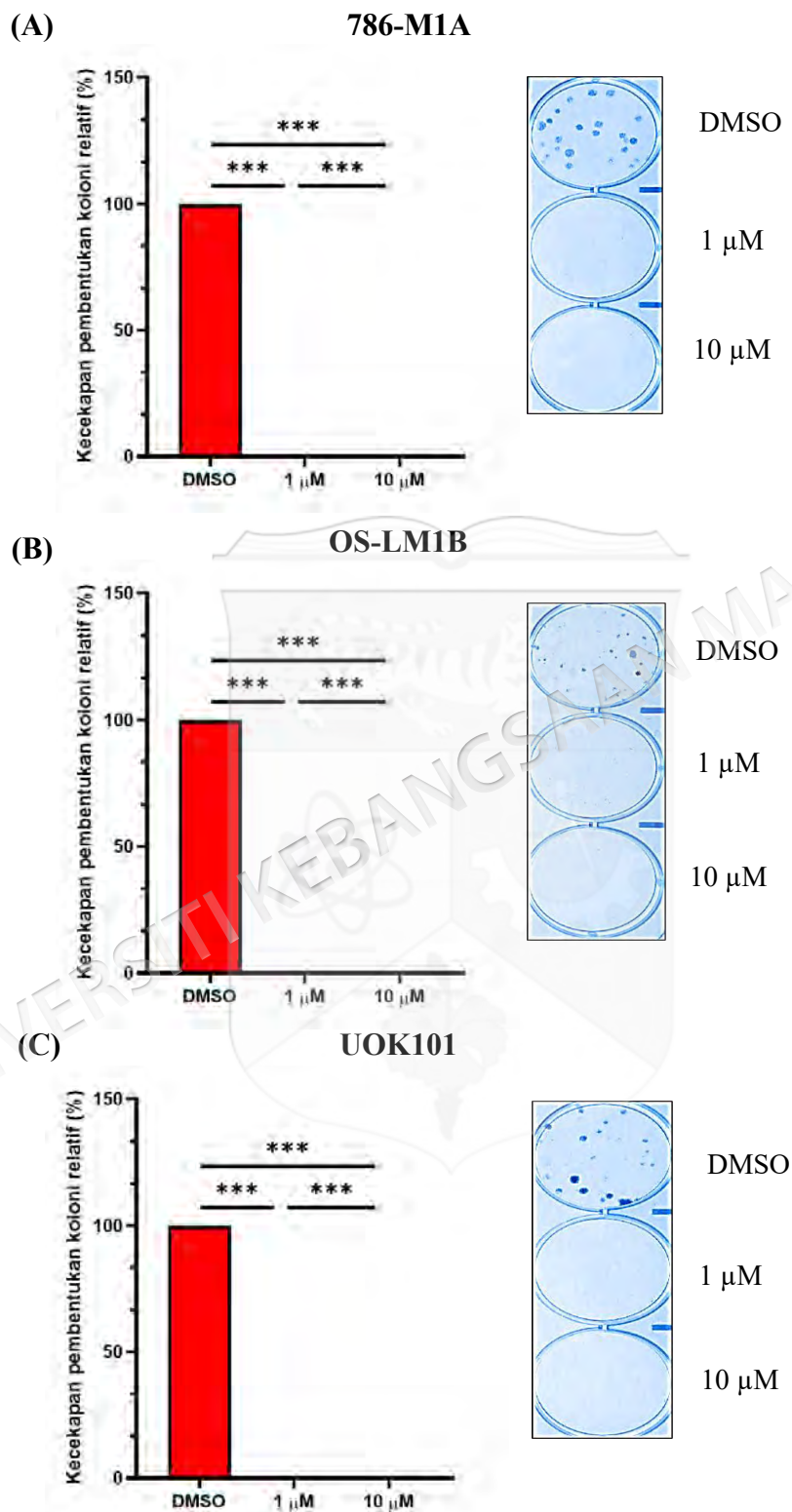
Kesan rawatan A-485 ke atas viabiliti sel ccRCC selepas 72 jam (A) 786-M1A, magnifikasi 4X dan (B) OS-LM1B. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B telah dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, *P≤0.05, **P≤0.005, ANOVA sehala.

4.1.2 Penilaian keupayaan pembentukan koloni sel ccRCC yang dirawat dengan JQ1 dan A-485

Rawatan sama ada dengan perencat kimia JQ1 atau A-485 mengurangkan tahap viabiliti atau pertumbuhan sel ccRCC telah dilaporkan dalam subseksyen 4.1.1. Pemerhatian juga menunjukkan tahap viabiliti sel ccRCC berkadar songsang dengan dos rawatan perencat kimia yang digunakan. Seterusnya, kesan rawatan JQ1 dan A-485 ke atas kebolehpayaan sel 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101 untuk membentuk koloni juga dijalankan. Tujuan asai pembentukan koloni ini dilakukan adalah untuk mendapatkan bukti tambahan akan sifat anti-pertumbuhan perencat kimia JQ1 dan A-485. Di samping itu, ia adalah untuk menyokong dapatan daripada asai viabiliti sel yang telah dilakukan dalam subseksyen 4.1.1.

Bagi asai pembentukan koloni ini, sebanyak 1×10^3 sel ccRCC 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101 diplat ke dalam setiap telaga plat telaga 6. Seterusnya, sel ccRCC ini dirawat dengan perencat kimia JQ1 selama 7 hari dengan dua dos berbeza iaitu $1 \mu\text{M}$ dan $10 \mu\text{M}$. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia JQ1. Selepas 7 hari rawatan, koloni yang berwarna ungu diperhatikan menggunakan mata kasar dan kemudiannya dielusi bagi menentukan bacaan serapan relatif. Pemerhatian menggunakan mata kasar mendapati bahawa semakin pekat warna noda kristal ungu, semakin banyak koloni yang bertumbuh, dan semakin tinggi serapan relatif yang dihasilkan. Pemerhatian yang didapati adalah kesemua sel ccRCC, 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101, tidak dapat bertumbuh dan seterusnya membentuk koloni pada kedua-dua dos JQ1 yang diuji. Kesimpulannya, sel ccRCC adalah sensitif terhadap JQ1 di mana rawatan dengan perencat kimia ini mengurangkan kecekapan pembentukan koloni dengan signifikan berbanding dengan sel kawalan (Rajah 4.3).

Pembentukan koloni selepas rawatan JQ1 dalam sel ccRCC



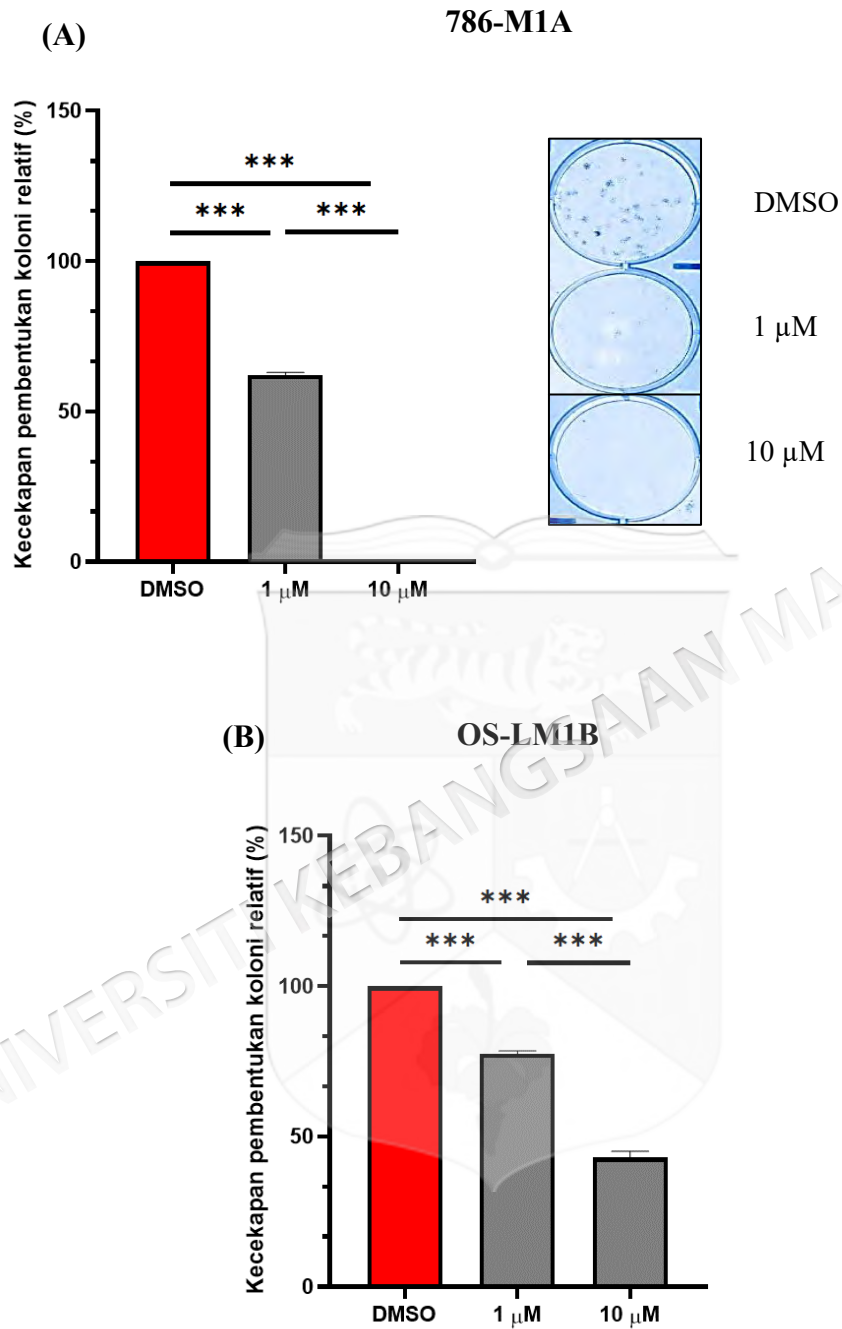
Rajah 4.3

Potensi pembentukan koloni selepas rawatan JQ1 dalam 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101. Kesemua sel telah diplatkan dan dikultur dalam plat telaga 6 selama 7 hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian dilakukan sebanyak 3 kali. *** $P \leq 0.0005$, ANOVA sehala.

Seterusnya, eksperimen untuk menguji kesan rawatan perencat kimia A-485 ke atas kebolehpayaan sel ccRCC untuk membentuk koloni pula dijalankan. Untuk asai ini, hanya dua jenis sel ccRCC diuji iaitu 786-M1A dan OS-LM1B. Kedua-dua sel ini diplatkan sebanyak 1×10^3 sel/telaga dan dirawat dengan perencat kimia A-485 selama 7 hari dengan dua dos berbeza iaitu $1 \mu\text{M}$ dan $10 \mu\text{M}$. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia A-485.

Rawatan A-485 ke atas sel 786-M1A dengan kepekatan dos $1 \mu\text{M}$ mencatatkan penurunan kebolehpayaan pembentukan koloni sebanyak 40%. Kepekatan $10 \mu\text{M}$ A-485 ke atas sel ini pula memberi kesan penurunan kadar pembentukan koloni sebanyak 100%. Untuk rawatan A-485 ke atas sel OS-LM1B, kadar kecekapan pembentukan koloni mencatatkan penurunan sebanyak kira-kira 20% dengan kepekatan $1 \mu\text{M}$. Manakala kepekatan $10 \mu\text{M}$ memberi kesan penurunan kadar pembentukan koloni sebanyak 60% (Rajah 4.4). Dapatan daripada eksperimen asai pembentukan koloni ini mendapati bahawa rawatan paling rendah ke atas sel ccRCC dengan kepekatan dos $1 \mu\text{M}$ JQ1 lebih poten berbanding dengan $1 \mu\text{M}$ A-485 dalam menentukan kebolehpayaan sel untuk membentuk koloni.

Pembentukan koloni selepas rawatan A-485 dalam sel ccRCC



Rajah 4.4

Potensi pembentukan koloni selepas rawatan A-485 dalam 786-M1A dan OS-LM1B. Kesemua sel telah diplat dan dikultur dalam plat telaga 6 selama 7 hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian telah dilakukan sebanyak 3 kali. *** $P \leq 0.0005$, ANOVA sehala.

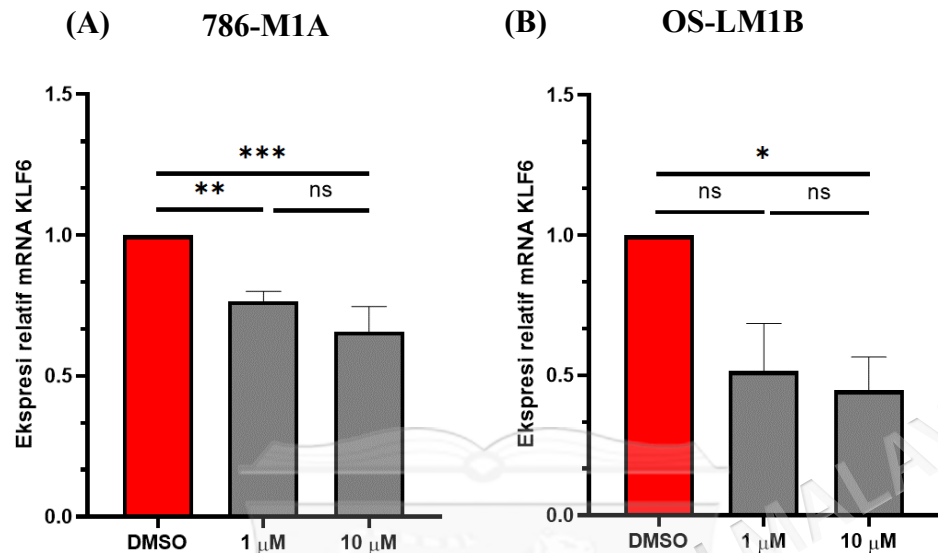
4.1.3 Rawatan JQ1 dan A-485 mengurangkan tahap ekspresi *KLF6* dalam sel ccRCC

Seperti yang telah dibincangkan dalam seksyen sebelum ini, protein BRD4 dan P300 merupakan antara komponen epigenetik penting yang mengawal atur pembentukan dan fungsi penggalak super. Bagi mencapai objektif ini, sel ccRCC dirawat sama ada dengan perencat kimia BRD4 atau P300 dan kemudiannya disusuli dengan analisa tahap ekspresi gen *KLF6* dengan menggunakan teknik qPCR.

Bagi mengenalpasti peranan BRD4 dalam mengawal atur proses transkripsi gen *KLF6* dalam ccRCC, sel 786-M1A dan OS-LM1B telah dirawat dengan perencat kimia JQ1 selama 6 jam pada dos 1 μM dan 10 μM . Tempoh rawatan ke atas semua sel selanjar telah ditetapkan selama 6 jam iaitu setelah pengoptimuman proses dilakukan bagi mengenalpasti durasi rawatan yang tidak terlalu memberi kesan ekstrem (sel mati) ke atas sel. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia JQ1. Bagi menentukan tahap ekspresi gen *KLF6* selepas rawatan dengan JQ1, RNA diekstrak daripada setiap kumpulan sel, cDNA disintesis daripada RNA ini dan seterusnya digunakan untuk analisis qPCR.

Rawatan dengan kepekatan 1 μM JQ1 ke atas sel 786-M1A mencatatkan penurunan tahap ekspresi *KLF6* sebanyak 25% berbanding sel kawalan. Manakala tahap ekspresi *KLF6* selepas rawatan 10 μM JQ1 ke atas sel ini juga menurun sebanyak 40% berbanding sel kawalan. Bagi eksperimen ke atas sel OS-LM1B, kepekatan 1 μM JQ1 menurunkan ekspresi *KLF6* sebanyak 30% berbanding sel kawalan. Rawatan dos JQ1 yang lebih tinggi iaitu 10 μM pula mampu memberi kesan penurunan sebanyak 40% terhadap tahap ekspresi *KLF6* berbanding sel kawalan (Rajah 4.5).

Tahap ekspresi *KLF6* selepas rawatan JQ1 dalam sel ccRCC



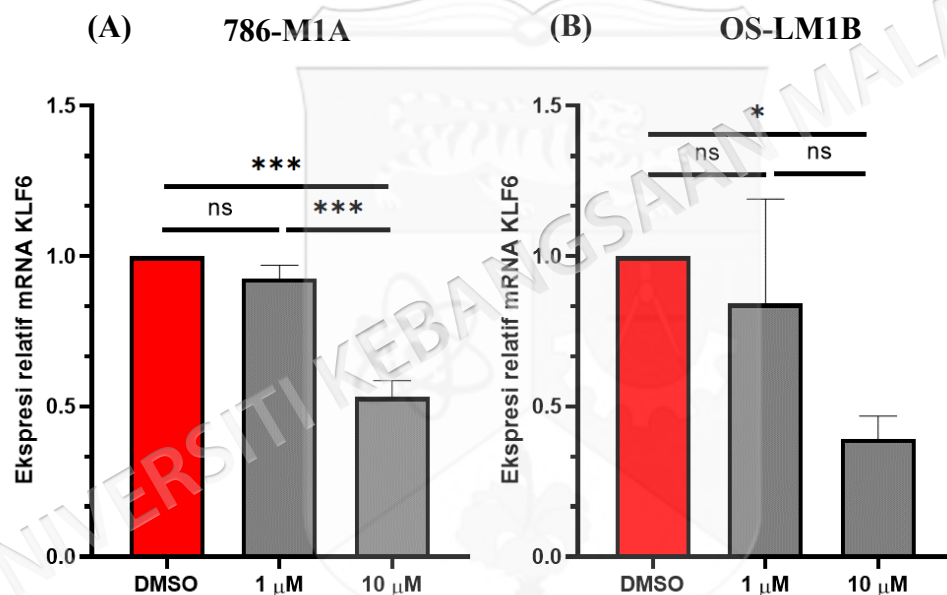
Rajah 4.5

Tahap ekspresi *KLF6* selepas rawatan dengan perencat aktiviti BRD4, JQ1 dalam sel ccRCC. (A) 786-M1A dan (B) OS-LM1B. Ujian ke atas 786-M1A telah dilakukan sebanyak tiga kali, manakala ujian ke atas OS-LM1B telah dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, *P<0.05, **P<0.005. ANOVA sehalu.

Seterusnya, untuk mengenalpasti peranan P300 dalam mengawal atur proses transkripsi gen *KLF6* dalam ccRCC, sel 786-M1A dan OS-LM1B telah dirawat dengan perencat kimia A-485 selama 16 jam pada dos 1 μ M dan 10 μ M. Sama seperti JQ1, tempoh rawatan 16 jam ditetapkan setelah pengoptimuman proses dilakukan. Sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia A-485. Bagi menentukan tahap ekspresi gen *KLF6* selepas rawatan dengan A-485, RNA diekstrak daripada setiap kumpulan sel, cDNA disintesis daripada RNA ini dan seterusnya digunakan untuk analisis qPCR.

Rawatan 1 μM A-485 ke atas sel 786-M1A mencatatkan penurunan tahap ekspresi *KLF6* yang tidak signifikan iaitu hanya sebanyak 10% berbanding sel kawalan. Penurunan tahap ekspresi *KLF6* yang ketara pula dapat diperhatikan pada kepekatan dos 10 μM A-485 iaitu sebanyak 50%. Selain itu, kepekatan 1 μM A-485 ke atas sel OS-LM1B memperlihatkan 20% pengurangan tahap ekspresi *KLF6* berbanding sel kawalan. Kepekatan 10 μM A-485 ke atas sel yang sama mencatatkan penurunan signifikan tahap ekspresi *KLF6* yang paling tinggi iaitu sebanyak 60% berbanding sel kawalan (Rajah 4.6).

Tahap ekspresi *KLF6* selepas rawatan A-485 dalam sel ccRCC



Rajah 4.6

Tahap ekspresi *KLF6* selepas rawatan dengan perencat aktiviti P300, A-485 dalam sel ccRCC. (A) 786-M1A dan (B) OS-LM1B. Ujian ke atas 786-M1A dan OS-LM1B telah dilakukan sebanyak tiga kali. ns>0.05, *P≤0.05, ***P≤0.0005. ANOVA sehalu.

Tahap ekspresi *KLF6* dalam sel ccRCC 786-M1A dan OS-LM1B yang dirawat dengan JQ1 dan A-485 ini berkadar negatif dengan kepekatan dos perencat yang digunakan. Walau bagaimanapun, penurunan kadar ekspresi *KLF6* setelah mensasarkan protein BRD4 dan P300 dengan menggunakan perencat kimia tidak memberikan impak yang besar. Ini disebabkan oleh kehadiran lokus penggalak super yang luas yang terlibat dalam mengawal atur proses transkripsi gen *KLF6* dalam ccRCC. Hasil kajian ini juga selari dengan kajian yang telah dijalankan oleh Syafruddin dan rakan-rakan yang mana

penyasaran lima penggalak tunggal dalam lokus penggalak super *KLF6* secara individu atau serentak menggunakan teknik CRISPRi masih mencatatkan tahap ekspresi *KLF6* yang tinggi (Syafuddin et al. 2019).

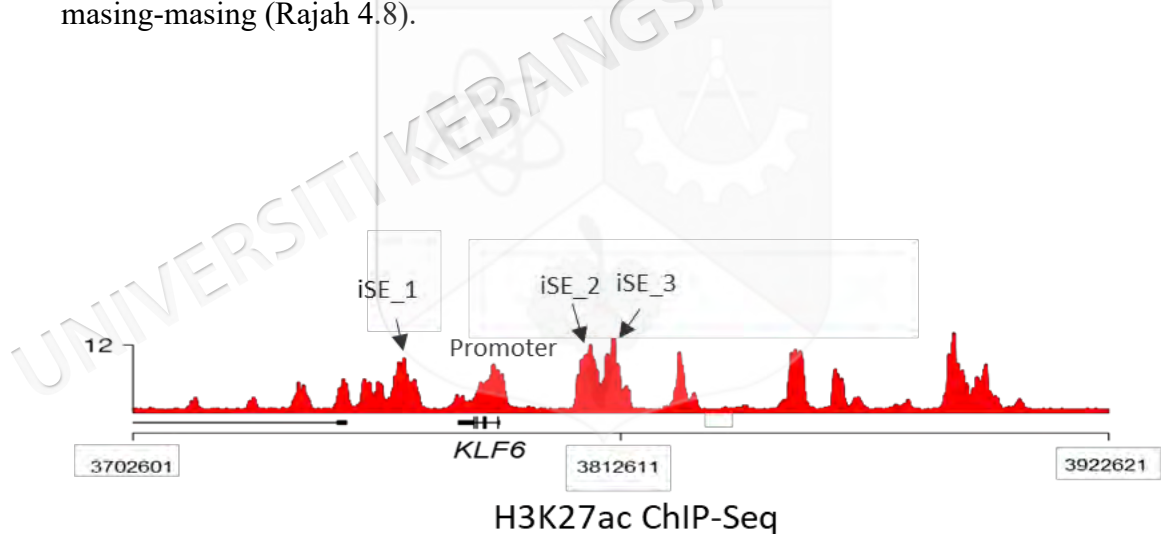
4.1.4 Pengurangan tahap isyarat H3K27ac pada wilayah penggalak gen *KLF6* selepas rawatan JQ1 dan A-485

Kromatin terbuka dan bergelung adalah proses penting dalam transkripsi gen di mana perubahan pada landskap kromatin ini akan menentukan sama ada faktor dan kofaktor transkripsi boleh mengakses dan mengikat jujukan DNA ataupun tidak. Proses ini adalah dinamik dan dipandu oleh konjugasi kumpulan seperti asetil atau metil pada residu amino asid pada protein histon. Sebagai contoh, pengasetilan lisin ke-27 protein histon 3 atau secara singkatnya H3K27ac akan menyebabkan pembukaan kromatin dan pengaktifan proses transkripsi. Justeru, tahap isyarat H3K27ac digunakan sebagai kaedah pengukuran atau penanda untuk aktiviti penggalak dan kawasan transkripsi yang aktif. Dapatan dalam subseksyen 4.1.3 (Rajah 4.5 dan Rajah 4.6) menunjukkan bahawa penyasaran aktiviti BRD4 dan P300 dalam sel ccRCC membawa kepada pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6*. Kajian seterusnya untuk menentukan sama ada pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6* adalah disebabkan oleh perubahan landskap wilayah penggalak gen ini akibat penyasaran aktiviti BRD4 dan P300.

Pembaca epigenetik BRD4 berperanan dalam mengenalpasti sisa lisin yang telah deasetilasi pada struktur kromatin yang bergelung. Selain itu, BRD4 mampu merekrut faktor transkripsi dan kofaktor ke kawasan pengawalaturan hulu dan seterusnya mengaktifkan proses transkripsi. Penyasaran BRD4 dengan menggunakan perencat kimia JQ1 menyebabkan BRD4 dan JQ1 bersaing untuk mengikat pada poket pengecaman BRD4. Kehadiran JQ1 ini menyebabkan struktur kromatin bergelung dan menyahaktifkan proses transkripsi seterusnya mengurangkan tahap ekspresi gen *KLF6*. Bagi menyiasat kesan penyasaran BRD4 terhadap landskap kromatin di kawasan penggalak *KLF6*, kaedah ChIP-qPCR telah dijalankan untuk menganalisis isyarat H3K27ac.

Dalam eksperimen ini, sel 786-M1A dirawat dengan kepekatan dos 10 μ M JQ1 selama 6 jam. Sel 786-M1A yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia JQ1. Sel kawalan dan sel yang telah dirawat ini diteruskan dengan proses paut silang dan sonifikasi untuk mendapatkan fragmen pendek DNA. Fragmen pendek DNA ini digunakan dalam proses imunopresipitasi kromatin menggunakan antibodi H3K27ac. Setelah itu, paut silang berbalik dilakukan bagi mendapatkan DNA yang telah dimendakkan. DNA yang telah dimendakkan ini ditulenkan dan seterusnya digunakan dalam analisis qPCR.

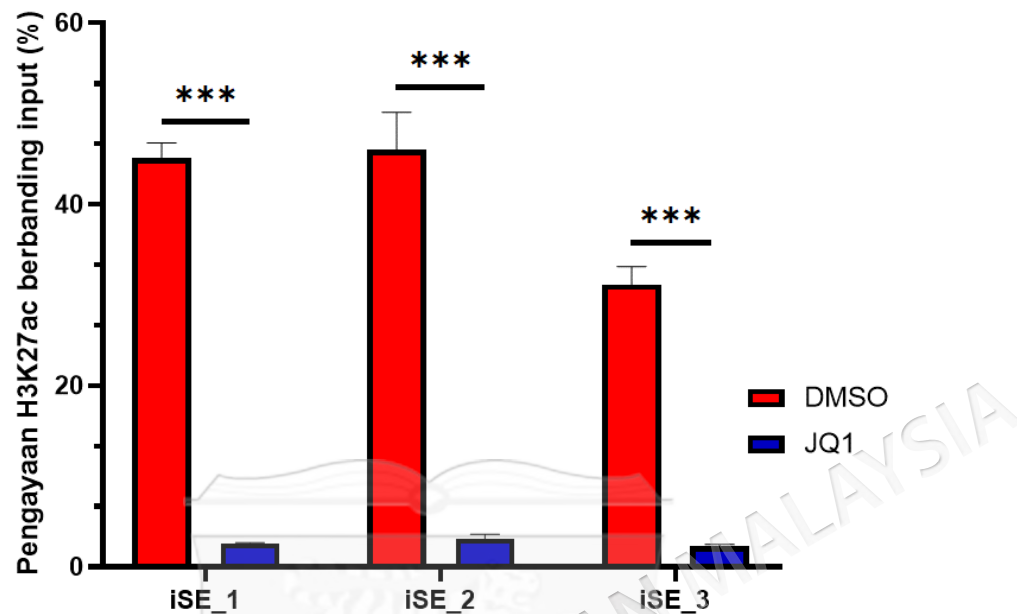
Pengayaan kadar H3K27ac dianalisis pada tiga penggalak tunggal yang terdapat dalam wilayah penggalak super *KLF6*. Rajah 4.7 menunjukkan kedudukan ketiga-tiga penggalak tunggal ini yang berdekatan dengan lokus *KLF6*. iSE_1 adalah penggalak yang berada di hiliran *KLF6*, manakala iSE_2 dan iSE_3 berada di huluan *KLF6*. Hasil kajian mendapati tahap isyarat H3K27ac pada sel yang dirawat dengan DMSO adalah tinggi berbanding dengan sel yang dirawat dengan JQ1 berbanding dengan input masing-masing (Rajah 4.8).



Rajah 4.7 Gambaran kedudukan penggalak super *KLF6*.

Sumber: Diubahsuai dari (Syafuruddin 2019)

Tahap isyarat H3K27ac selepas rawatan JQ1 terhadap penggalak *KLF6* ke atas sel 786-M1A



Rajah 4.8

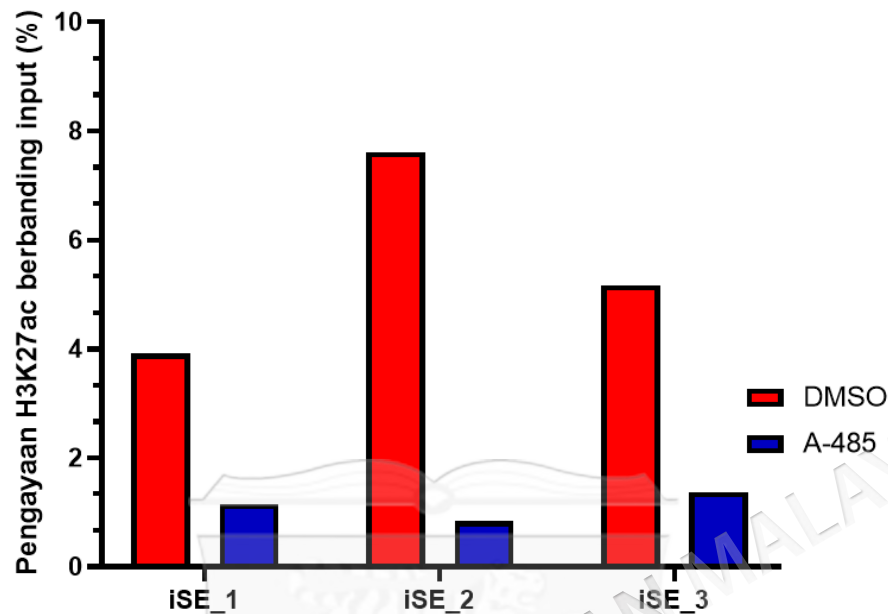
Kadar isyarat H3K27ac terhadap penggalak *KLF6* dalam sel 786-M1A selepas rawatan JQ1. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. *** $P \leq 0.0005$. Ujian T.

P300 adalah enzim *histone acetyltransferase* yang berperanan mengawal transkripsi gen dengan cara menambah kumpulan asetil pada protein histon seterusnya membenarkan struktur kromatin terbuka. P300 juga memainkan peranan penting dalam asetilasi histon secara global pada promoter, penggalak dan penggalak super dalam sel. Penyasaran P300 dengan menggunakan perencat kimia A-485 menyebabkan protein histon tidak dapat diasetilasi dan merekrut faktor transkripsi dan kofaktor pada kawasan kromatin. Kehadiran A-485 ini menyebabkan struktur kromatin yang lebih mampat dan mengurangkan proses transkripsi seterusnya mengurangkan tahap ekspresi gen *KLF6*. Bagi menyiasat kesan penyasaran P300 terhadap landskap kromatin di kawasan penggalak *KLF6*, kaedah ChIP-qPCR telah dijalankan untuk menganalisis isyarat H3K27ac.

Dalam eksperimen ini, sel 786-M1A dirawat dengan kepekatan dos 10 μ M A-485 selama 16 jam. Sel 786-M1A yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia A-485. Sel kawalan dan sel yang telah dirawat ini diteruskan dengan proses paut silang dan sonifikasi untuk mendapatkan fragmen pendek DNA. Fragmen pendek DNA ini digunakan dalam proses imunopresipitasi kromatin menggunakan antibodi H3K27ac. Setelah itu, paut silang berbalik dilakukan bagi mendapatkan DNA yang telah dimendakkan. DNA yang telah dimendakkan ini ditulenkan dan seterusnya digunakan dalam analisis qPCR.

Pengayaan tahap H3K27ac dianalisis pada tiga kawasan penggalak KLF6 seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.9. Hasil kajian mendapati tahap isyarat H3K27ac pada sel yang dirawat dengan DMSO adalah tinggi berbanding dengan sel yang dirawat dengan A-485 berbanding dengan input masing-masing (Rajah 4.9). Kesimpulannya, berdasarkan hasil kajian yang didapati, JQ1 dan A-485 mampu untuk merencatkan aktiviti BRD4 dan P300, masing-masing. Perencatan aktiviti BRD4 mampu mengubah struktur kromatin kepada kromatin bergelung pada wilayah penggalak KLF6 disebabkan ketidakmampuan BRD4 untuk merekrut faktor dan kofaktor transkripsi. Selain itu, perencatan P300 oleh A-485 turut menyebabkan perubahan struktur kromatin menjadi lebih bergelung pada wilayah penggalak super KLF6, hasil daripada penyingkiran kumpulan asetil pada protein histon. Justeru, pengurangan tahap ekspresi KLF6 seperti yang dibincangkan dalam seksyen 4.1.3 adalah disebabkan perencatan BRD4 dan P300 yang memberi kesan terhadap struktur kromatin pada wilayah penggalak super KLF6 dalam sel ccRCC.

Tahap isyarat H3K27ac selepas rawatan A-485 terhadap penggalak *KLF6* ke atas sel 786-M1A



Rajah 4.9

Tahap isyarat H3K27ac terhadap penggalak *KLF6* dalam sel 786-M1A selepas rawatan A-485. Ujian dilakukan sebanyak satu kali.

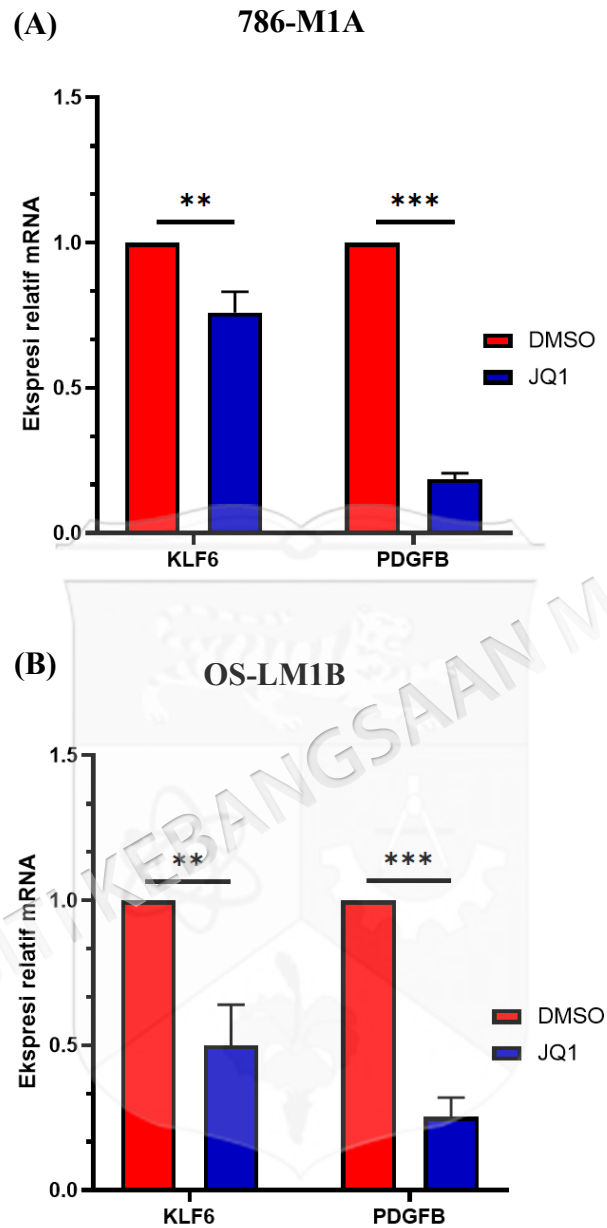
4.1.5 Pengurangan tahap ekspresi *PDGFβ* dan tapak laluan isyarat mTORC1

Sebagai faktor transkripsi, *KLF6* mengawal tahap ekspresi gen hilirannya melalui proses pengaktifan atau penindasan. Kajian terdahulu melalui analisa RNA-seq ke atas sel selanjara ccRCC kawalan dan sel selanjara ccRCC yang mana ekspresi gen *KLF6* ini disenyapkan melalui teknik CRISPRi. Perbandingan data RNA-seq antara kedua-dua sel ini menunjukkan terdapat kumpulan gen yang mengalami penambahan dan pengurangan tahap ekspresi dengan signifikan (Syafuruddin et al. 2019). *PDGFβ* merupakan gen hiliran *KLF6* yang divalidasi secara komprehensif di mana protein *PDGFβ* memainkan peranan penting dalam pengaktifan tapak laluan isyarat mTORC1 (Abuhamad et al. 2023; Syafuruddin et al. 2019).

Berdasarkan hasil kajian yang didapati dalam seksyen sebelum ini, penyasaran protein BRD4 dan P300 mengurangkan tahap ekspresi gen *KLF6* dan isyarat H3K27ac di wilayah penggalak super *KLF6*. Justeru, kajian seterusnya adalah untuk menyiasat sama ada penyasaran protein BRD4 dan P300 ini juga memberi kesan terhadap ekspresi *PDGFβ* iaitu gen hiliran *KLF6*. Bagi mencapai tujuan kajian ini, sel ccRCC dirawat sama ada dengan perencat kimia BRD4 (JQ1) atau P300 (A-485) dan kemudiannya disusuli dengan analisa tahap ekspresi gen *KLF6* dan *PDGFβ* dengan menggunakan teknik qPCR. Bagi mengenalpasti peranan BRD4 dalam mengawal atur proses transkripsi gen *PDGFβ* dalam ccRCC, sel 786-M1A dan OS-LM1B telah dirawat dengan perencat kimia JQ1 dan diproses seperti yang telah dinyatakan pada subseksyen 3.4.5.

Dapatan kajian menunjukkan penurunan signifikan tahap ekspresi *KLF6* sebanyak 30% di dalam sel 786-M1A yang dirawat dengan 10 μ M JQ1 selama 6 jam. Manakala tahap ekspresi gen *PDGFβ* pula mengalami penurunan yang signifikan iaitu sebanyak 85% berbanding dengan sel kawalan (Rajah 4.10A). Sebagai tambahan, kajian ini juga diulang ke atas sel OS-LM1B untuk menentusahkan dapatan yang diperhatikan untuk sel 786-M1A. Secara konsistennya, rawatan JQ1 ke atas sel OS-LM1B juga menunjukkan penurunan ekspresi *KLF6* sebanyak 40% manakala ekspresi *PDGFβ* menunjukkan penurunan sebanyak 80% berbanding sel kawalan (Rajah 4.10B).

Tahap ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ* selepas rawatan JQ1 dalam sel ccRCC



Rajah 4.10

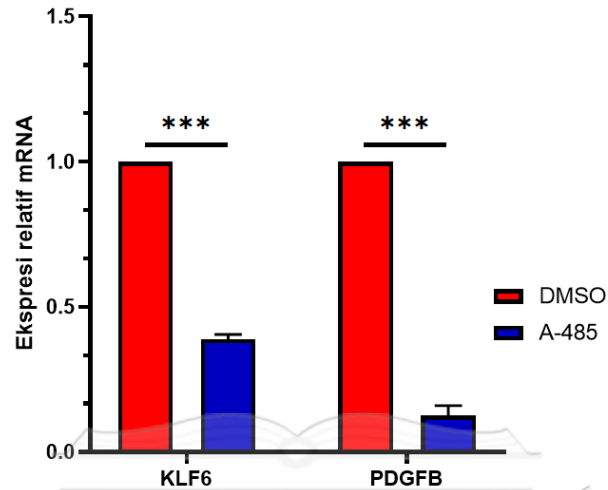
Tahap ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ* dalam sel ccRCC selepas rawatan dengan 10μM JQ1 selama 6 jam. (A) 786-M1A (B) OS-LM1B. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.0005$. Ujian T.

Bagi mengenalpasti sama ada penyasaran protein P300 juga memberikan kesan terhadap tahap pengekspresan gen PDGF β dalam ccRCC, sel 786-M1A dan OS-LM1B telah dirawat dengan perencat kimia A-485. Setiap kumpulan sel diproses seperti yang telah dijelaskan dalam subseksyen 3.4.5 dan seterusnya digunakan untuk analisa qPCR. Rawatan 10 μ M A-485 selama 16 jam ke atas sel 786-M1A menunjukkan penurunan signifikan tahap ekspresi *KLF6* sebanyak 60% berbanding sel kawalan. Manakala tahap ekspresi gen PDGF β pula mengalami penurunan yang lebih ketara dan signifikan iaitu sebanyak 90% berbanding dengan sel kawalan (Rajah 4.11A). Sebagai tambahan, kajian ini juga diulang ke atas sel OS-LM1B untuk menentusahkan dapatan yang diperhatikan untuk sel 786-M1A. Secara konsistennya, rawatan A-485 ke atas sel OS-LM1B juga menunjukkan penurunan ekspresi *KLF6* sebanyak 70% manakala ekspresi PDGF β menunjukkan penurunan sebanyak 90% berbanding sel kawalan (Rajah 4.11B).

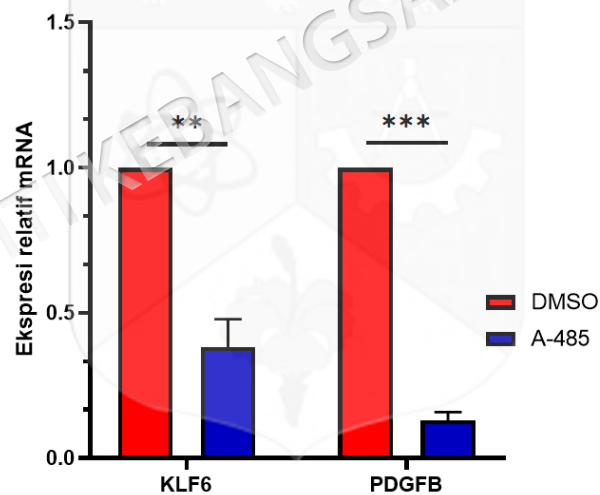


Tahap ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ* selepas rawatan A-485 dalam sel ccRCC

(A) 786-M1A



(B) OS-LM1B



Rajah 4.11

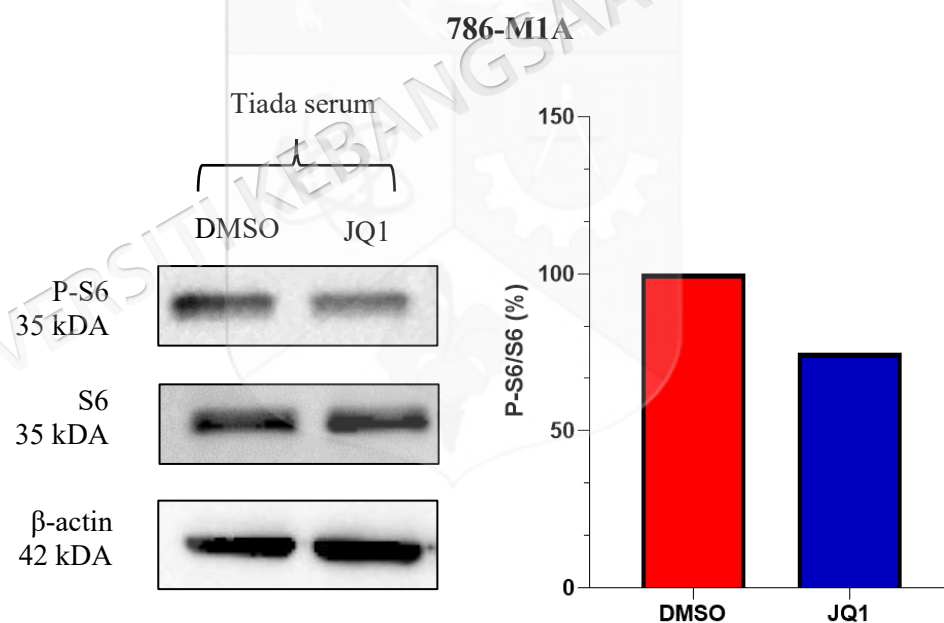
Tahap ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ* dalam sel ccRCC selepas rawatan dengan 10μM A-485 selama 16 jam. (A) 786-M1A (B) OS-LM1B. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.0005$. Ujian T.

Kajian lepas melaporkan PDGF β yang merupakan faktor pertumbuhan berfungsi sebagai agonis untuk mengaktifkan tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC (Abuhamad et al. 2023; Syafruddin et al. 2019). Aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 yang hiper dilaporkan dalam majoriti pesakit ccRCC di mana tapak laluan ini memainkan peranan yang signifikan dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan sel ccRCC. Sehubungan itu, objektif kajian seterusnya adalah untuk menyiasat sama ada penindasan gen KLF6 dan PDGF β melalui penyasaran protein BRD4 juga akan menjejaskan aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 ini. Bagi mencapai objektif ini, sel ccRCC 786-M1A yang dikultur dalam media tanpa serum dirawat dengan perencat kimia JQ1 dengan kepekatan dos 10 μ M selama 6 jam. Sel ccRCC yang dirawat dengan DMSO dijadikan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia JQ1. Selepas rawatan selesai, protein diekstrak daripada setiap kumpulan sel dan seterusnya tahap aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 dianalisis dengan menggunakan teknik pemblotan Western.

Pengaktifan tapak laluan isyarat mTORC1 dinilai melalui tahap fosforilasi komponen hiliran tapak laluan ini seperti fosforilasi protein p70 S6 Kinase (P-p70 S6 kinase) atau substratnya protein ribosomal S6 (P-S6). Bagi kajian ini, tahap P-S6 digunakan untuk menentukan aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 selepas rawatan dengan JQ1. Oleh yang demikian, antibodi P-S6 digunakan manakala antibodi S6 pula digunakan untuk mengesan jumlah protein S6 yang tidak mengalami fosforilasi. Di samping itu, antibodi β -actin digunakan sebagai penanda kawalan jumlah protein yang sama dimuatkan ke dalam setiap telaga eksperimen pemblotan Western.

Dapatan daripada eksperimen pembloatan Western menunjukkan bahawa rawatan 10 μ M JQ1 ke atas sel 786-M1A menyebabkan penurunan sedikit tahap aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1. Perkara ini dapat dilihat pada pengurangan tahap P-S6 dalam sel 786-M1A yang dirawat dengan JQ1. Bagi mendapatkan nilai kuantitatif, nisbah jalur P-S6/S6 untuk kedua-dua kumpulan sel ditentukan di mana terdapat kira-kira 25% pengurangan aktiviti tapak laluan ini dalam sel yang dirawat dengan JQ1 berbanding berbanding dengan sel kawalan (Rajah 4.12). Pengurangan tahap P-S6/S6 juga boleh mengurangkan tapak laluan isyarat lain seperti PI3K/AKT, MAPK/ERK, dan autofagi. Oleh sebab itu, dapatan daripada eksperimen pembloatan Western ini belum cukup kukuh untuk menyokong bahawa perencatan aktiviti BRD4 mampu mengurangkan aktiviti mTORC1 dalam ccRCC.

Pengisyaratan mTORC1 selepas rawatan JQ1 dalam 786-M1A



Rajah 4.12

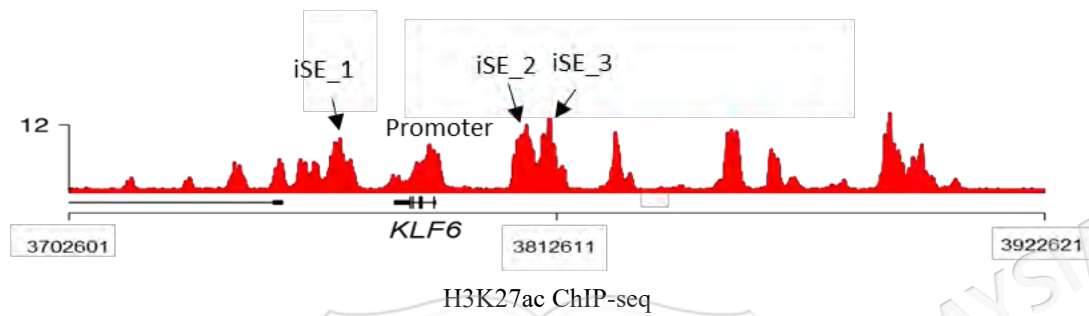
Rawatan JQ1 berpotensi untuk mengurangkan tahap aktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 dalam sel ccRCC 786-M1A. Sel 786-M1A dirawat dengan 10 μ M JQ1 selama 6 jam sebelum analisis pembloatan Western dijalankan. Ujian dilakukan sebanyak satu kali.

4.2 PERANAN ASETILASI LISIN 27 HISTON 3 (H3K27AC) DALAM MENYOKONG LANDSKAP DAN AKTIVITI PENGALAK SUPER *KLF6*

Kajian dan eksperimen yang dijalankan dalam seksyen 4.1 menggunakan perencat kimia JQ1 dan A-485 bagi menyasarkan aktiviti pengawalaturan epigenetik BRD4 dan P300. Ini adalah untuk mengkaji kesan penyasaran ini ke atas tahap ekspresi gen *KLF6* dan isyarat H3K27ac di wilayah pengalok super *KLF6*. Walau bagaimanapun, penggunaan perencat kimia mempunyai kemungkinan untuk tidak spesifik, mempunyai pelbagai sasaran lain atau kesan yang meluas (*widespread effect*). Justeru, dapatan kesan penyasaran protein BRD4 dan P300 yang dilaporkan dalam seksyen 4.1 mungkin boleh disebabkan oleh kesan sekunder atau tertiar. Maka, adalah penting untuk menyokong dan menentusahkan dapatan daripada kajian dan eksperimen yang dijalankan dalam seksyen 4.1.

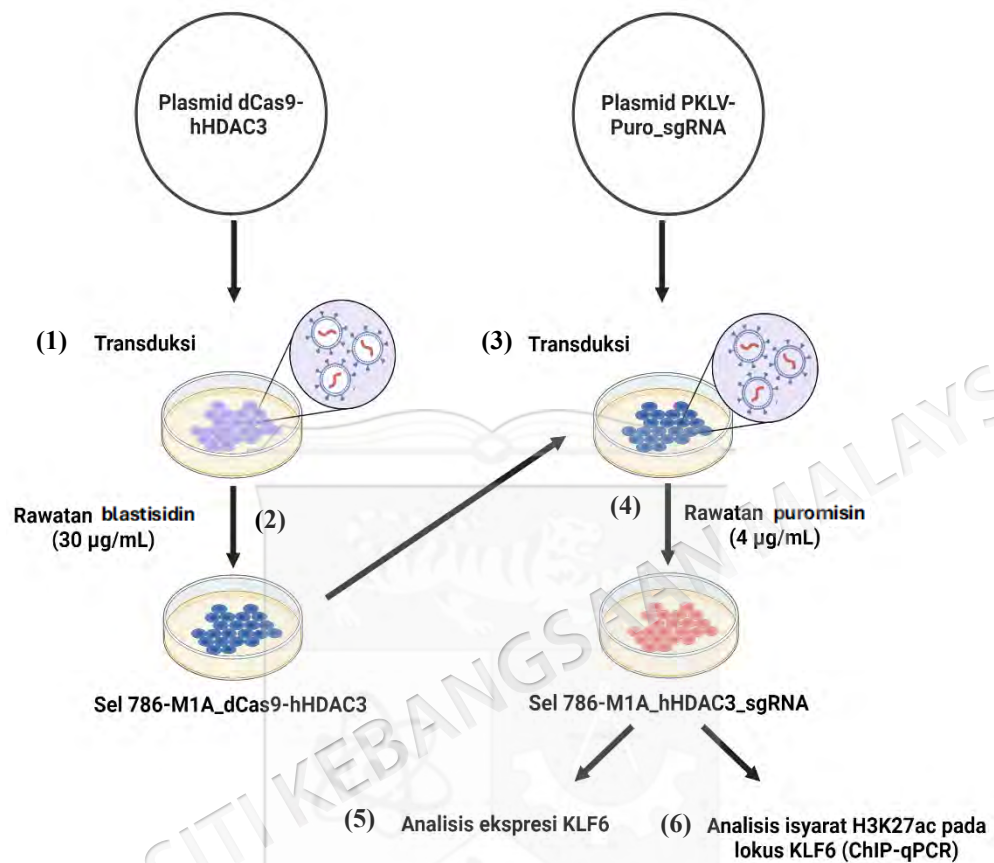
Oleh kerana kaedah penyasaran melalui kaedah genetik bersifat khusus, teknologi CRISPR-dCas9 digunakan di mana teknologi ini membolehkan lokus atau wilayah genomik tertentu disasarkan dengan ketepatan yang tinggi. Oleh itu, dalam kajian seterusnya, teknologi CRISPR-dCas9 digunakan untuk deasetilasi H3K27ac secara langsung di kawasan promoter dan 3 pengalok tunggal di dalam wilayah pengalok super *KLF6*; iSE_1, iSE_2 dan iSE_3. Kedudukan empat kawasan ini boleh dirujuk pada Rajah 4.13. Protein dCas9 ini dikonjugasi dengan enzim *histone deacetylase* (dCas9-hHDAC3) yang berfungsi untuk membuang kumpulan asetil yang terdapat pada lisin 27 histon 3. Rekrutmen protein dCas9-hHDAC3 ini dipandu oleh sgRNA yang telah direka bentuk komplementari dengan kawasan sasaran dan diklon ke dalam vektor pengekspresan pKLV-Puro dalam kajian terdahulu (Syafuddin et al. 2019). Rajah 4.14 menunjukkan carta alir eksperimen untuk deasetilasi H3K27ac pada empat wilayah yang dinyatakan di atas dengan menggunakan teknologi CRISPR-dCas9. Partikel lentiviral plasmid dCas9-hHDAC3 ditransduksi ke dalam sel 786-M1A kemudiannya dipilih dengan antibiotik blastisidin. Sel 786-M1A_dCas9-hHDAC3 yang stabil ini kemudian ditransduksi dengan partikel lentiviral plasmid pKLV-Puro_sgRNA (NTC, promoter iKLF6, iSE_1, iSE_2 dan iSE_3) sebelum dipilih dengan rawatan puromisin. Sel yang telah dipilih ini dinamakan sebagai 786-M1A_hHDAC3_NTC, 786-M1A_hHDAC3_promoter iKLF6, 786-M1A_hHDAC3_ iSE_1, 786-

M1A_hHDAC3_ iSE_2 dan 786-M1A_hHDAC3_ iSE_3. Setelah itu, analisis pengekspresan gen *KLF6* dan isyarat H3K27ac pada lokus *KLF6* dilakukan.



Rajah 4.13 Ilustrasi kedudukan sasaran sgRNA pada lokus *KLF6*.

Sumber: Diubahsuai dari (Syafuruddin et al. 2019)

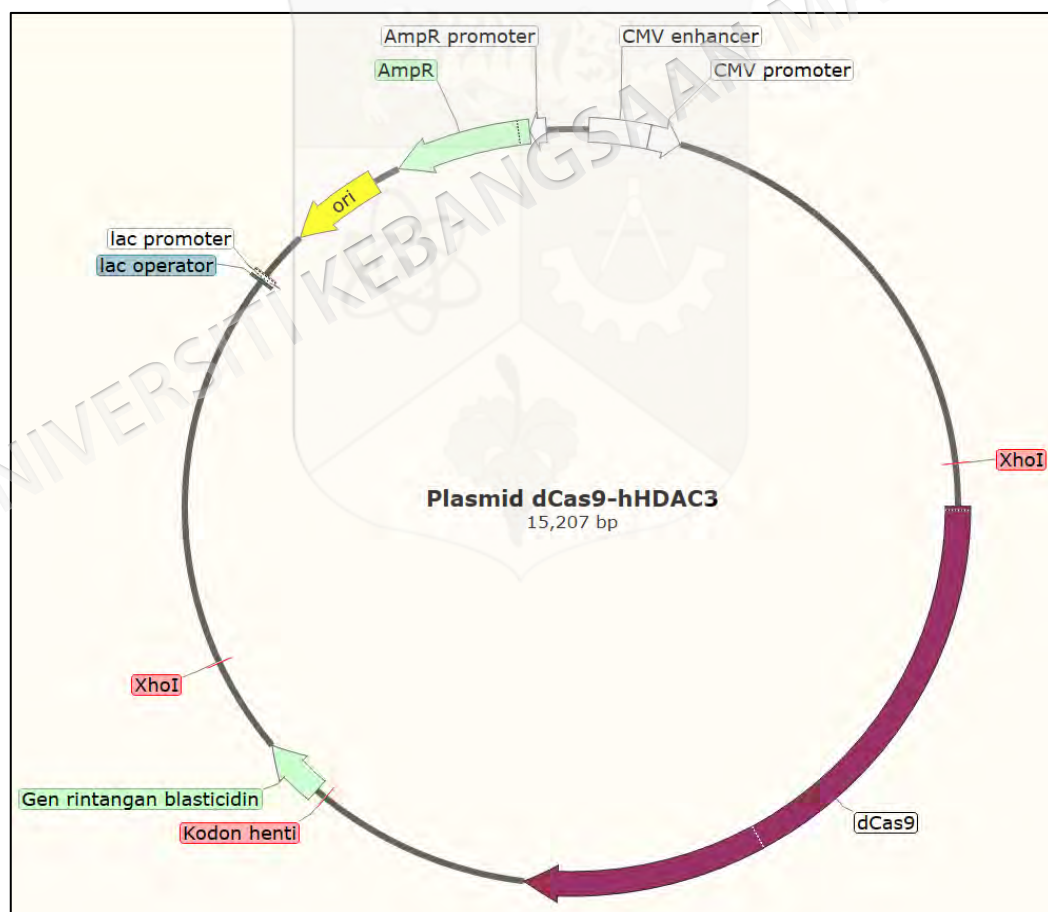


Rajah 4.14

Carta alir deasetilasi histon dalam sel 786-M1A menggunakan pendekatan CRISPR-dCas9. (1) Sel 786-M1A ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 dan (2) dirawat dengan blasticidin untuk menghasilkan sel stabil 786-M1A_dCas9-hHDAC3. (3) Sel stabil ini kemudian ditransduksi dengan plasmid pKLV-Puro_sgRNA dan (4) dirawat dengan puromisin untuk menghasilkan sel stabil 786-M1A_hHDAC3_sgRNA. (5) Analisis ekspresi KLF6 dan (6) analisis isyarat H3K27ac pada lokus KLF6 dijalankan bagi mengesahkan aktiviti deasetilasi histon.

4.2.1 Mutagenesis terarah dalam plasmid dCas9-hHDAC3

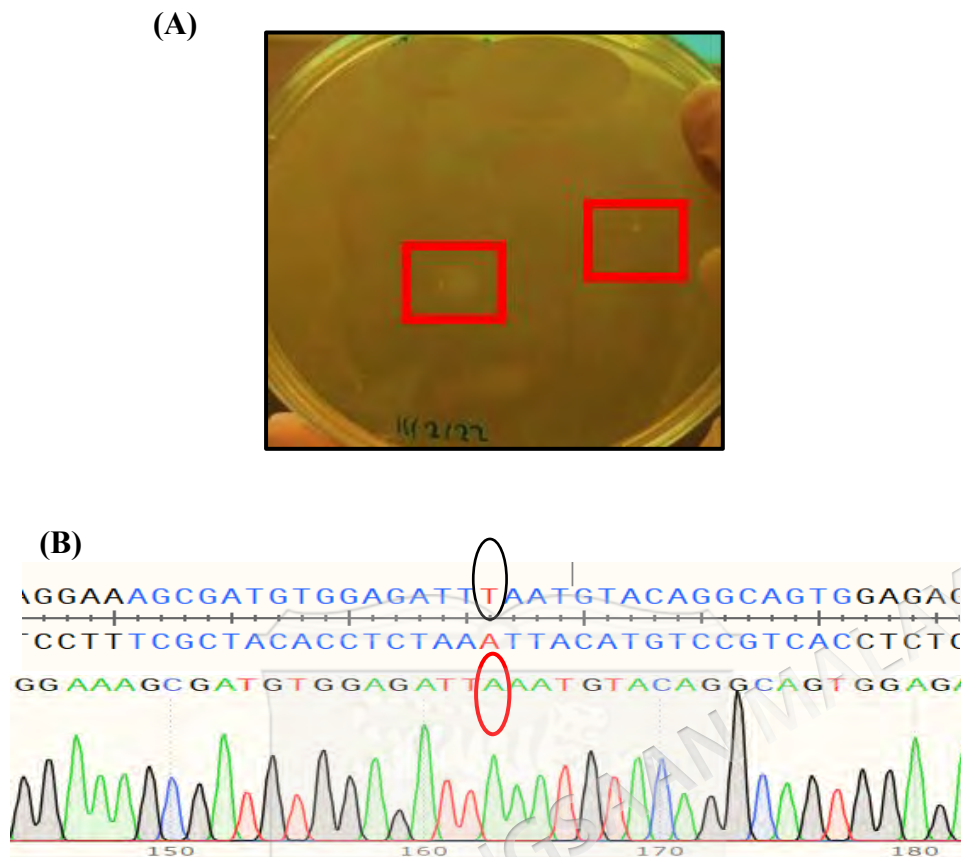
Kajian ini dimulakan dengan penghasilan sel selangar ccRCC yang mengekspres protein dCas9-hHDAC3 secara stabil melalui kaedah transduksi lentiviral. Plasmid dCas9-hHDAC3 diperolehi daripada repositori plasmid Addgene. Namun begitu, plasmid ini mempunyai kodon berhenti sebelum jujukan gen rintangan blastisidin di mana kewujudan kodon berhenti ini menyebabkan gen rintangan ini tidak dapat ditranslasi kepada protein. Rajah 4.15 menunjukkan kedudukan kodon berhenti dalam plasmid dCas9-hHDAC3. Pengekspresan gen rintangan blastisidin ini adalah penting untuk memilih sel yang telah berjaya ditransduksi untuk kegunaan hiliran. Bagi menyelesaikan masalah ini, mutagenesis terarah untuk menukar kodon berhenti (TAA) kepada *alanine* (AAA) supaya gen rintangan ini dapat ditranslasi kepada protein.



Rajah 4.15

Kedudukan kodon henti yang berada di antara jujukan dCas9 dan gen rintangan blastisidin dalam plasmid dCas9-hHDAC3. Ilustrasi plasmid dihasilkan menggunakan perisian SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>).

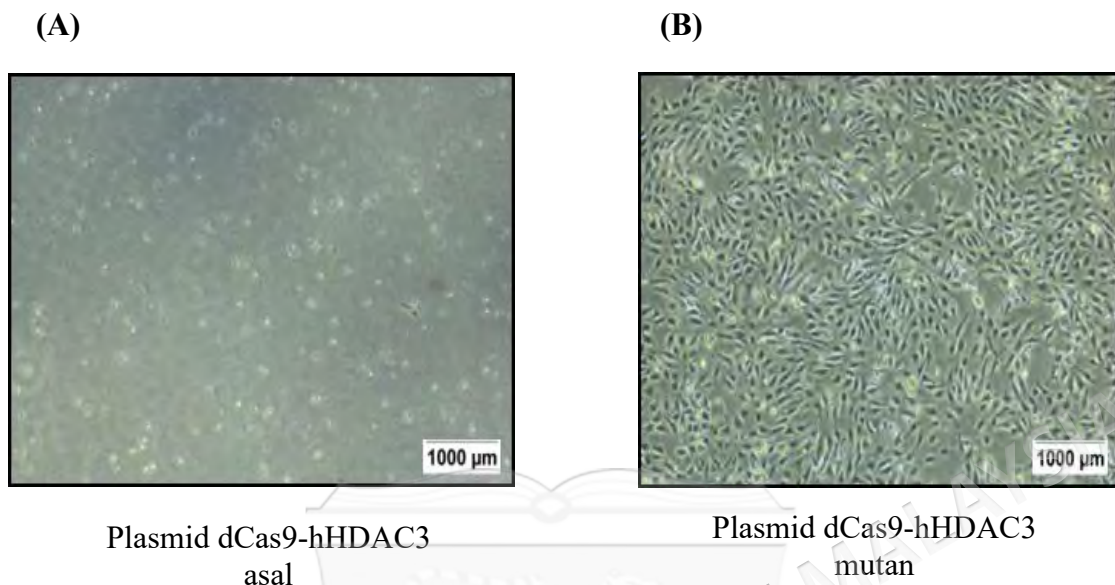
Bagi menjalankan mutagenesis terarah ini, teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi keseluruhan plasmid dCAS9-hHDAC3 dengan menggunakan pasangan primer yang mengandung nukleotida tunggal yang ingin ditukar iaitu A. Produk PCR iaitu plasmid yang telah menjalani mutagenesis terarah ditransformasikan ke dalam bakteria dan dikultur di atas plat agar LB + ampisilin. Bacteria yang berjaya menghasilkan koloni adalah bakteria yang mempunyai plasmid mutagenesis terarah. Hasil pemerhatian menggunakan mata kasar mendapati terdapat dua koloni bakteria yang berwarna putih (Rajah 4.16A). Kedua-dua koloni ini diinokulasi dan dikultur dalam media LB yang telah disuplemen dengan ampisilin. Plasmid kemudiannya diekstrak daripada bakteria dan digunakan untuk pengesahan mutasi TAA kepada AAA melalui penjujukan *Sanger* berpandukan jujukan primer CMV Promoter. Hasil pengesahan daripada penjujukan *Sanger* mendapati bahawa plasmid yang telah diekstrak adalah plasmid yang telah berjaya menjalani mutagenesis terarah (Rajah 4.16B). Bulatan hitam adalah nukleotida asal T, manakala bulatan merah menunjukkan nukleotida A yang berjaya ditukar.



Rajah 4.16

Hasil dapatan eksperimen mutagenesis terarah plasmid dCas9-hHDAC3. (A) Koloni bakteria yang tumbuh di atas plat agar LB + ampicilin adalah bakteria yang berjaya ditransformasi dengan plasmid mutan. (B) Elektroferogram penjujukan plasmid mutan mengesahkan penukaran nukleotida T kepada A.

Seterusnya, plasmid dCas9-hHDAC3 mutan yang berjaya dihasilkan melalui kaedah mutagenesis terarah ini ditransduksi ke dalam sel 786-M1A dan kadar kerintangan sel ini terhadap blastisidin ditentukan. Sebagai perbandingan, sel 786-M1A ini juga ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 asal yang tidak menjalani mutagenesis terarah. Kedua-dua sel ini dirawat dengan 30 µg/mL blastisidin selama lima hari. Hasil dapatan eksperimen ini menunjukkan bahawa sel 786-M1A yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 mutan mempunyai kerintangan terhadap blastisidin dan terus hidup. Walau bagaimanapun, sel 786-M1A yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 asal mati. Pemerhatian ini disebabkan oleh gen kerintangan terhadap blastisidin tidak dapat ditranslasi kerana kehadiran kodon henti TAA (Rajah 4.17). Sel 786-M1A yang berjaya ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 mutan seterusnya digunakan dalam eksperimen hiliran.

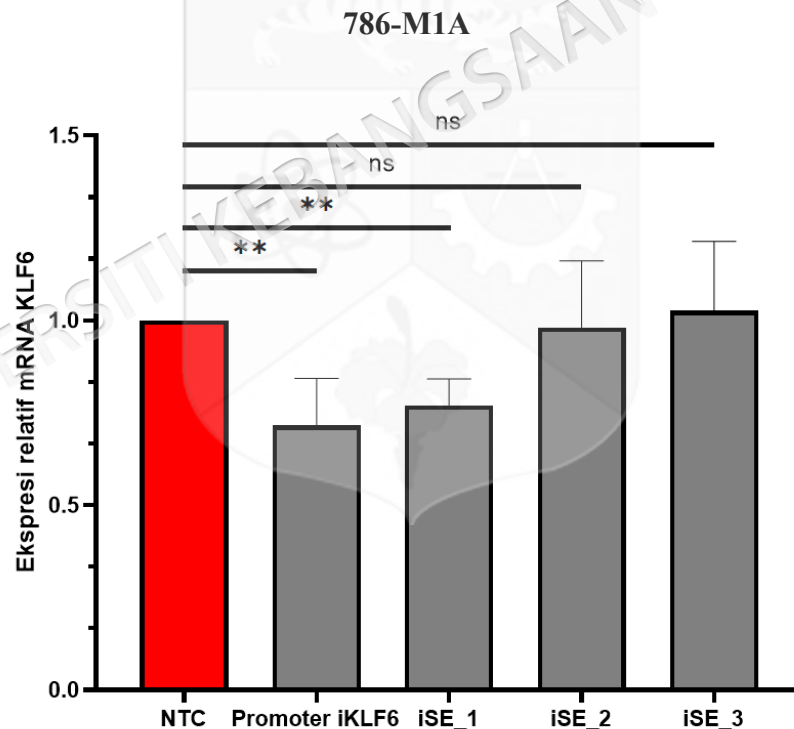


Rajah 4.17 Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dan dipilih dengan antibiotik blastisidin 30 µg/mL. (A) Sel yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 asal dan (B) plasmid dCas9-hHDAC3 mutan. Sel yang ditransduksi dengan plasmid dCas9-hHDAC3 mutan mempunyai kerintangan terhadap blastisidin. Magnifikasi 4X.

4.2.2 Deasetilasi H3K27ac pada wilayah promotor dan penggalak *KLF6* iSE_1 mengurangkan tahap ekspresi gen *KLF6*

Seperti yang telah dibincangkan dalam seksyen sebelum ini, H3K27ac merupakan penanda untuk struktur kromatin terbuka dan kawasan transkripsi aktif. Penggunaan kaedah CRISPR-dCas9-hHDAC3 untuk menyisihkan kumpulan asetil di kawasan H3K27ac berupaya untuk mengubah landskap kromatin serta mengganggu interaksi antara faktor/ko-faktor transkripsi yang menyebabkan penindasan ekspresi gen yang berkaitan. Seterusnya, sel 786-M1A yang mengekspres dCas9-hHDAC3 mutan secara stabil di transduksi dengan sgRNA berasingan yang menyasarkan kawasan tersebut: *non-targeting control* (NTC), promotor *KLF6* dan 3 wilayah penggalak *KLF6* (iSE_1, iSE_2 dan iSE_3).

Bagi menganalisis tahap ekspresi gen *KLF6* dalam sel 786-M1A yang telah mengalami deasetilasi H3K27ac pada wilayah yang disebutkan di atas, cDNA yang disintesis daripada total RNA ini digunakan untuk menganalisis tahap ekspresi *KLF6* melalui teknik qPCR. Hasil daripada analisis qPCR ini menunjukkan penurunan signifikan tahap ekspresi gen *KLF6* sebanyak 30% apabila wilayah promoter *KLF6* dideasetilasi dengan menggunakan teknik CRISPR-dCas9-hHDAC3. Deasetilasi wilayah penggalak *KLF6* iSE_1 pula menyebabkan penurunan signifikan tahap ekspresi gen *KLF6* sebanyak 25%. Namun begitu, deasetilasi wilayah penggalak *KLF6* iSE_2 dan iSE_3 tidak memberikan sebarang kesan terhadap tahap ekspresi gen *KLF6* berbanding dengan NTC (Rajah 4.18). Kesimpulannya, penyisihan kumpulan asetil hanya pada wilayah promoter dan penggalak super *KLF6* iSE_1 mempengaruhi transkripsi gen *KLF6* dan mengaruh ekspresinya dalam sel ccRCC.

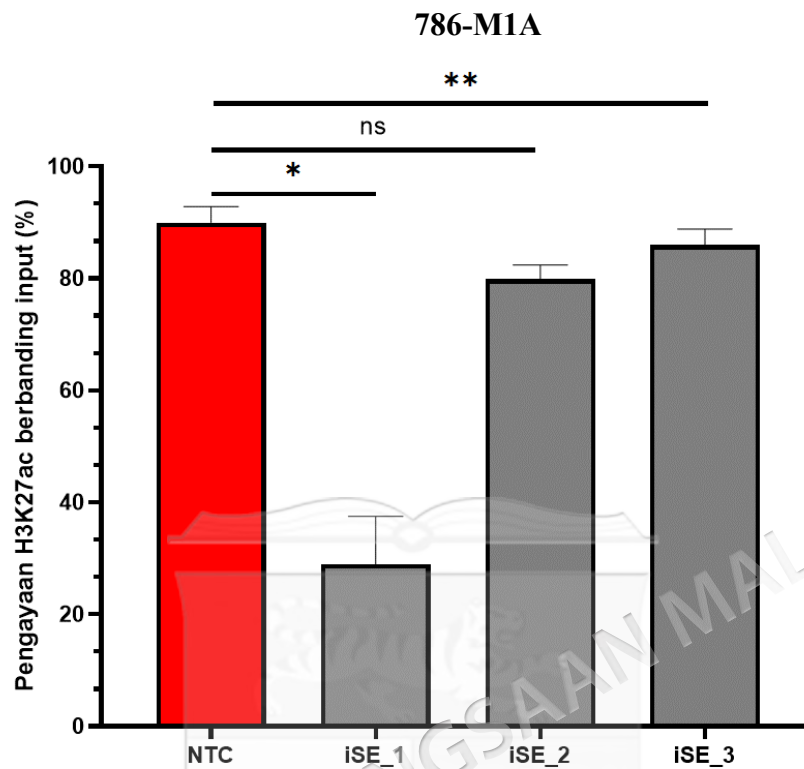


Rajah 4.18

Deasetilasi histon menggunakan teknologi CRISPR-dCas9-hHDAC3 dalam sel 786-M1A pada wilayah promoter *KLF6*, penggalak *KLF6* iSE_1, penggalak *KLF6* iSE_2 dan penggalak *KLF6* iSE_3. Ekspresi gen *KLF6* pada promoter *iKLF6* dan wilayah penggalak *KLF6* iSE_1 mengalami penurunan signifikan berbanding sel kawalan. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ns>0.05, **P≤0.005. Ujian T.

Deasetilasi H3K27ac pada wilayah promotor dan penggalak *KLF6* iSE_1 menyebabkan pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6*. Tiada sebarang perubahan pada tahap ekspresi gen *KLF6* diperhatikan untuk deasetilasi wilayah penggalak *KLF6* iSE_2 dan iSE_3. Eksperimen seterusnya yang dijalankan adalah H3K27ac ChIP-qPCR. Tujuannya untuk menyiasat sama ada pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6* rentetan daripada penyasaran wilayah penggalak iSE_1 disebabkan oleh perubahan landskap kromatin akibat deasetilasi H3K27ac. Dalam eksperimen ini, sel 786-M1A_hHDAC3_NTC, 786-M1A_hHDAC3_iSE_1, 786-M1A_hHDAC3_iSE_2 dan 786-M1A_hHDAC3_iSE_3 diteruskan dengan proses paut silang dan sonifikasi untuk mendapatkan fragmen pendek DNA. Fragmen pendek DNA ini digunakan dalam proses imunopresipitasi kromatin menggunakan antibodi H3K27ac. Setelah itu, paut silang berbalik dilakukan bagi mendapatkan DNA yang telah dimendakkan. DNA yang telah dimendakkan ini dituliskan dan seterusnya digunakan dalam analisa qPCR.

Hasil kajian mendapati tahap isyarat H3K27ac mengalami penurunan setelah kumpulan asetil disisihkan daripada histon pada semua kawasan penggalak iSE_1, iSE_2 dan iSE_3 berbanding NTC (Rajah 4.19). Wilayah penggalak *KLF6* iSE_1 mencatatkan 66% penurunan tahap isyarat H3K27ac yang paling ketara dan signifikan berbanding NTC. Berbeza dengan penggalak iSE_2 dan iSE_3 yang hanya menunjukkan penurunan tahap isyarat H3K27ac yang sedikit berbanding NTC iaitu sebanyak 11% dan 6%, masing-masing. Secara kesimpulannya, dapatan kajian ini mengesahkan kesan yang diperhatikan pada analisis qPCR yang mana perubahan landskap kromatin yang deasetilasi pada wilayah penggalak *KLF6* memberi kesan terhadap tahap ekspresi *KLF6*. Tahap ekspresi *KLF6* dalam analisa qPCR pada penggalak iSE_2 dan iSE_3 tidak menunjukkan penurunan disebabkan oleh deasetilasi pada kawasan penggalak ini tidak menurunkan isyarat transkripsi yang aktif.



Rajah 4.19

Deasetilasi histon menggunakan teknologi CRISPR-dCas9-hHDAC3 pada beberapa wilayah lokus *KLF6* dalam sel 786-M1A. Isyarat H3K27ac berkurang dengan ketara pada wilayah penggalak iSE_1 berbanding NTC. Ujian dilakukan sebanyak dua kali, ns>0.05, *P≤0.05, **P≤0.005, Ujian T.

4.3 PENYENYAPAN EKSPRESI *MEF2C* DALAM SEL CCRCC MENGGUNAKAN TEKNOLOGI GANGGUAN CRISPR (CRISPRi).

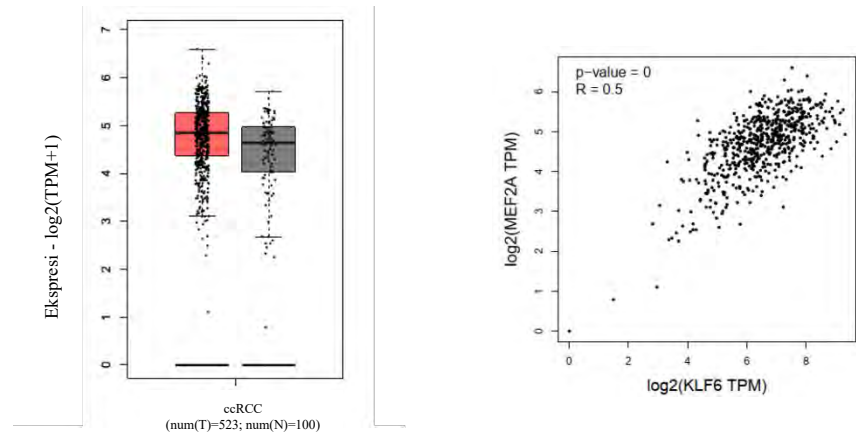
Faktor transkripsi memainkan peranan penting dalam mengawal atur proses transkripsi sesuatu gen sama ada melalui pengaktifan atau penindasan ekspresi gen. Selain itu, faktor transkripsi boleh berinteraksi dengan komponen modifikasi epigenetik untuk mengubahsuai landskap kromatin, dan juga berfungsi untuk merekrut kompleks dan ko-faktor lain yang mengawal proses transkripsi. Penggalak super telah dilaporkan boleh diikat oleh banyak faktor transkripsi untuk mengaruh pengekspresan tinggi gen hiliran. Namun begitu, faktor transkripsi yang mengikat penggalak super *KLF6* dan mengaruh pengekspresan tinggi gen ini dalam ccRCC juga masih lagi belum diketahui sepenuhnya. Justeru, fokus kajian ini seterusnya adalah untuk menentukan faktor transkripsi yang mengikat wilayah promotor gen *KLF6* dan seterusnya menyiasat peranan faktor transkripsi ini dalam mengaruh pengekspresan *KLF6*.

Hasil analisis motif DNA dalam kajian terdahulu dengan menggunakan MEME Suite dan FIMO mengenalpasti kehadiran motif keluarga faktor transkripsi MEF2 dalam wilayah promotor *KLF6* (Rajah 4.20). Seterusnya, analisis TCGA RNA-seq dengan menggunakan perisian sesawang GEPIA menunjukkan korelasi positif antara tahap ekspresi *KLF6* dan *MEF2A*, *MEF2C* dan *MEF2D*. Ekspresi setiap keluarga MEF2 adalah tinggi dalam sampel kanser berbanding sampel normal (Rajah 4.21). Selain itu, analisis menunjukkan tahap ekspresi *MEF2C* yang tinggi dalam sel ccRCC berbanding sel normal. Ekspresi *MEF2C* juga adalah tinggi jika dibandingkan dengan keluarga MEF2 yang lain (Rajah 4.22). Justeru itu, kajian ini dijalankan untuk menyelidik peranan faktor transkripsi MEF2C dalam wilayah promotor dan mengaruh ekspresi gen *KLF6* dalam ccRCC.

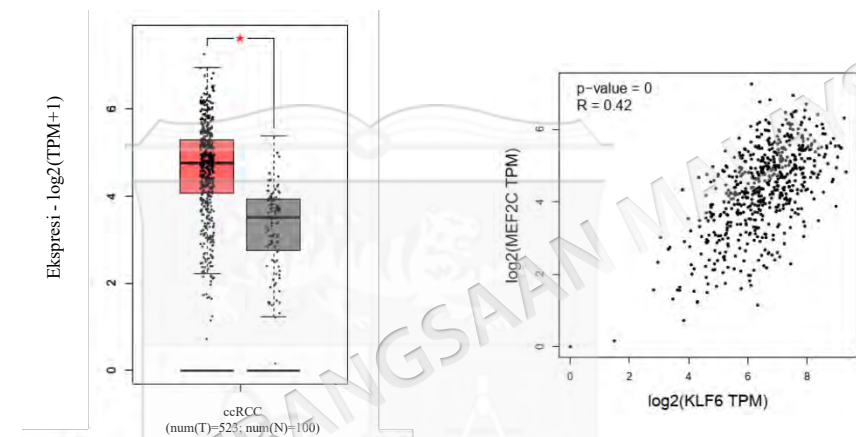
Bagi menyiasat sama ada MEF2C mengawal atur ekspresi gen *KLF6* secara langsung, kaedah CRISPRi telah digunakan untuk menyenyapkan ekspresi MEF2C dalam sel selanjara ccRCC. Untuk kajian ini, tiga sel selanjara ccRCC telah digunakan iaitu sel 786-M1A, OS-LM1B dan UOK101. Penyenyapan ekspresi MEF2C menggunakan dCas9-KRAB digunakan dan dipandu oleh iMEF2C yang telah diklon ke dalam pKLV-Hygro. Rajah 4.23 menunjukkan carta alir untuk menyenyapkan ekspresi pada gen MEF2C dalam sel selanjara ccRCC yang disebutkan di atas.

Sumber: Diubahsuai dari (Syafuruddin et al. 2019)

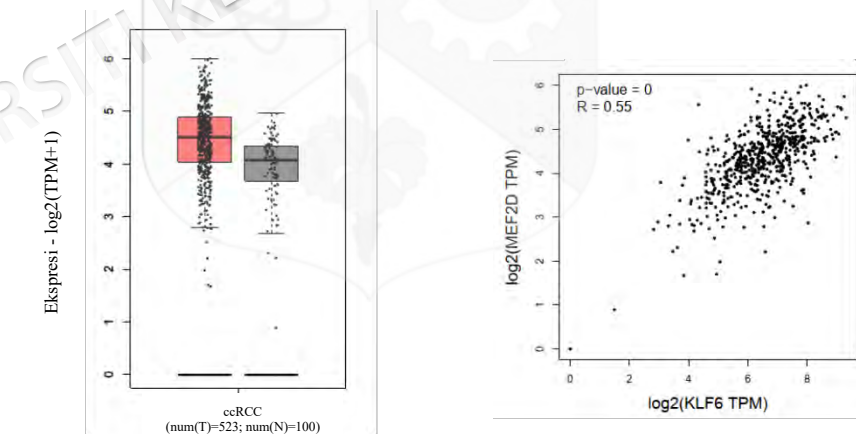
(A) MEF2A



(B) MEF2C

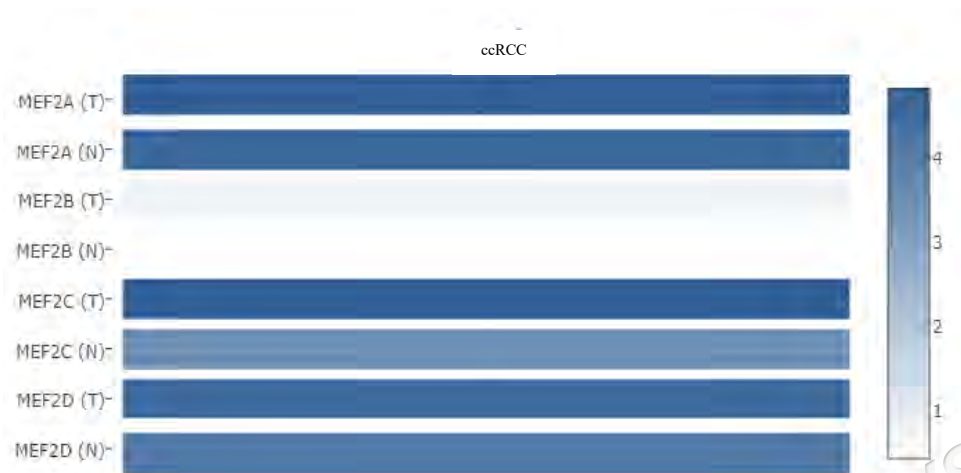


(C) MEF2D



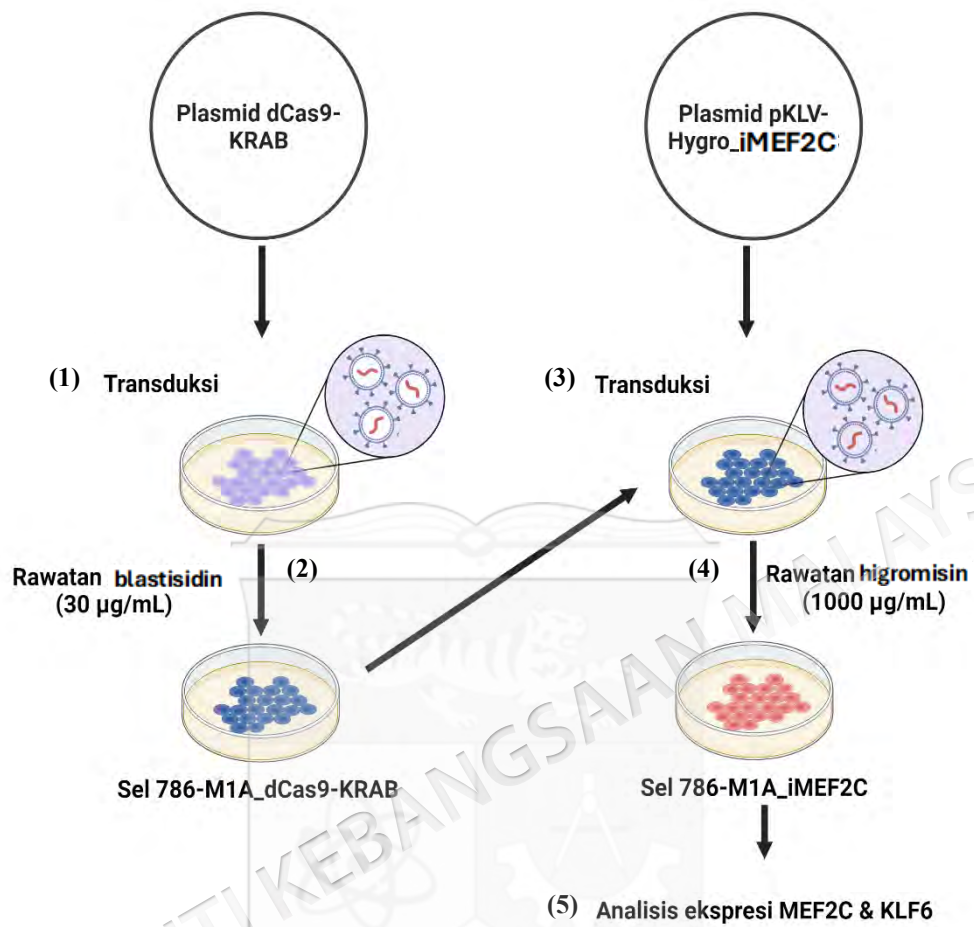
Rajah 4.21

Analisis korelasi gen dalam data TCGA dengan menggunakan perisian sesawang GEPIA menunjukkan korelasi positif antara tahap ekspresi *KLF6* dan keluarga *MEF2* dalam ccRCC. Ekspresi setiap keluarga *MEF2* adalah tinggi dalam sampel kanser berbanding sampel normal. T merujuk kepada sampel kanser manakala N merujuk kepada sampel normal. * $P < 0.01$. Korelasi Pearson.



Rajah 4.22

Analisis ekspresi gen dalam data TCGA dengan menggunakan perisian sesawang GEPIA menunjukkan perbezaan tahap ekspresi *MEF2C* yang tinggi dalam ccRCC berbanding tisu normal. T merujuk kepada sampel kanser manakala N merujuk kepada sampel normal. Skala 4 menunjukkan tahap ekspresi paling tinggi manakala skala 1 menunjukkan tahap ekspresi paling rendah.

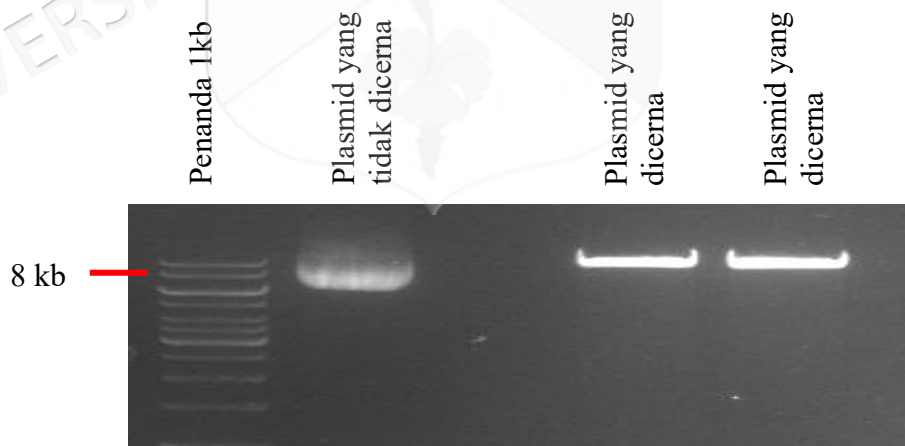


Rajah 4.23

Carta alir penyenyapan ekspresi *MEF2C* dalam sel ccRCC menggunakan pendekatan CRISPRi.

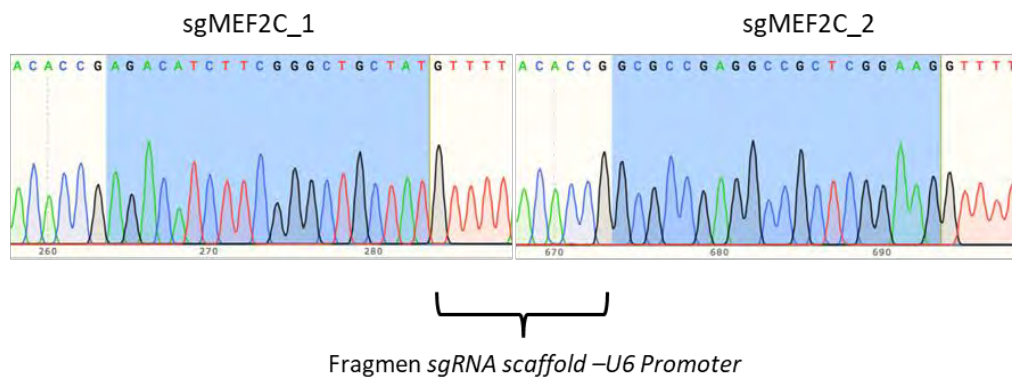
4.3.1 Penjanaan sel ccRCC yang mengalami penindasan ekspresi endogen *MEF2C*

Konstruk iMEF2C direka untuk mengekspresikan dua sgRNA berasingan yang menyasarkan wilayah promoter gen *MEF2C*. Konstruk iMEF2C ini diklon ke dalam plasmid pKLV-Hygro. Sebelum pengklonan ini dijalankan, konstruk iMEF2C diamplifikasi menggunakan teknik PCR disusuli dengan pencernaan plasmid pKLV-Hygro dengan enzim *BbsI* dan rawatan dengan enzim *Antarctic Phosphatase*. Plasmid yang telah dicerna dan dirawat ini dituliskan dengan melalui purifikasi gel. Imej elektroforesis gel menunjukkan jalur plasmid yang dicerna (sebelah kanan) dan tidak dicerna (sebelah kiri) (Rajah 4.24). Plasmid yang tidak dicerna dijadikan sebagai kawalan bagi melihat keberkesanan proses pencernaan. Jalur plasmid yang telah dicerna bersaiz lebih kurang 8.5 kb iaitu bersamaan dengan saiz plasmid pKLV-Hygro. Plasmid pKLV-Hygro yang telah diligasi dengan konstruk iMEF2C ditransformasikan ke dalam bakteria dan hasil ligasi ditentukan melalui penjujukan *Sanger*. Imej elektroferogram penjujukan *Sanger* mengesahkan kehadiran konstruk iMEF2C di dalam plasmid pKLV-Hygro (Rajah 4.25).



Rajah 4.24

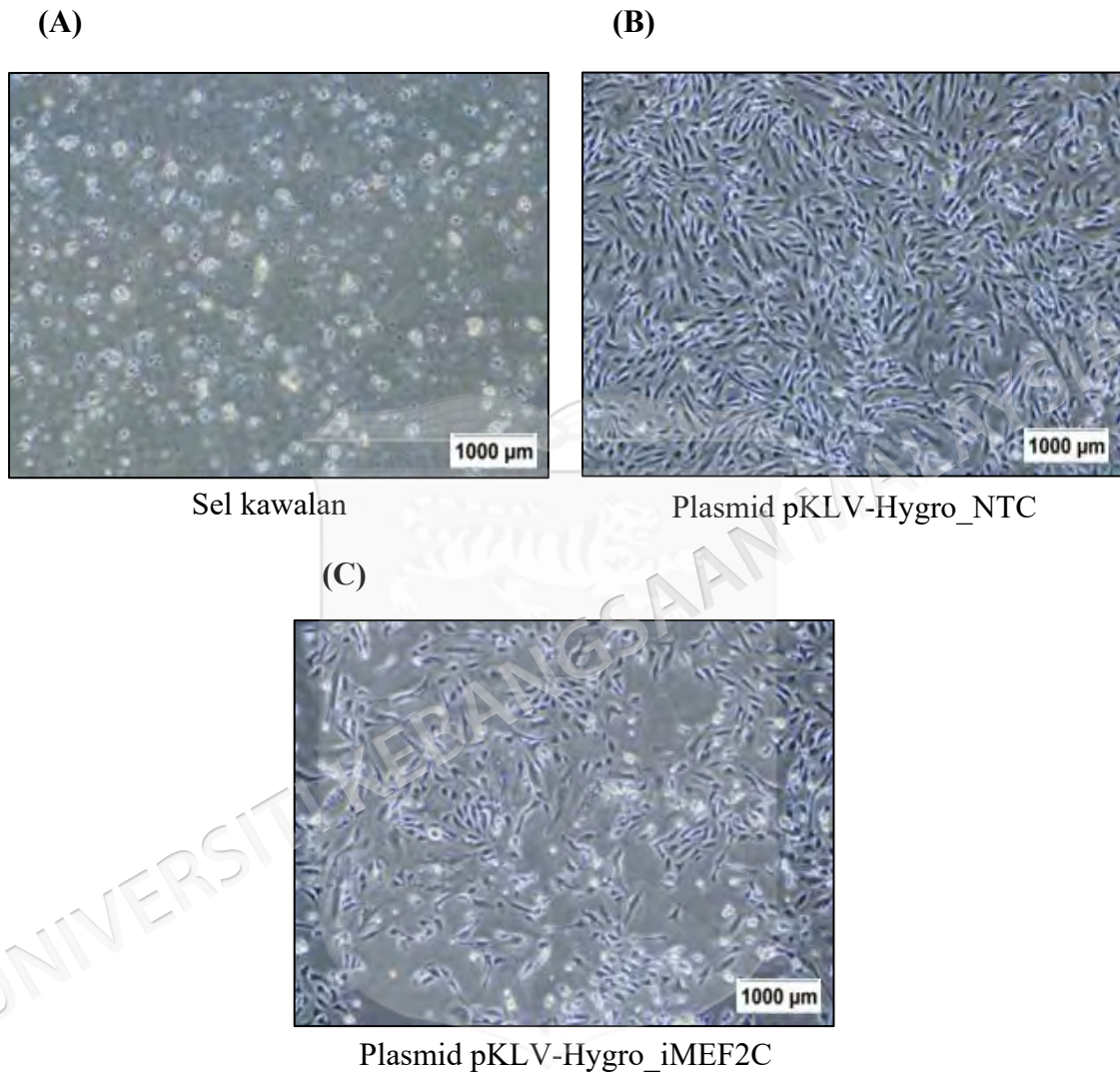
Imej elektroforesis gel bagi plasmid pKLV-Hygro yang telah dicerna dengan enzim *BbsI* dan plasmid pKLV-Hygro yang tidak dicerna.



Rajah 4.25 Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk iMEF2C yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid pKLV-Hygro.

Teknologi CRISPRi menggunakan enzim dCas9 yang dikonjugasi dengan protein KRAB yang merupakan penindas gen yang poten. Seterusnya, sel ccRCC yang mengekspres dCas9-KRAB secara stabil (dijana dalam kajian lepas) ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C atau plasmid pKLV-Hygro_NTC (dijana dalam kajian yang lepas). Rawatan antibiotik dengan 1000 µg/mL higromisin dijalankan untuk memilih sel yang berjaya ditransduksi dengan plasmid yang mengandungi sgRNA ini. Sel ccRCC dCas9-KRAB yang tidak ditransduksi digunakan sebagai sel kawalan ketika rawatan antibiotik di mana rawatan ini dihentikan selepas sel kawalan mati sepenuhnya.

Pemerhatian menggunakan mikroskop terbalik pada pembesaran 4x untuk menilai morfologi sel secara langsung dan mendapati rawatan antibiotik higromisin ke atas sel kawalan menyebabkan sel ini mati kerana tidak mengekspres gen rintangan higromisin. Sel yang telah mati terapung dalam media dan tidak melekat di dasar plat kultur. Perbezaan ketara dapat dilihat pada sel ccRCC yang ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_NTC dan pKLV-Hygro_iMEF2C di mana majoriti sel ini mempunyai kebolehpayaan untuk hidup dalam media yang disuplemen dengan higromisin. Hal ini kerana sel ini mengekspres gen rintangan terhadap higromisin yang dikod oleh plasmid pKLV-Hygro (Rajah 4.26). Transduksi juga dilakukan ke dalam sel ccRCC OS-LM1B_dCas9-KRAB dan UOK101_dCas9-KRAB. Kedua-dua sel ini juga menjalani proses pemilihan antibiotik higromisin yang sama. Sel selanjara yang telah berjaya ditransduksi diperkenalkan sebagai sel ccRCC_NTC dan sel ccRCC_iMEF2C.



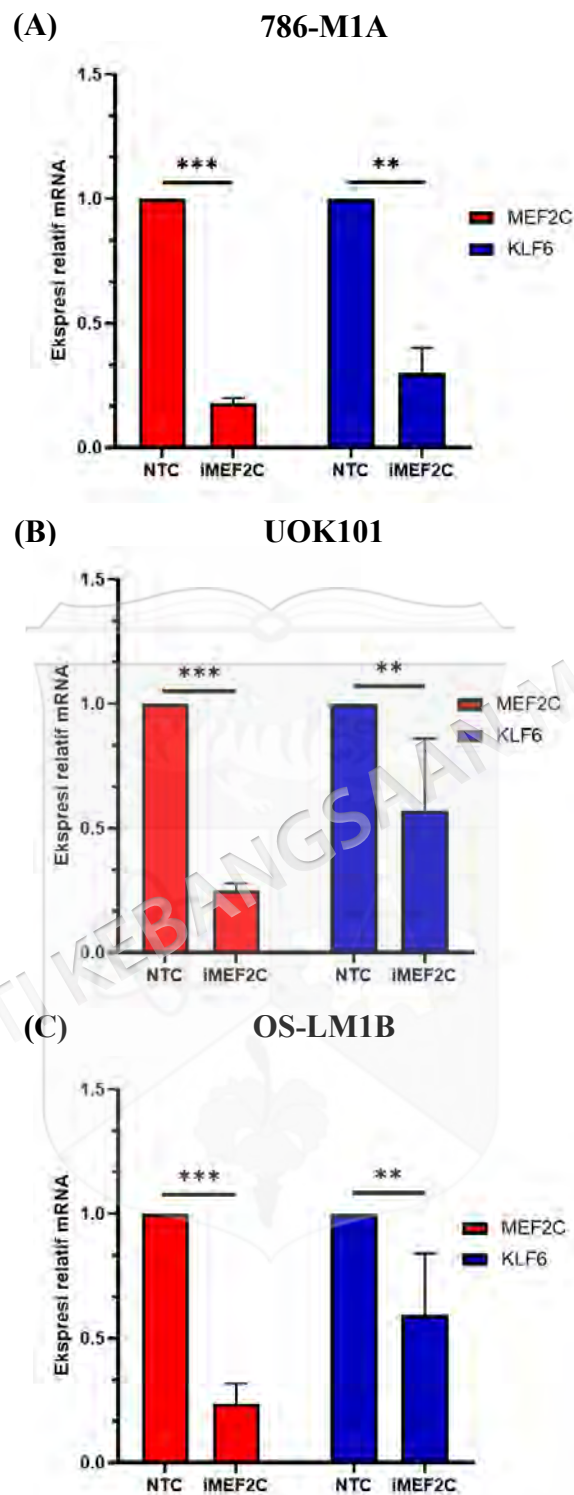
Rajah 4.26

Sel 786-M1A_dCas9-KRAB yang telah ditransduksi dan berjaya dalam pemilihan antibiotik higromisin 1000 $\mu\text{g/mL}$. (A) Sel yang tidak ditransduksi. (B) Sel yang ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_NTC. (C) Sel yang ditransduksi dengan plasmid pKLV-Hygro_iMEF2C. Magnifikasi 4X.

4.3.2 Ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* berkurang dalam sel janaan menggunakan teknologi CRISPRi.

Bagi menyiasat sama ada penenyapan faktor transkripsi *MEF2C* berupaya untuk mengaruh pengekspresan *KLF6* dalam sel ccRCC, analisis qPCR telah dijalankan. Sekiranya faktor transkripsi *MEF2C* berperanan sebagai pengawalatur transkripsi bagi *KLF6*, penenyapan *MEF2C* akan menyebabkan penurunan dalam tahap ekspresi *KLF6*. Setelah proses penjanaan sel ccRCC yang mengalami penenyapan ekspresi *MEF2C* tamat, RNA daripada setiap kumpulan sel telah diekstrak, cDNA disintesis daripada RNA dan seterusnya digunakan dalam analisis qPCR bagi melihat ekspresi *MEF2C* dan *KLF6*.

Hasil analisis qPCR mendapati penindasan gen *MEF2C* dengan menggunakan teknologi CRISPRi dalam sel 786-M1A menyebabkan pengurangan tahap ekspresi *MEF2C* sebanyak 60% berbanding dengan NTC. Hasil analisis qPCR juga menunjukkan pengurangan ekspresi *KLF6* sebanyak 50% di dalam sel 786-M1A yang mengalami penindasan gen *MEF2C* berbanding NTC. Korelasi positif antara tahap ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* ini memberi gambaran tentang peranan *MEF2C* sebagai pengawalatur hulu *KLF6* dalam ccRCC. Bagi mendapatkan bukti tambahan, analisis qPCR juga telah dilakukan ke atas sel ccRCC UOK101 dan sel OS-LM1B yang telah mengalami penenyapan *MEF2C*. Dapatan kajian dalam sel UOK101, mencatatkan pengurangan ekspresi *MEF2C* sebanyak 70% berbanding NTC seterusnya mengurangkan tahap ekspresi *KLF6* sebanyak 50%. Hasil yang sama dapat dilihat dalam sel OS-LM1B yang mana ekspresi *MEF2C* menurun sebanyak 75% dan ekspresi *KLF6* menurun sebanyak 45% (Rajah 4.27). Kesimpulannya, *MEF2C* merupakan faktor transkripsi yang mengikat pada wilayah promoter *KLF6* dan berperanan dalam mengaruh pengekspresan gen *KLF6* dalam sel ccRCC.



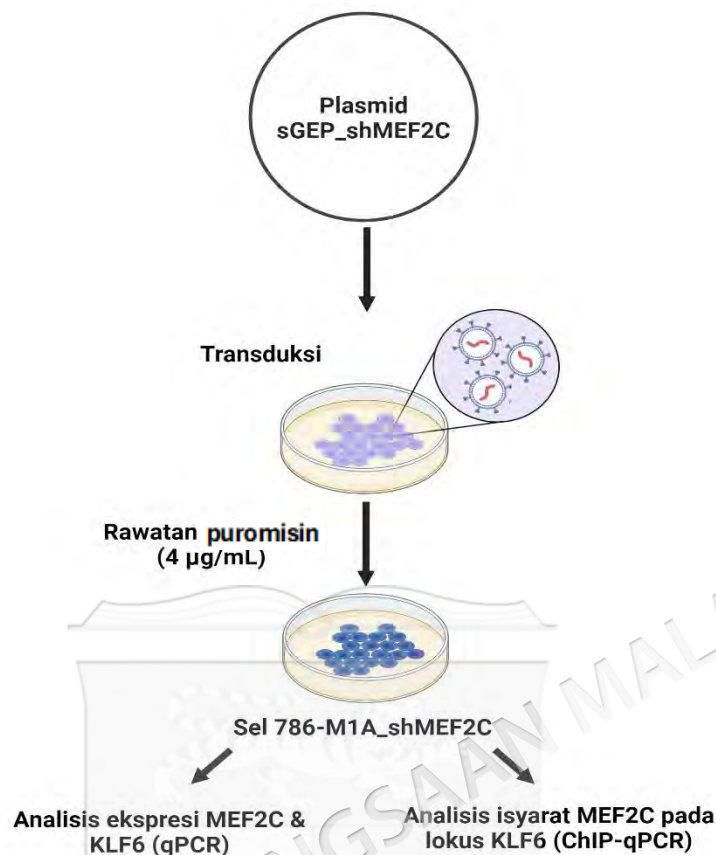
Rajah 4.27

Ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* dalam sel ccRCC yang telah mengalami penenyapan *MEF2C*. Penenyapan gen *MEF2C* dalam sel ccRCC (A) 786-M1A. (B) UOK101 dan (C) OS-LM1B melalui teknologi CRISPRi mengurangkan tahap ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* berbanding dengan NTC. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.0005$. Ujian T.

4.4 PENINDASAN EKSPRESI *MEF2C* DALAM SEL CCRCC MENGGUNAKAN TEKNOLOGI GANGGUAN RNA (RNAi)

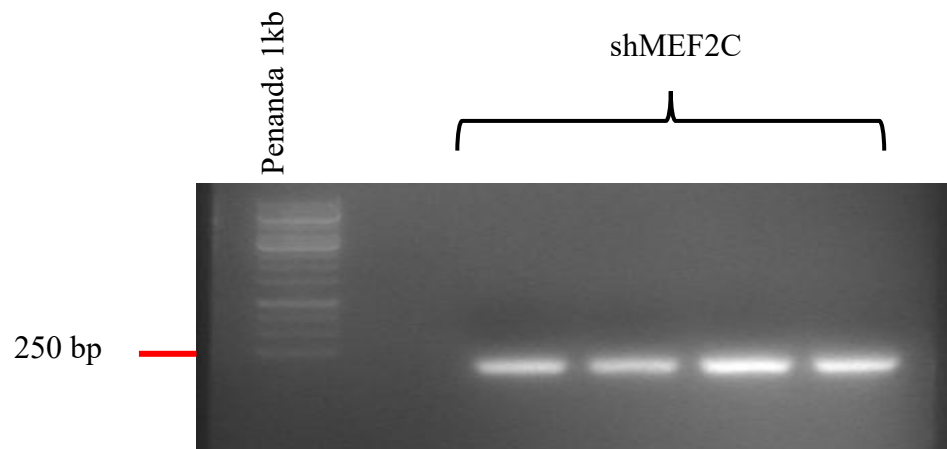
Bagi menentusahkan peranan *MEF2C* dalam mengawal atur ekspresi gen *KLF6*, pendekatan RNAi juga telah digunakan untuk menindas ekspresi *MEF2C* dalam sel ccRCC dan disusuli dengan menjalankan analisis qPCR seperti yang dijelaskan dalam subseksyen 4.3. Seperti yang telah dibincangkan dalam Bab 3, teknologi RNAi seperti yang diterangkan oleh Fellman dan rakan-rakan pada tahun 2013 telah digunakan untuk menindas ekspresi *MEF2C* dalam sel selanjara ccRCC 786-M1A dan OS-LM1B (Fellmann et al. 2013). Penindasan ekspresi gen *MEF2C* dilakukan dengan menggunakan konstruk *short hairpin RNA* yang menyasarkan 3' UTR gen *MEF2C* (sh*MEF2C*). Rajah 4.28 menunjukkan carta alir eksperimen untuk menindas gen *MEF2C* dalam sel selanjara ccRCC.





Rajah 4.28 Carta alir penyenyapan ekspresi *MEF2C* dalam sel ccRCC menggunakan pendekatan RNAi.

Sebagai permulaan, konstruk shMEF2C diamplifikasi menggunakan teknik PCR dan dituliskan melalui purifikasi gel. Jalur DNA pada saiz kira-kira 97 bp yang diperhatikan di atas gel menunjukkan konstruk shMEF2C yang telah berjaya diamplifikasi (Rajah 4.29). Seterusnya, amplicon shMEF2C yang telah dipurifikasi dan plasmid pengekspresan sGEP dicerna dengan enzim *XhoI* dan *EcoRI*. Plasmid sGEP yang telah dicerna dan dirawat dengan AnP diproses menggunakan elektroforesis gel. Selepas penulenan plasmid sGEP, amplicon shMEF2C diligasi ke dalam plasmid sGEP. Jalur terang pada saiz 8 kb menunjukkan kehadiran plasmid ini (Rajah 4.30).



Rajah 4.29 Imej elektroforesis gel bagi konstruk shMEF2C yang berjaya diamplifikasi.



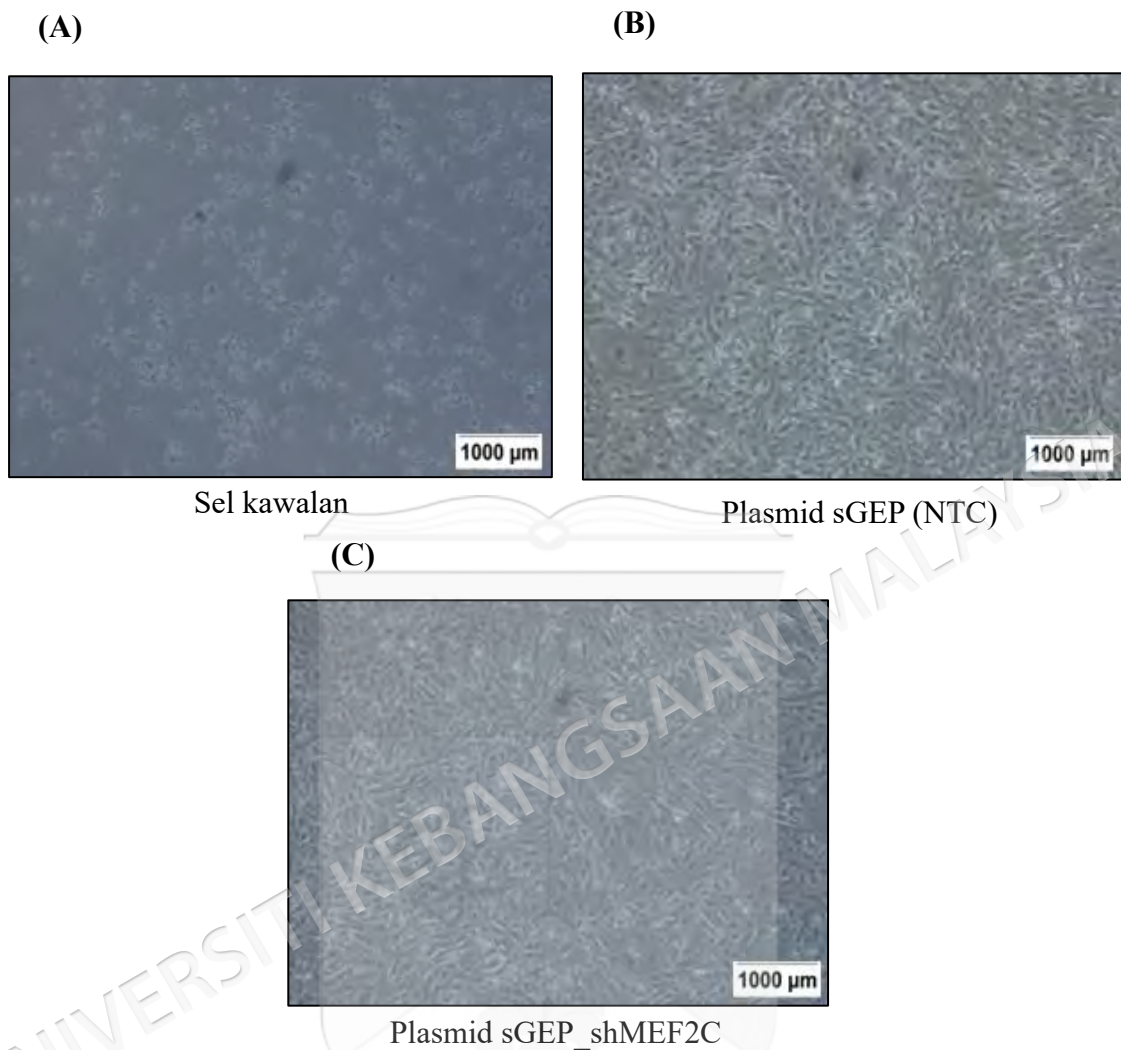
Rajah 4.30 Imej elektroforesis gel bagi plasmid sGEP yang berjaya dicerna dengan enzim *XhoI* dan *EcoRI*, dan dirawat dengan AnP. Imej plasmid yang tidak dicerna (kawalan) tidak disertakan.

Plasmid sGEP dan shMEF2C yang telah dicerna dengan enzim *XhoI* dan *EcoRI* seterusnya diligasi dan ditransformasi ke dalam bakteria. Kehadiran konstruk shMEF2C di dalam plasmid sGEP ini divalidasi dengan menggunakan penjujukan *Sanger*. Rajah 4.31 menunjukkan imej elektroferogram penjujukan konstruk shMEF2C yang berjaya diklon ke dalam plasmid sGEP. Seterusnya, sel ccRCC ditransduksi dengan plasmid sGEP_shMEF2C atau plasmid sGEP (NTC). Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dengan plasmid sGEP_shMEF2C dan plasmid sGEP (NTC) dipilih menggunakan 4 µg/mL puromisin untuk menghasilkan sel selanjut yang stabil. Sel yang ditransduksi dan tidak ditransduksi dirawat dengan puromisin sehingga semua sel yang tidak ditransduksi mati (Rajah 4.32). Sel yang ditransduksi dengan plasmid sGEP (NTC) atau plasmid sGEP_shMEF2C mempunyai kebolehpayaan hidup kerana sel ini mengekspres gen rintangan terhadap puromisin yang dikod oleh plasmid sGEP. Sel 786-M1A yang berjaya ditransduksi dengan plasmid sGEP (NTC) atau plasmid sGEP_shMEF2C seterusnya digunakan dalam eksperimen hiliran.



Rajah 4.31

Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk shMEF2C yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid sGEP.

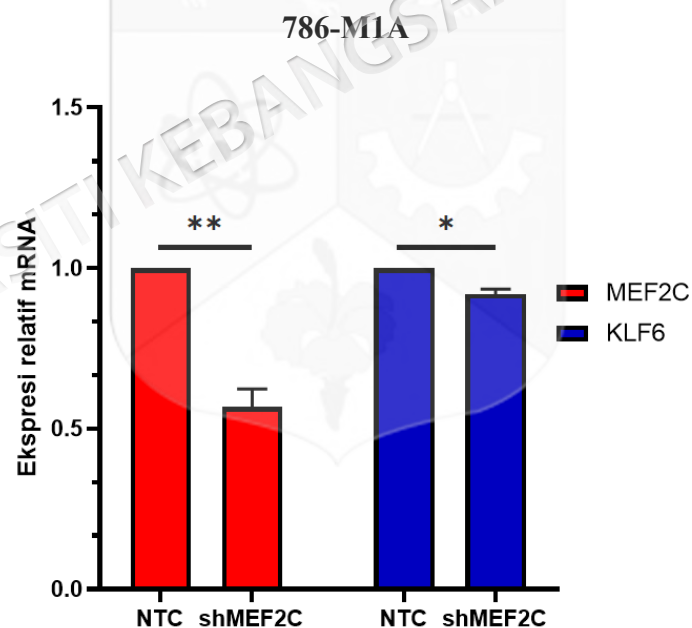


Rajah 4.32

Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dan berjaya dalam pemilihan antibiotik puromisin 4 µg/mL. (A) Sel yang tidak ditransduksi. (B) Sel yang ditransduksi dengan plasmid sGEP kosong. (C) Sel yang ditransduksi dengan plasmid sGEP_shMEF2C. Magnifikasi 4X.

4.4.1 Ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* berkurang dalam sel janaan menggunakan teknologi RNAi.

Seterusnya, analisis qPCR bagi mengenalpasti kesan penenyapan *MEF2C* terhadap tahap ekspresi *KLF6* dalam sel ccRCC 786-M1A dilakukan. Dalam eksperimen ini, RNA daripada sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_shMEF2C telah diekstrak, cDNA disintesis daripada RNA dan seterusnya digunakan dalam analisis qPCR bagi melihat ekspresi *MEF2C* dan *KLF6*. Eksperimen ini memfokuskan pada sel 786-M1A bagi melihat kebolehasilan dapatan kajian pada seksyen 4.3.2 sebelum ini. Hasil kajian mendapati ekspresi *MEF2C* mengalami pengurangan 40% secara signifikan dalam sel 786-M1A berbanding NTC. Pengurangan ekspresi *MEF2C* membawa kepada pengurangan ekspresi *KLF6* sebanyak 5% secara signifikan (Rajah 4.33). Pengurangan ekspresi gen *KLF6* tidak begitu ketara kerana penurunan ekspresi *MEF2C* juga tidak terlalu tinggi.



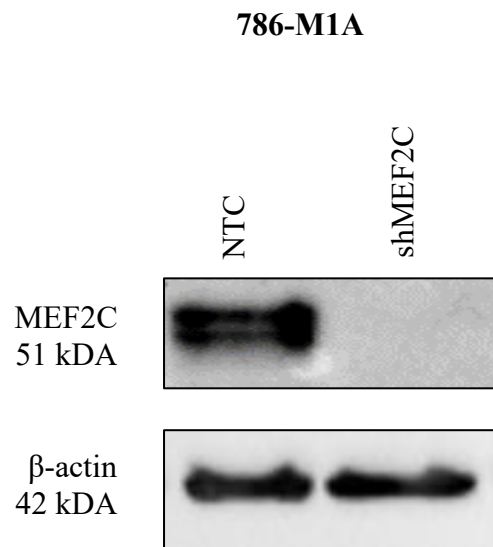
Rajah 4.33

Ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* dalam sel 786-M1A yang telah mengalami penenyapan *MEF2C* menggunakan RNAi. Penenyapan *MEF2C* mengurangkan tahap ekspresi *MEF2C* dan *KLF6* berbanding NTC. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$. Ujian T.

4.4.2 Pengurangan ikatan MEF2C pada wilayah promotor *KLF6* dalam sel ccRCC yang mengalami penindasan ekspresi MEF2C

Dapatan kajian dalam seksyen 4.3 dan 4.4 menunjukkan bahawa penindasan gen MEF2C dalam sel ccRCC, sama ada melalui teknologi CRISPRi atau RNAi, membawa kepada pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6*. Pemerhatian ini memberi bukti akan peranan MEF2C sebagai faktor transkripsi yang mengikat wilayah promotor gen *KLF6* dan seterusnya mengaruh pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC. Seterusnya, eksperimen MEF2C ChIP-qPCR dijalankan untuk menyiasat sama ada faktor transkripsi MEF2C benar-benar mengikat wilayah promotor gen *KLF6* melalui interaksi secara langsung. Bagi eksperimen MEF2C ChIP-qPCR, sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_shMEF2C digunakan.

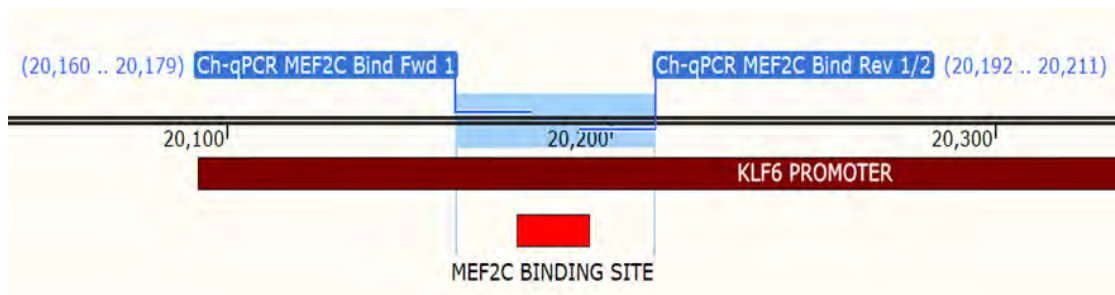
Dalam eksperimen ChIP-qPCR ini, antibodi MEF2C digunakan untuk mengikat dan menarik ke bawah (*pull-down*) protein MEF2C yang diekspres di dalam sel 786-M1A. Sebelum kajian dijalankan, prestasi dan spesifisiti antibodi MEF2C dinilai dengan menggunakan kaedah pembloatan Western. Hasil pemerhatian mendapati bahawa protein MEF2C dapat diblot dalam sampel yang diekstrak daripada sel 786-M1A NTC. Tiada jalur protein MEF2C diperhatikan dalam sampel yang diekstrak daripada sel 786-M1A yang mengalami penindasan gen MEF2C (786-M1A_shMEF2C) (Rajah 4.34). Hasil eksperimen pembloatan Western ini menentusahkan bahawa antibodi MEF2C ini adalah spesifik, mampu mengikat protein MEF2C dengan efisien, dan boleh digunakan untuk eksperimen MEF2C ChIP-qPCR.



Rajah 4.34

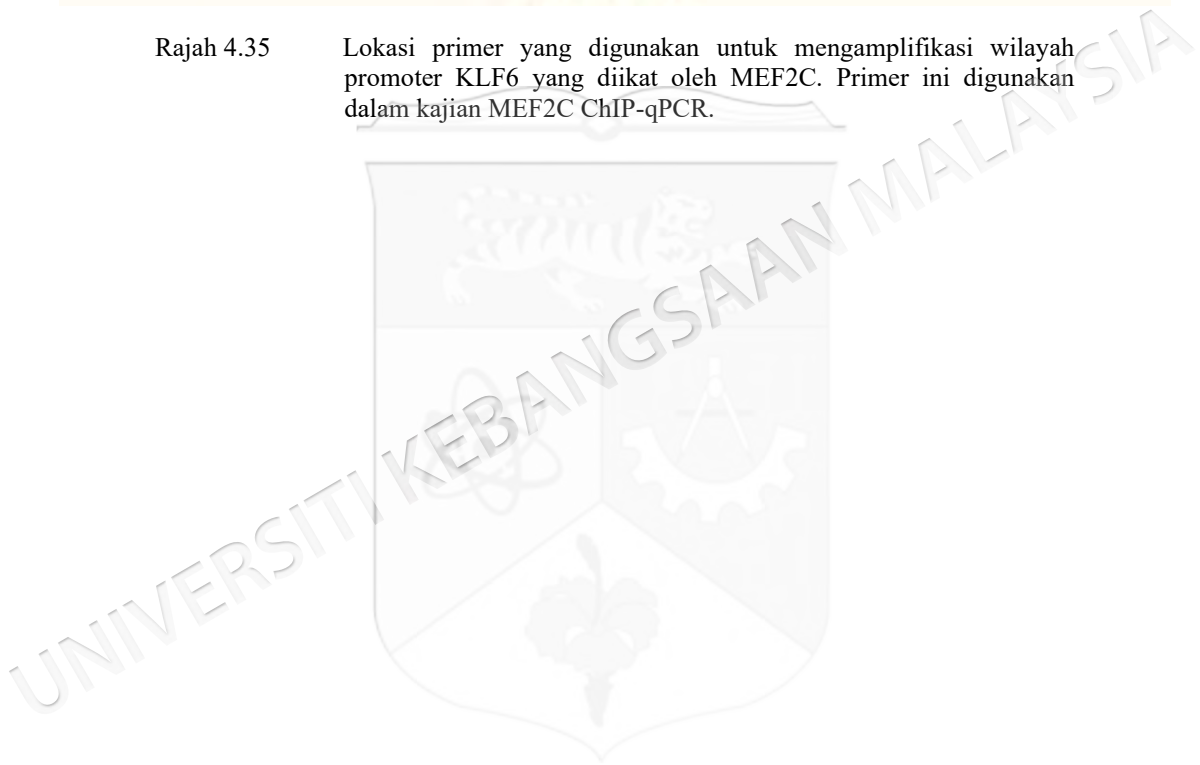
Sel 786-M1A yang ditransduksi dengan plamid sGEP_shMEF2C menunjukkan tahap protein yang rendah berbanding NTC, yang menunjukkan kecekapan RNAi dalam mengurangkan ekspresi MEF2C. Antibodi MEF2C membuktikan keefisienan untuk mengikat protein MEF2C dalam sel ccRCC.

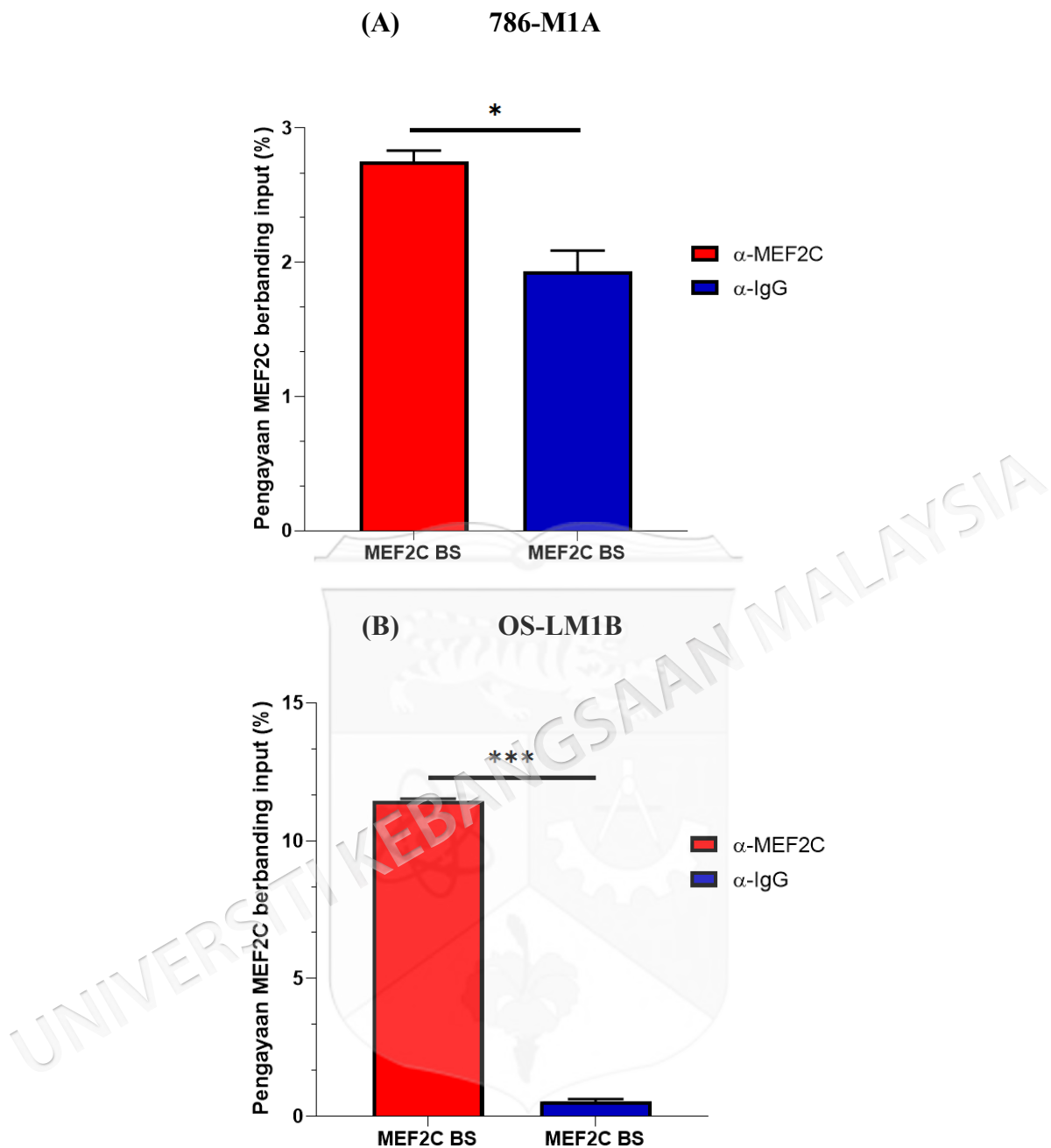
Eksperimen MEF2C ChIP-qPCR yang pertama dijalankan ke atas sel ccRCC 786-M1A dan OS-LM1B asal yang tidak dijalankan sebarang modifikasi genetik. Objektifnya adalah untuk mengoptimumkan kondisi eksperimen MEF2C ChIP-qPCR ini selain menilai keberkesanan antibodi MEF2C untuk mengikat dan menarik ke bawah protein MEF2C berbanding antibodi IgG. Antibodi IgG digunakan dalam eksperimen ChIP sebagai antibodi kawalan di mana antibodi ini tidak akan mengikat sebarang protein. Kedua-dua sel 786-M1A dan OS-LM1B diproses seperti yang diterangkan dalam seksyen 3.4.6. DNA yang telah dimendakkan ini dituliskan dan seterusnya digunakan dalam analisis qPCR dengan menggunakan pasangan primer yang sepadan dengan jujukan motif MEF2C pada wilayah promotor *KLF6*. Rajah 4.35 menunjukkan lokasi primer yang digunakan dalam qPCR. Primer hadapan dan berbalik melekap pada motif pengikat MEF2C dalam kawasan promotor *KLF6*. Hasil kajian MEF2C ChIP-qPCR ini menunjukkan pengayaan isyarat untuk antibodi MEF2C berbanding input dalam sel 786-M1A dan OS-LM1B. Pengayaan isyarat untuk antibodi MEF2C juga adalah lebih tinggi berbanding dengan isyarat antibodi IgG (Rajah 4.36).



Rajah 4.35

Lokasi primer yang digunakan untuk mengamplifikasi wilayah promotor KLF6 yang diikat oleh MEF2C. Primer ini digunakan dalam kajian MEF2C ChIP-qPCR.



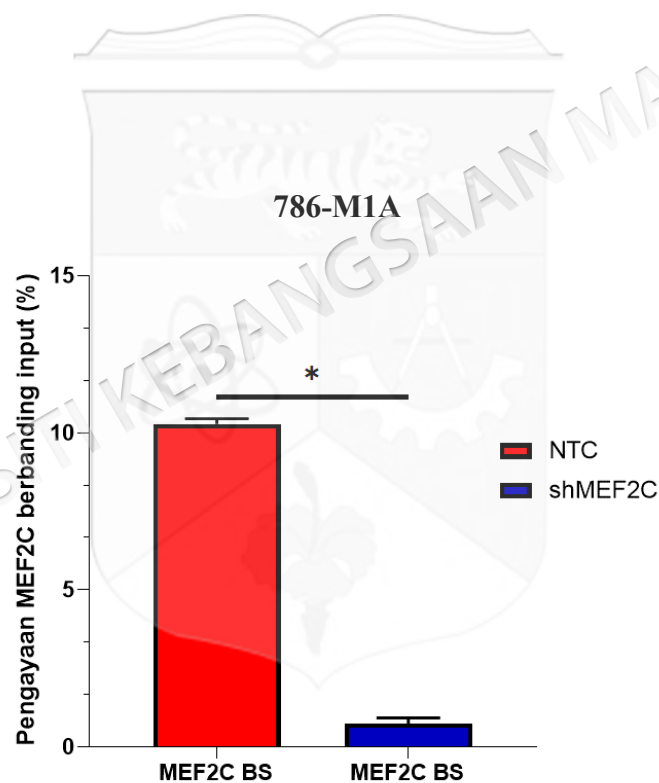


Rajah 4.36

Pengayaan isyarat MEF2C untuk antibodi MEF2C berbanding antibodi IgG dalam sel asal (A) 786-M1A dan (B) OS-LM1B. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.005$, Ujian T.

Bagi meneruskan kajian, MEF2C ChIP-qPCR dijalankan ke atas sel 786-M1A_shMEF2C dan sel 786-M1A_NTC. Sel 786-M1A_NTC dirujuk sebagai sel kawalan. Kedua-dua kumpulan sel ini diproses dengan protokol yang sama seperti sel ccRCC asal sebelum eksperimen ChIP-qPCR dilakukan. Dapatan kajian daripada eksperimen MEF2C ChIP-qPCR mencatatkan penurunan isyarat MEF2C dalam sel

786-M1A_shMEF2C berbanding NTC (Rajah 4.37). Penindasan gen MEF2C dengan menggunakan teknologi RNAi dalam sel 786-M1A mengurangkan ikatan MEF2C pada motif pengikat MEF2C di wilayah promotor KLF6. Justeru, ini menyebabkan pengurangan isyarat MEF2C dalam sel 786-M1A_shMEF2C berbanding dengan NTC apabila MEF2C ChIP-qPCR analisis dijalankan. Perbezaan ketara dapat diperhatikan pada sel NTC di mana pengayaan isyarat MEF2C berbanding input adalah lebih tinggi di motif pengikat MEF2C pada wilayah promotor *KLF6*. Secara kesimpulannya, MEF2C adalah antara faktor transkripsi yang berperanan dalam mengaruh pengekspresan gen *KLF6* melalui ikatan lansung atau interaksi fizikal di wilayah promotor gen *KLF6*.

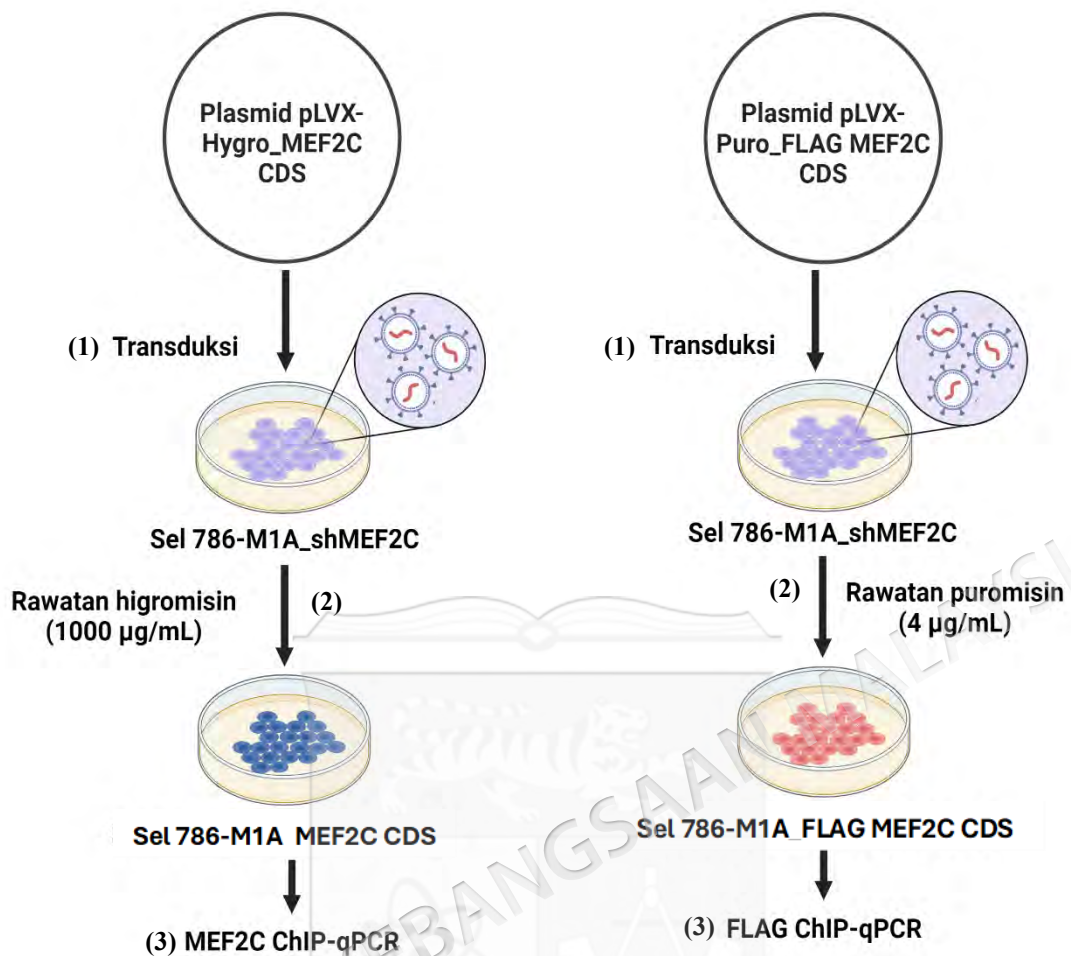


Rajah 4.37

Isyarat MEF2C berkurang dalam sel 786-M1A yang mengalami penenyapan *MEF2C* berbanding sel kawalan. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, Ujian T.

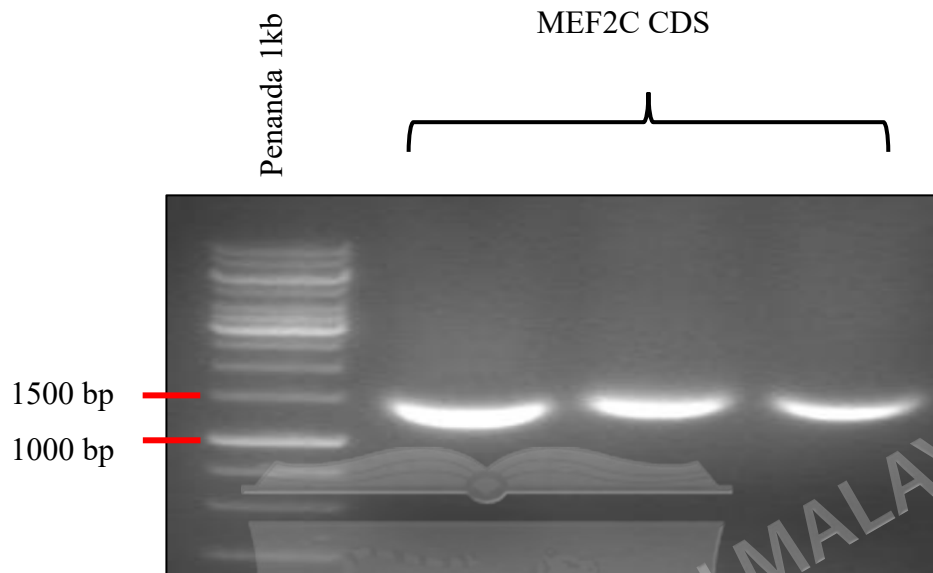
4.5 PENGEKSPRESAN EKSOGENUS *MEF2C* DALAM SEL CCRCC

Dapatan kajian penindasan gen *MEF2C* dalam subseksyen sebelum ini membuktikan peranan *MEF2C* sebagai faktor transkripsi yang mengaruh ekspresi gen *KLF6* dalam ccRCC. Bagi menyokong dan mengukuhkan lagi hasil penemuan ini, eksperimen pemulihan dilaksanakan dengan memperkenalkan semula eksogenus *MEF2C* (*MEF2C* CDS – *coding sequence*) ke dalam sel 786-M1A yang telah ditransduksi dengan sh*MEF2C*. *MEF2C* CDS diperkenalkan melalui dua cara. Kaedah pertama adalah dengan menggunakan plasmid pLVX-Hygro_*MEF2C* CDS yang ditransduksi ke dalam sel 786-M1A_sh*MEF2C*. Kaedah kedua adalah dengan menambah penanda FLAG pada konstruk *MEF2C* CDS. FLAG *MEF2C* CDS ini diklon ke dalam plasmid pLVX-Puro (pLVX-Puro_FLAG *MEF2C* CDS) yang kemudiannya ditransduksi ke dalam sel 786-M1A_sh*MEF2C*. Rajah 4.38 menunjukkan carta alir bagi eksperimen pengekspresan *MEF2C* CDS dan FLAG *MEF2C* CDS ke dalam sel 786-M1A_sh*MEF2C*.



Rajah 4.38. Carta alir pengekspresan MEF2C CDS dan FLAG MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A yang telah mengalami penenyapan gen MEF2C.

Bagi menghasilkan plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS, konstruk MEF2C CDS diamplifikasi terlebih dahulu daripada templat plasmid tetO-MEF2C yang diperolehi daripada repositori Addgene. MEF2C CDS yang telah diamplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis gel. Imej pada elektroforesis gel menunjukkan jalur DNA yang bersaiz lebih kurang 1400 bp yang sepadan dengan saiz jangkaan konstruk MEF2C CDS (Rajah 4.39). Konstruk ini kemudiannya dituliskan sebelum diligasi ke dalam plasmid pLVX-Hygro. Plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS ditransformasi ke dalam bakteria dan kemudiannya penjujukan *Sanger* dijalankan ke atas plasmid yang diekstrak untuk menentukan kejayaan proses pengklonan ini (Rajah 4.40). Imej elektroferogram penjujukan mengesahkan kehadiran konstruk MEF2C CDS yang diligasi ke dalam plasmid pLVX- Hygro.



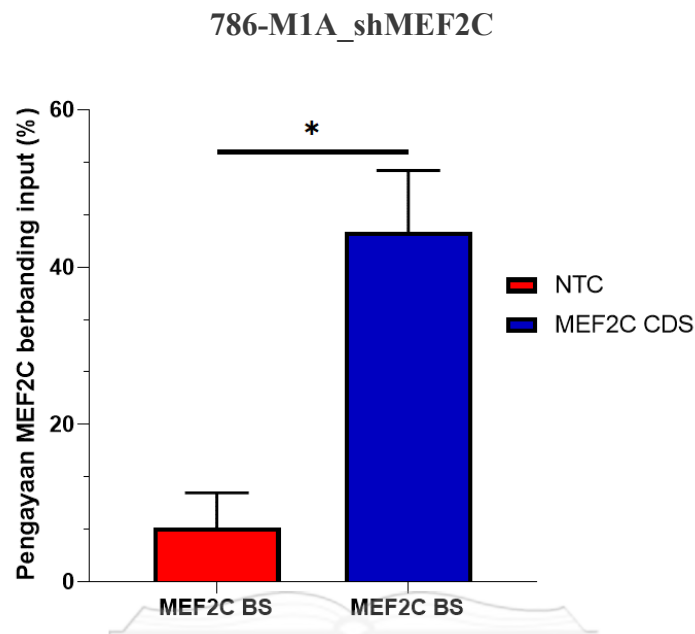
Rajah 4.39 Imej elektroforesis gel bagi konstruk MEF2C CDS yang berjaya diamplifikasi.



Rajah 4.40 Elektroferogram penjujukan mengesahkan konstruk MEF2C CDS yang telah berjaya diamplifikasi dan diligasi ke dalam plasmid pLVX-Hygro. Bulatan merah menunjukkan kedudukan kodon pemula ATG bagi konstruk MEF2C CDS.

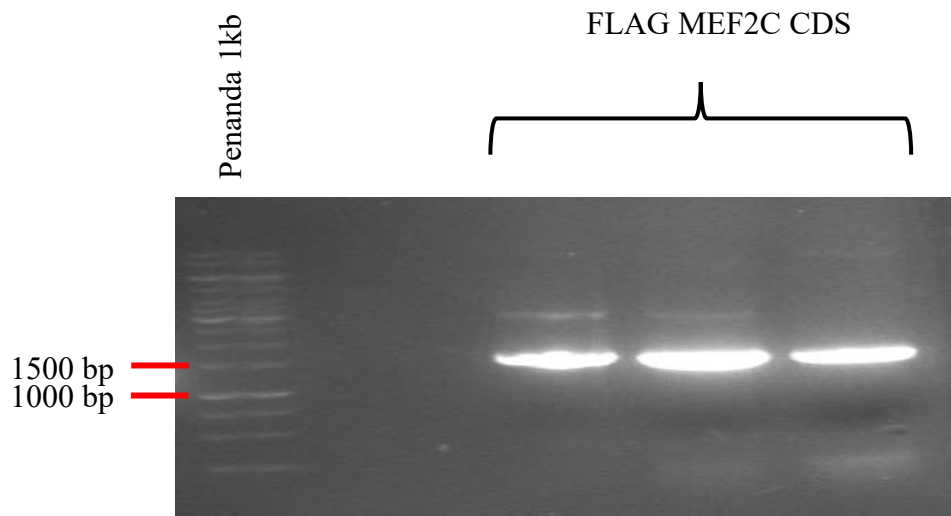
Seterusnya, sel 786-M1A_shMEF2C ditransduksi dengan plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS atau plasmid kosong pLVX-Hygro (NTC). Sel 786-M1A_shMEF2C yang telah ditransduksi dengan plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS dan plasmid kosong pLVX-Hygro (NTC) dipilih menggunakan 1000 µg/mL higromisin untuk menghasilkan sel selanjut yang stabil. Satu telaga plat telaga 6 yang mengandungi sel 786-M1A_shMEF2C juga disediakan sebagai sel kawalan dalam proses pemilihan. Sel-sel ini dirawat sehingga semua sel kawalan mati. Sel 786-M1A_shMEF2C + pLVX-Hygro (NTC) dan sel 786-M1A_shMEF2C + MEF2C CDS digunakan dalam analisis MEF2C ChIP-qPCR. Kedua-dua kumpulan sel ini diproses dengan protokol yang sama seperti sel ccRCC asal sebelum eksperimen ChIP-qPCR dilakukan.

Dapatan kajian daripada eksperimen MEF2C ChIP-qPCR menunjukkan pengekspresan MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A_shMEF2C yang mengalami penindasan gen MEF2C membawa kepada peningkatan pengayaan isyarat MEF2C berbanding NTC (Rajah 4.41). Pengekspresan MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A_shMEF2C meningkatkan pengikatan protein MEF2C pada wilayah promoter *KLF6* yang seterusnya meningkatkan pengayaan isyarat MEF2C seperti yang diperhatikan pada Rajah 4.41.



Rajah 4.41 Isyarat MEF2C bertambah dalam sel 786-M1A yang mengalami pengenalan eksogen MEF2C berbanding NTC dalam MEF2C ChIP-qPCR. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. * $P \leq 0.05$, Ujian T.

Bagi mengukuhkan dapatan kajian yang ditunjukkan pada Rajah 4.41, eksperimen FLAG ChIP-qPCR dilakukan. Elemen yang membezakan MEF2C ChIP-qPCR dan FLAG ChIP-qPCR adalah jenis antibodi yang digunakan untuk mengikat dan *pull-down* protein MEF2C. Dalam eksperimen FLAG ChIP-qPCR, penanda FLAG digabungkan pada hujung 5' MEF2C CDS sebelum kodon pemula melalui teknik PCR. Fragmen FLAG MEF2C CDS diamplifikasi daripada plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS dianalisis menggunakan elektroforesis gel. Imej pada elektroforesis gel menunjukkan jalur DNA bersaiz kira-kira 1400 bp yang sepadan dengan saiz jangkaan fragmen FLAG MEF2C CDS (Rajah 4.42). Fragmen FLAG MEF2C CDS yang dituliskan diligasi ke dalam plasmid pLVX-Puro.



Rajah 4.42 Imej elektroforesis gel bagi konstruk FLAG MEF2C CDS yang berjaya diampifikasi daripada plasmid pLVX-Hygro_MEF2C CDS.

Plasmid pLVX-Puro + FLAG MEF2C CDS dan pLVX-Puro kosong (NTC) ditransformasi ke dalam bakteria dan kemudiannya plasmid ditentukan menggunakan penjujukan *Sanger* (Rajah 4.43). Imej elektroferogram penjujukan mengesahkan kehadiran fragmen FLAG MEF2C CDS yang telah berjaya diligasi ke dalam plasmid pLVX- Puro.

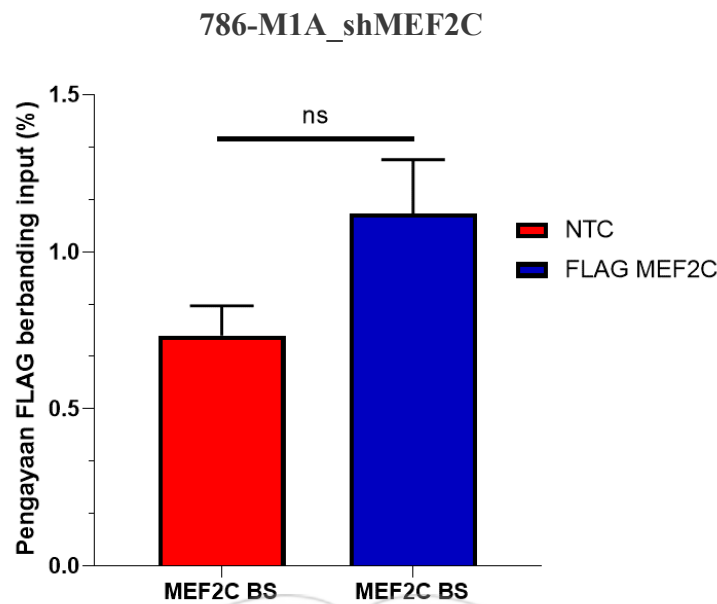


Rajah 4.43 Elektroferogram penjujukan mengesahkan kehadiran FLAG MEF2C CDS yang telah berjaya diligasi ke dalam plasmid pLVX- Puro.

Seterusnya, sel 786-M1A_shMEF2C ditransduksi dengan plasmid pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS atau plasmid kosong pLVX-Puro (NTC). Sel 786-M1A yang telah ditransduksi dengan plasmid pLVX-Puro_FLAG MEF2C CDS dan plasmid kosong pLVX-Puro (NTC) dipilih menggunakan 4 µg/mL puromisin untuk menghasilkan sel selanjut yang stabil. Sel 786-M1A_shMEF2C + pLVX-Puro (NTC) dan sel 786-M1A_shMEF2C + FLAG MEF2C CDS digunakan dalam analisis FLAG ChIP-qPCR. Kedua-dua kumpulan sel ini diproses dengan protokol yang sama seperti sel ccRCC asal sebelum eksperimen ChIP-qPCR dilakukan.

Dapatan kajian daripada eksperimen FLAG ChIP-qPCR menunjukkan pengekspresan FLAG MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A_shMEF2C yang mengalami penindasan gen MEF2C membawa kepada peningkatan pengayaan isyarat FLAG berbanding NTC (Rajah 4.44). Pengekspresan FLAG MEF2C CDS ke dalam sel 786-M1A_shMEF2C meningkatkan pengikatan protein FLAG pada wilayah promotor *KLF6* yang seterusnya meningkatkan pengayaan isyarat FLAG seperti yang diperhatikan pada Rajah 4.44.

Secara kesimpulannya, berdasarkan hasil pemerhatian penindasan gen MEF2C dalam sel ccRCC sama ada melalui teknologi CRISPRi atau RNAi, membawa kepada pengurangan tahap ekspresi gen *KLF6*. Selain itu, analisis pengisyratan MEF2C dan FLAG dalam eksperimen pemulihan yang telah dijalankan dalam sel 786-M1A_shMEF2C menunjukkan interaksi fizikal protein MEF2C yang mengikat pada wilayah promotor gen *KLF6*. Pemerhatian ini membuktikan akan peranan MEF2C sebagai faktor transkripsi yang mengikat wilayah promotor gen *KLF6* dan seterusnya mengaruh pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC.



Rajah 4.44

Isyarat MEF2C bertambah dalam sel 786-M1A yang mengalami pengenalan eksogen MEF2C berbanding sel kawalan dalam FLAG ChIP-qPCR. MEF2C BS merujuk kepada lokasi motif pengikat MEF2C. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, Ujian T.

4.6 KESAN PENYENYAPAN *MEF2C* KE ATAS SEL CCRCC IN VITRO

KLF6 merupakan faktor transkripsi yang ekspresinya dalam ccRCC dikawal oleh penggalak super yang luas, dan berperanan dalam patogenesis serta pertumbuhan sel ccRCC. Analisis motif DNA mendapati motif pengikat MEF2 dalam promoter KLF6, dengan data RNA-seq TCGA menunjukkan korelasi positif antara ekspresi KLF6 dan MEF2C, yang membawa kepada kajian peranan MEF2C dalam mengawal ekspresi KLF6. Hasil kajian dalam seksyen 4.3 dan 4.4 membuktikan bahawa MEF2C adalah faktor transkripsi yang mengikat pada wilayah promoter dan mengaktifkan transkripsi gen KLF6 dalam ccRCC.

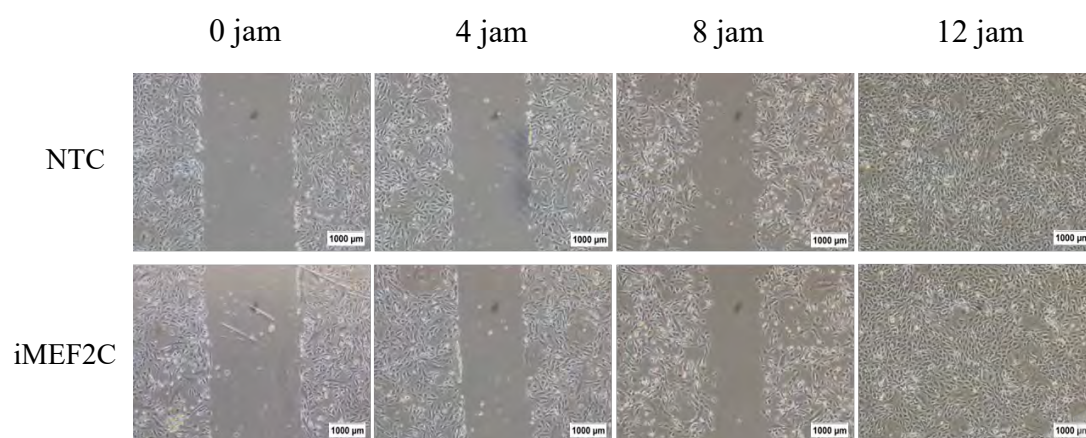
Seterusnya, untuk menilai kesan fenotip penyenyapan ekspresi faktor transkripsi MEF2C dalam model in-vitro ccRCC, asai migrasi sel, asai viabiliti sel dan asai pembentukan koloni telah dilakukan. Kesemua asai ini menggunakan sel yang mengalami penyenyapan ekspresi MEF2C iaitu 786-M1A_iMEF2C untuk menyiasat kefungsi sel dalam ccRCC. Sel 786-M1A_NTC adalah sel kawalan dalam kesemua eksperimen ini.

4.6.1 Penyenyanapan *MEF2C* tidak memberikan kesan dalam asai migrasi sel

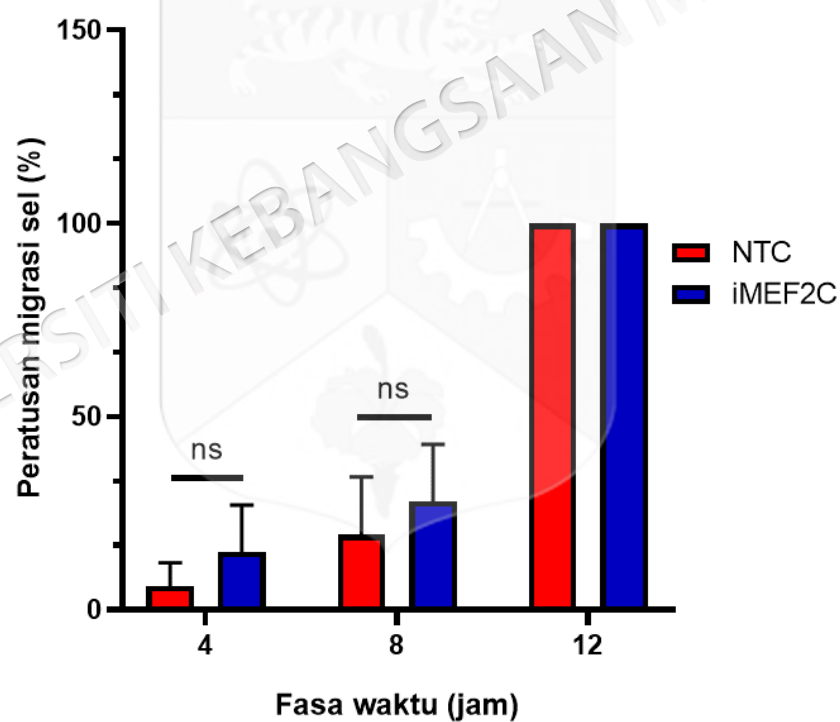
Dalam asai migrasi sel, sel 786-M1A_iMEF2C dan 786-M1A_NTC digunakan bagi melihat kebolehan sel yang telah mengalami penyenyanapan *MEF2C* berproliferasi. Dua kumpulan sel ini diplat dan diinkubasi sehingga mencapai konfluensi 100%. Sel ini kemudiannya ditoreh secara menegak bagi membentuk ruangan untuk membolehkan sel berproliferasi. Jarak proliferasi sel diperhatikan selama 12 jam. Imej dirakam pada setiap 4 jam dengan menggunakan mikroskop Nikon TS100.

Pemerhatian dilakukan menggunakan mikroskop terbalik pada pembesaran 4x menunjukkan bahawa kadar migrasi dalam sel yang kehilangan ekspresi *MEF2C* pada 4 jam dan 8 jam lebih cepat berproliferasi berbanding NTC. Selepas 12 jam inkubasi, jarak torehan sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_iMEF2C telah bercantum sepenuhnya. Tambahan pula, analisis migrasi sel menggunakan ImageJ pada 4 jam mencatatkan peningkatan sebanyak 14% secara berbanding NTC. Selain itu, kadar migrasi sel pada 8 jam menunjukkan peningkatan sebanyak 28% berbanding NTC. Namun, perbezaan ini tidak mencapai signifikan statistik. Pada 12 jam, kedua-dua sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C mencapai 100% migrasi, menunjukkan bahawa kesan penyenyanapan *MEF2C* terhadap migrasi sel mungkin bersifat sementara atau tidak cukup untuk memberikan perbezaan yang berkesan dalam jangka masa 12 jam (Rajah 4.45).

(A)



(B)



Rajah 4.45

Kesan migrasi sel ke atas sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C. (A) Imej migrasi sel, magnifikasi 4X. (B) Graf menunjukkan kadar peratusan migrasi sel selepas 12 jam. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. ns>0.05. Ujian T.

4.6.2 Penyenyapan *MEF2C* menurunkan tahap viabiliti sel selepas rawatan *sunitinib* dan tidak memberikan kesan signifikan dengan *everolimus*

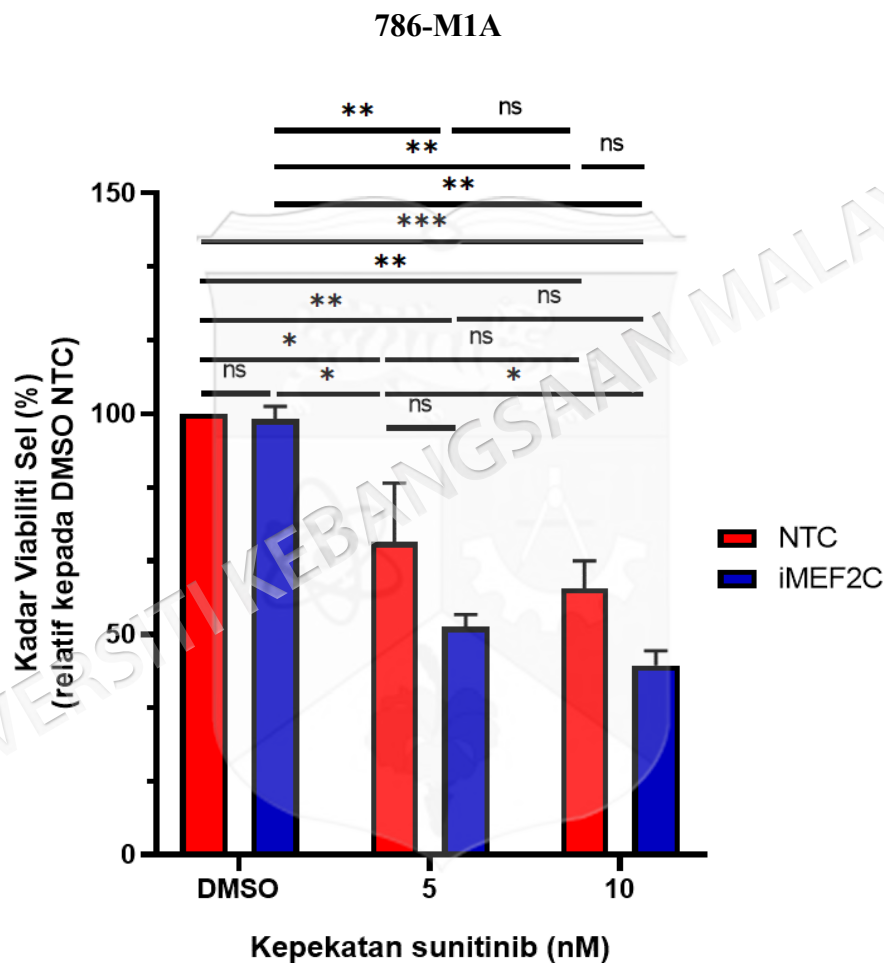
Mekanisma molekul pembentukan saluran darah baharu (angiogenesis) dan hiperaktivasi tapak laluan isyarat mTORC1 adalah penting dalam patogenesis dan pertumbuhan kanser renal. Kaedah rawatan ccRCC yang diluluskan untuk kegunaan klinikal pada masa kini antaranya memfokuskan kepada perencatan kedua mekanisme yang disebut. Bagi menilai sama ada penyenyapan ekspresi *MEF2C* dalam sel ccRCC menurunkan kadar pertumbuhan sel dan merangsang kerentanan sel kepada perencat kimia, sel ccRCC dirawat dengan perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus*. *Sunitinib* adalah perencat kimia reseptor *tyrosine kinase* yang terlibat dalam pembentukan saluran darah baharu manakala *everolimus* digunakan sebagai perencat tapak laluan isyarat mTORC1.

Tahap viabiliti sel ccRCC terhadap perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus* ditentukan dengan merawat sel ccRCC ini dengan dos kepekatan yang meningkat. Bagi eksperimen *sunitinib*, sel selanjara 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C, dirawat selama 72 jam dengan dua kepekatan yang berbeza iaitu 5 μ M dan 10 μ M. Sel selanjara yang dirawat dengan DMSO adalah kumpulan kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia *sunitinib*. Asai yang telah dijalankan mendapati bahawa kadar pertumbuhan kedua-dua sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C yang dirawat dengan *sunitinib* mengalami kerentanan yang sama dalam kebergantungan terhadap dos.

Viabiliti sel 786-M1A_NTC terhadap *sunitinib* menurun pada tahap kepekatan yang lebih tinggi. Kepekatan 5 μ M *sunitinib* mencatatkan peningkatan kerentanan sebanyak 70% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Manakala sel 786-M1A_NTC pada kepekatan 10 μ M menunjukkan penurunan viabiliti iaitu kira-kira 40% berbanding dengan sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO.

Selain itu, kadar pertumbuhan sel 786-M1A_iMEF2C yang dirawat dengan *sunitinib* juga menurun pada tahap kepekatan yang lebih tinggi. Kepekatan 5 μ M *sunitinib* menurunkan viabiliti sel sebanyak 50% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO secara signifikan. Manakala sel 786-M1A_iMEF2C pada

kepekatan 10 μ M mencatatkan peningkatan kerentanan paling ketara iaitu sebanyak 40% berbanding dengan sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO secara signifikan (Rajah 4.46). Pemerhatian daripada eksperimen ini menunjukkan bahawa penyasaran MEF2C dalam sel ccRCC setelah direncat menggunakan perencat angiogenesis menurunkan tahap viabiliti atau pertumbuhan sel. Selain itu, penyasaran MEF2C juga meningkatkan kerentanan sel terhadap perencat kimia *sunitinib*.



Rajah 4.46 Kesan rawatan *sunitinib* ke atas asai viabiliti sel selepas 72 jam dalam sel ccRCC. Sel 786-M1A_iMEF2C mencatatkan penurunan tahap viabiliti sel setelah dirawat dengan perencat kimia *sunitinib* pada tahap kepekatan yang lebih tinggi berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Ujian dilakukan sebanyak dua kali. ns>0.05, *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.005, ***P $\leq$ 0.0005, ANOVA dua hala.

Seterusnya, untuk eksperimen *everolimus*, sel selanjar 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C telah digunakan. Kedua-dua sel ccRCC ini dirawat selama 72 jam dengan dua kepekatan yang berbeza iaitu 5 μ M dan 10 μ M. Sama seperti *sunitinib*, sel selanjar yang dirawat dengan DMSO merupakan sel kawalan di mana DMSO digunakan untuk melarutkan perencat kimia *everolimus*. Rawatan *everolimus* ke atas sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C mencatatkan peningkatan kadar kerentanan sel selari dengan pertambahan kepekatan *everolimus*. Namun, hasil analisis statistik mendapati bahawa perbezaan ini tidak mencapai tahap signifikan ($P > 0.05$).

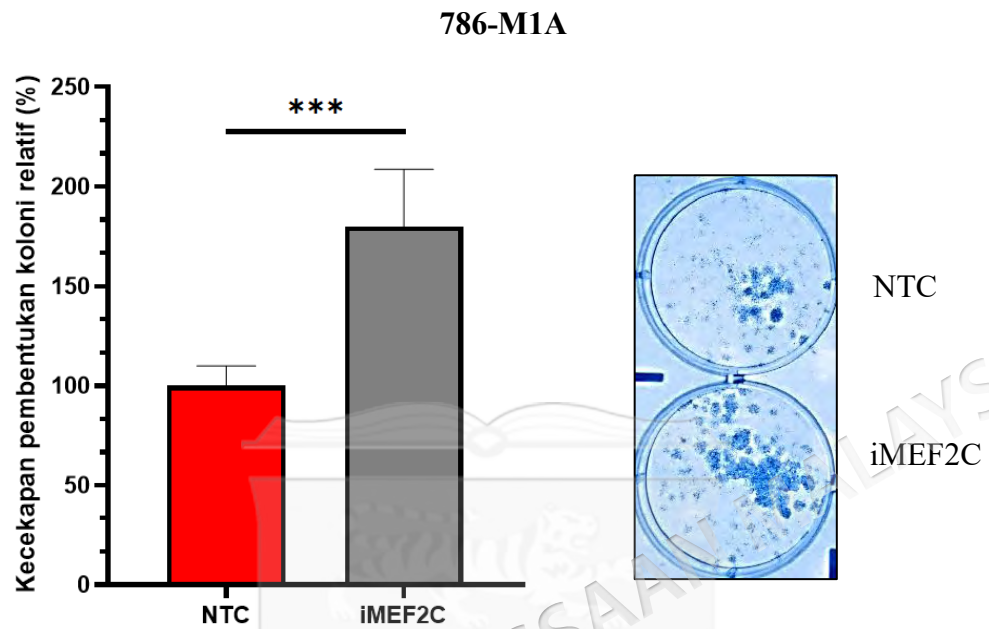
Di samping itu, sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan 5 μ M *everolimus* mengalami penurunan sebanyak 15% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Manakala tahap kerentanan sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan 10 μ M *everolimus* menunjukkan peningkatan sebanyak 68% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Viabiliti sel 786-M1A_iMEF2C yang dirawat dengan DMSO dilihat tidak mengalami penurunan berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Rawatan 5 μ M *everolimus* ke atas sel 786-M1A_iMEF2C merekodkan penurunan kadar viabiliti sel sebanyak kira-kira 15% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Selain itu, tiada perbezaan pada tahap viabiliti sel terhadap sel 786-M1A_iMEF2C dan 786-M1A_NTC yang dirawat dengan rawatan 5 μ M *everolimus*. Manakala rawatan 10 μ M *everolimus* ke atas sel 786-M1A_iMEF2C merekodkan penurunan viabiliti sebanyak 66% berbanding sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO (Rajah 4.47).

Kesimpulannya, penyenyapan MEF2C meningkatkan sensitiviti kerentanan sel ccRCC terhadap rawatan *sunitinib*. Sel yang mengalami penyenyapan MEF2C menunjukkan penurunan viabiliti sel yang signifikan apabila dirawat dengan *sunitinib*, berbanding dengan sel 786-M1A_NTC yang dirawat dengan DMSO. Bagi rawatan dengan *everolimus*, walaupun terdapat trend penurunan viabiliti sel, perbezaan tersebut tidak mencapai signifikan statistik. Ini menunjukkan bahawa penyenyapan MEF2C berpotensi meningkatkan kesan sitotoksik *sunitinib*, dan mungkin memberikan kesan tambahan terhadap rawatan *everolimus*, walaupun kajian lanjut diperlukan untuk mengesahkan keberkesanan ini.

4.6.3 Penyenyanapan *MEF2C* meningkatkan potensi pembentukan koloni dalam sel in vitro.

Asai pembentukan koloni adalah asai untuk menentukan kemampuan satu sel tunggal untuk bertumbuh dan membentuk koloni sel. Sel 786-M1A_NTC dan sel 786-M1A_iMEF2C digunakan dalam eksperimen. Eksperimen ini bermula dengan memplatkan sebanyak 1×10^3 sel/telaga. Sel 786-M1A_NTC adalah sel kawalan dalam eksperimen ini. Selepas tujuh hari rawatan, koloni yang berwarna ungu diperhatikan menggunakan mata kasar dan kemudiannya dielusi bagi menentukan bacaan serapan relatif. Pemerhatian menggunakan mata kasar mendapati bahawa semakin pekat warna noda kristal ungu, semakin banyak koloni yang bertumbuh, dan semakin tinggi serapan relatif yang dihasilkan.

Selepas tujuh hari, hasil daripada pemerhatian mata kasar mendapati sel yang mengalami penyenyanapan *MEF2C* mempunyai noda warna ungu yang lebih pekat berbanding NTC. Manakala sel NTC mempunyai noda warna ungu yang lebih cerah dan tompokan koloni yang sedikit. Sel 786-M1A_iMEF2C mencatatkan peningkatan kemampuan untuk membentuk koloni sebanyak 75% secara signifikan berbanding sel NTC. Rajah 4.48 menunjukkan carta graf hasil kajian daripada asai pembentukan koloni.



Rajah 4.48

Potensi pembentukan koloni dalam sel 786-M1A_NTC dan 786-M1A_iMEF2C. Kesemua sel telah diplat dan dikultur dalam plat telaga 6 selama tujuh hari. Selepas itu, sel diwarnakan dengan pewarna kristal ungu dan serapan relatif telah ditentukan. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali. *** $P \leq 0.0005$, Ujian T.

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 MODULASI EPIGENETIK DALAM SEL CCRCC

ccRCC merupakan subjenis kanser buah pinggang yang paling kerap didiagnosis iaitu merangkumi kira-kira 75% daripada keseluruhan kes kanser buah pinggang di seluruh dunia. ccRCC tahap akhir adalah sangat agresif dan mempunyai kemampuan bermetastasis yang tinggi selain mempunyai kadar rintangan yang tinggi terhadap rawatan radioterapi dan kemoterapi. Daripada kajian terdahulu, perubahan molekul merupakan salah satu punca utama patogenesis kanser buah pinggang. Perubahan molekul dari segi genetik merujuk kepada mutasi dalam gen, seperti mutasi pada gen VHL, yang mengakibatkan protein VHL tidak berfungsi dengan baik. Seterusnya menyebabkan pengaktifan laluan HIF2 α secara tidak terkawal. Ini membawa kepada peningkatan angiogenesis, pertumbuhan tumor dan metastasis. Manakala perubahan epigenetik melibatkan modifikasi ekspresi gen tanpa perubahan pada jujukan DNA itu sendiri, seperti melalui metilasi DNA, pengubahsuaian histon atau pengawalan RNA bukan kod (Moore, Le & Fan 2013). Perubahan epigenetik ini boleh menyenyapkan gen-gen penindas tumor atau mengaktifkan onkogen, menyumbang kepada perkembangan ccRCC.

Gabungan perubahan genetik dan epigenetik ini menyebabkan gangguan dalam pengawalan selular termasuk peningkatan proliferasi sel, penurunan apoptosis serta daya tahan terhadap mekanisme kawalan tubuh, sekaligus mempercepatkan perkembangan kanser buah pinggang dan mempengaruhi respons terhadap terapi yang diberikan. Walaupun rawatan dan pengurusan ccRCC semakin terkehadapan, prognosis ccRCC masih dianggap lemah disebabkan oleh relaps atau pertumbuhan semula kanser yang berulang disamping kadar metastasis yang tinggi. Justeru, pemahaman yang

menyeluruh tentang mekanisme molekul yang mengawal pertumbuhan dan perkembangan ccRCC, sama ada dari aspek genetik atau epigenetik, boleh membuka jalan untuk pembangunan terapi tersasar (*targeted therapy*) dan perubatan jitu (*precision treatment*) baharu yang lebih efisien.

Walaupun bagaimanapun, heterogeniti yang tinggi dalam ccRCC menyulitkan penentuan rawatan yang paling efektif kerana populasi sel mungkin menunjukkan respon yang berbeza terhadap terapi, sekaligus merumitkan strategi rawatan yang berkesan. Faktor penting yang menyumbang kepada pembentukan ccRCC adalah penyahaktifan *VHL* yang dianggap sebagai *truncal event* dalam patogenesis ccRCC. Mutasi dalam gen *VHL* adalah perubahan genetik yang kerap ditemui iaitu kira-kira dalam 90% pesakit ccRCC. Walaupun penyahaktifan *VHL* adalah gangguan genetik awal yang memacu pertumbuhan ccRCC, kehadiran mutasi tambahan dalam gen seperti *SETD2*, *PBRM1* dan *BAP1* seterusnya menyokong kepada perkembangan dan pembentukan heterogeniti ccRCC yang lebih kompleks.

Seperti yang telah dibincangkan, perubahan genetik dan epigenetik memainkan peranan utama dalam perkembangan ccRCC, di mana gen seperti *PBRM1*, *SETD2* dan *BAP1* kerap mengalami mutasi dan menyumbang kepada patogenesis jenis kanser ini. Gangguan homeostasis dalam epigenetik mungkin berpunca daripada penyahkawalaturan pengubah epigenetik *PBRM1*, *SETD2* dan *BAP1* terletak di kawasan lengan pendek kromosom manusia 3. Pemadaman struktur dan fungsi kawasan ini dikenali sebagai “kehilangan kromosom 3p” dan telah disahkan sebagai ciri khas tumorigenik yang lazimnya berlaku dalam ccRCC. *PBRM1* adalah subunit daripada kompleks pembentukan kromatin PBAF SWI/SNF. Kompleks ini bertanggungjawab untuk mengawal kitaran sel dan ekspresi mediator penuaan replikatif. *SETD2* adalah gen yang mengekodkan kepada enzim *histone methyltransferase* manakala gen *BAP1* mengekod kepada enzim *histone deubiquitinase*. Mutasi dalam *PBRM1*, yang menjejaskan kompleks pemodelan kromatin SWI/SNF, serta mutasi dalam *SETD2* yang mempengaruhi metilasi histon H3K36, dan *BAP1* yang mengawal ubiquitinasi histon H2A, semuanya menyumbang kepada ketidakstabilan genomik dan ekspresi gen yang tidak terkawal dalam ccRCC.

Ketiga-tiga elemen epigenetik ini berfungsi bersama-sama dengan komponen epigenetik yang lain untuk mengekalkan kestabilan genomik dan mengawal atur ekspresi gen yang penting bagi homeostasis sel. Apabila mutasi berlaku dalam gen-gen seperti *PBRM1*, *SETD2*, dan *BAP1*, fungsi pengawalaturan epigenetik ini terjejas, menyebabkan gangguan dalam struktur kromatin serta perubahan dalam tahap ekspresi gen yang kritikal bagi pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel. Mutasi dalam *BAP-1* dan *SETD2* mempunyai hubungkait dengan kadar kelangsungan hidup yang lebih rendah. Pesakit dengan mutasi *BAP1* cenderung mempunyai prognosis yang lebih buruk daripada pesakit dengan mutasi *PBRM1* (Joseph et al. 2016). Tambahan pula, kajian sebelum ini mendapati bawa mutasi pada pasangan gen *PBRM1-BAP1* adalah saling eksklusif dalam ccRCC (Clark et al. 2019). Selain daripada elemen-elemen epigenetik yang disebutkan, protein BRD4 dan P300 juga memainkan peranan penting dalam pengawalan ekspresi gen melalui pengubahsuaian kromatin. Gangguan terhadap aktiviti kedua-dua molekul ini boleh mengubah ekspresi gen penting dalam ccRCC sebagai contoh gen *KLF6*, menjadikannya sasaran yang berpotensi untuk rawatan epigenetik kanser ini.

5.1.1 BRD4 dan P300 menyokong penggalak super *KLF6* dalam sel ccRCC

KLF6 dikenal pasti sebagai gen yang sangat penting dalam ccRCC di mana penggalak super *KLF6* memainkan peranan utama dalam mengawal ekspresinya. Kajian menunjukkan bahawa penggalak super *KLF6* mempunyai beberapa wilayah penggalak yang paling banyak dalam ccRCC. Penggalak super ini bukan sahaja bertindak kuat tetapi juga berperanan dalam menyelaraskan aktiviti faktor transkripsi dan pengawalan gen melalui interaksi dengan pelbagai molekul pengawalatur epigenetik seperti BRD4 dan P300. P300 adalah enzim *histone acetyltransferase* yang mengubah struktur kromatin melalui asetilasi, manakala BRD4 berperanan sebagai kofaktor dalam mengenali kumpulan asetilasi pada histon untuk mengawal transkripsi gen. Kedua-dua molekul epigenetik ini berfungsi untuk menyokong aktiviti penggalak super dalam ccRCC, menjadikan mereka sasaran yang penting dalam kajian rawatan kanser ini.

BET (*Bromodomain and Extra-Terminal*) adalah keluarga protein yang berperan dalam mengenali kumpulan asetilasi pada histon, terutamanya melalui domain bromodomain, dan mengawal transkripsi gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan kelangsungan sel. Protein dalam keluarga BET, seperti BRD4, sering dikaitkan dengan pengawalaturan penggalak super dan memainkan peranan penting dalam kanser dengan menyokong ekspresi gen yang menggalakkan pertumbuhan tumor. Beberapa tahun kebelakangan ini, perencat BET yang kuat dengan keberkesanan antitumor dalam beberapa model kanser praklinikal telah dibangunkan. Hasil keberkesanan perencat ini sangat menggalakkan dalam menyekat pertumbuhan tumor dengan cara menindas ekspresi onkogen (De et al. 2024; Delmore et al. 2011; Wang et al. 2020). Salah satu perencat BET ialah JQ1, sejenis molekul kecil dengan afiniti tinggi bersaing dengan histon asetilasi bagi menduduki poket bromodomain protein BET (Filippakopoulos et al. 2010).

A-485 ialah perencat kimia yang disasarkan kepada protein P300, pengawalatur epigenetik yang memainkan peranan penting dalam asetilasi histon dan kawalan ekspresi gen. A-485 telah disahkan mempunyai kesan antitumor yang lebih ketara berbanding perencat P300 yang lain (Lasko et al. 2017; Shendy et al. 2024; Zhang et al. 2020a). Secara khusus, A-485 mampu menghalang asetilasi P300 pada kawasan H3K27 dan H3K18 (Weinert et al. 2018). Dalam haiwan metazoon, perencatan aktiviti P300 menggunakan A-485 memberi kesan deasetilasi yang berbeza pada kawasan promoter dan penggalak. Penggunaan A-485 mampu membuang kumpulan asetilasi pada kawasan penggalak namun tidak pada kawasan promoter (Hsu, Zemke & Berk 2021).

Dalam kajian ini, aktiviti pengawalatur epigenetik BRD4 dan P300 telah direncatkan menggunakan kaedah kimia dalam sel ccRCC bagi mengkaji sama ada kedua-dua elemen ini terlibat dalam pembangunan struktur landskap penggalak super *KLF6*. Sel ccRCC telah dirawat dengan JQ1 (perencat BRD4) dan A-485 (perencat P300). Perencatan aktiviti pengawalatur epigenetik BRD4 dan P300 telah mengurangkan kadar ekspresi penanda bagi transkripsi aktif H3K27ac dan ekspresi gen *KLF6* dalam sel ccRCC. Hasil kajian ini membuktikan bahawa BRD4 dan P300 berperanan penting sebagai pengawalatur epigenetik dalam pembentukan landskap penggalak super *KLF6* dan mengaruh ekspresi tinggi gen *KLF6*. Ini disebabkan oleh

gangguan terhadap aktiviti BRD4 dan P300 mengganggu struktur penggalak super dan seterusnya menurunkan kadar ekspresi *KLF6* dalam sel ccRCC.

Secara teorinya, penurunan ekspresi *KLF6* dalam ccRCC boleh mengganggu patogenesis ccRCC kerana *KLF6* berada di tengah-tengah laluan pengisyratan selular yang menyambungkan beberapa fenotip khas patogenesis ccRCC. Teori ini dibuktikan dengan hasil rawatan JQ1 dan A-485 ke atas sel ccRCC untuk melihat potensi kebolehhidupan sel dan potensi pembentukan koloni. Hasil kajian mendapati bahawa potensi kebolehhidupan sel dan pembentukan koloni menurun setelah aktiviti BRD4 dan P300 direncatkan secara kimia. Perencatan kedua-dua elemen ini mengurangkan kadar ekspresi *KLF6* seterusnya mengganggu transkripsi gen hiliran. *KLF6* juga dilaporkan memainkan peranan dalam merangsang ekspresi gen hiliran PDGF β , yang kemudiannya mengaktifkan laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC (Syafuddin et al. 2019). Selain itu, sel ccRCC didapati merembeskan PDGF β ke dalam persekitaran ekstraselular, di mana rembesan ini penting untuk mengaktifkan laluan isyarat mTORC1 seterusnya menyokong patogenesis ccRCC (Abuhamad et al. 2023; Ganner et al. 2021; Moldvai et al. 2024). Perencatan aktiviti BRD4 dan P300 boleh menyebabkan perubahan pada skala genom luas (*genome-wide scale*) dan tidak spesifik kepada lokus atau gen tertentu. Oleh itu, kesan fenotipik yang diperhatikan berkemungkinan bukan hanya disebabkan oleh penyasaran langsung BRD4 atau P300, tetapi juga hasil daripada gangguan terhadap ekspresi gen-gen lain yang turut terlibat dalam menyokong pertumbuhan dan perkembangan ccRCC.

Secara kolektifnya, pemerhatian ini konsisten dengan kajian sebelum ini yang menunjukkan bahawa perencatan BRD4 dan P300 menurunkan ekspresi onkogen yang dikawal atur oleh wilayah penggalak super dan memberi kesan antikanser terhadap kanser hati (Tsang et al. 2019). Selain itu, perencatan BRD4 menggunakan JQ1 mampu menindas tumbesaran limfoma dalam tikus makmal yang mempunyai limfoma sel B besar (Chapuy et al. 2013). JQ1 juga boleh menghalang pertumbuhan sel dalam kanser servik dengan ketara dan menjejaskan profil ekspresi penggalak super-lncRNA dan penggalak super-mRNA (Zheng et al. 2024). Analisis landskap genom BRD4 mendapati bahawa BRD4 dikaitkan dengan semua promoter aktif dan kebanyakan penggalak aktif dalam genom pelbagai jenis sel normal dan bukan normal (Stratton et

al. 2016). Selaras dengan peranan amnya dalam pengubahsuaian transkripsi, BRD4 juga telah terlibat dalam pelbagai keadaan patologi, terutamanya keradangan, obesiti, dan tumorigenesis termasuk leukemia myeloid akut (Zuber et al. 2011), kanser perut (Ba et al. 2018; Yu et al. 2022; Zhang et al. 2023), dan kanser payudara (Crawford et al. 2008; Nagarajan et al. 2020), kanser ovari (Liu et al. 2023; Wang et al. 2023).

Perencatan aktiviti BRD4 menghalang pertumbuhan sel dalam kanser prostat, RCC, kolangiokarsinoma dan leukimia (Asangani et al. 2014; Garcia et al. 2018; Mertz et al. 2011; Sakaguchi et al. 2010). Persamaan ini dapat dilihat melalui hasil kajian menggunakan JQ1 sebagai perencat kepada BRD4 dalam kajian melibatkan ccRCC ini. Menariknya, rawatan ke atas sel kanser payudara dengan perencat BRD4 dalam jangka masa yang lama menunjukkan kesan yang berbeza. Dalam kajian ke atas kanser payudara ini, BRD4 berinteraksi dengan kompleks LSD1/NuRD untuk mengurangkan aktivasi gen yang mempunyai kerintangan terhadap kimoterapi. Perencatan aktiviti BRD4 secara kimia menggunakan JQ1 selama 4 minggu tidak mengaktifkan gen yang mempunyai kerintangan terhadap kimoterapi, tetapi rawatan jangka panjang ke atas sel kanser payudara ini membawa kepada kerintangan terhadap JQ1 dan perencat kimia tumor yang lain (Liu et al. 2022).

Analisis landskap genom P300 mendapati bahawa P300 mengawal asetilasi pada kebanyakan penggalak. Rekrutmen BRD4 oleh P300 mengaktifkan *RNA Polymerase II* dan P-TEFb yang menyebabkan pengaktifan transkripsi (Narita et al. 2021). P300 juga boleh merekrut *RNA Polymerase II* secara sendiri tanpa bantuan BRD4. Perencatan P300 juga memberi kesan deasetilasi secara global dan menghalang pembentukan sel stem pluripoten, menunjukkan bahawa aktiviti P300 diperlukan untuk kefungsi faktor transkripsi untuk pemrograman semula (Ebrahimi et al. 2019). Perencatan P300 menghalang ekspresi onkogen *GATA1* dan *MYC*, serta menyebabkan penghentian kitaran sel dan penghalangan pertumbuhan dalam sel leukemia myeloid kronik dan limfoma (Garcia-Carpizo et al. 2018). Perencatan P300 mengakibatkan deasetilasi pada H3K27 dan mengurangkan kadar ekspresi gen yang berkaitan dengan penggalak (Raisner et al. 2018). Sebagai perbandingan, perencatan P300 menurunkan transkripsi gen sama seperti kesan penyingkiran P300. Perbandingan ini menunjukkan bahawa aktiviti P300 adalah faktor utama dalam transkripsi gen yang bergantung

kepada P300. Kenyataan di atas dibuktikan dalam kajian ini apabila sel ccRCC yang dirawat dengan perencat P300 telah mengalami penurunan dalam ekspresi gen *KLF6* secara signifikan.

5.1.2 Deasetilasi histon memberi kesan terhadap pembentukan struktur kromatin dan aktiviti penggalak super *KLF6*.

Penggunaan perencat kimia dalam kajian pengawalaturan epigenetik sering dikaitkan dengan risiko ketidaksasaran, di mana perencat tersebut boleh mensasarkan pelbagai protein atau elemen selain daripada sasaran utama. Ini boleh menyebabkan kesan yang meluas (*widespread effect*), termasuk kesan sekunder atau tertiri yang tidak diingini, seterusnya mengurangkan ketepatan kajian serta potensi keberkesanan rawatan. Oleh itu, pendekatan genetik seperti penggunaan teknologi pengubahsuaian epigenetik CRISPR (*CRISPR-mediated epigenetic modification*) menjadi lebih relevan kerana ia membolehkan penyasaran yang lebih tepat (Li et al. 2023; Waryah et al. 2023; Zhang et al. 2022). Secara teori, deasetilasi histon menindas ekspresi gen. Dalam kajian ini, dCas9 yang dikonjugat bersama protein *histone deacetylase* (HDAC3) telah digunakan.

Semasa pengaktifan transkripsi, struktur kromatin yang sangat padat akan menjadi longgar dan terbuka bagi membolehkan mekanisme transkripsi mengakses dan mengikat kawasan DNA yang telah terdedah. Dinamik pembentukan semula struktur kromatin dikawal atur oleh interaksi antara enzim pengubahsuaian kromatin seperti *histone acetyltransferases*, *deacetylase* dan *methyltransferases* (Soshnev, Josefowicz & Allis 2018). H3K27ac dan H3K4me3 adalah penanda bagi kromatin terbuka dan proses transkripsi yang aktif. Sebaliknya, H3K27me dan H3K9me menandakan kromatin tertutup dan transkripsi yang tidak aktif (Audia & Campbell 2016).

Teknik CRISPR-dCas9 digunakan untuk mengesahkan bahawa deasetilasi histon pada lokus penggalak super *KLF6* boleh mengakibatkan perubahan pada tahap isyarat H3K27ac dan seterusnya mengurangkan ekspresi *KLF6*. Secara khususnya, dCas9 yang dikonjugasi dengan enzim *histone deacetylase* digunakan untuk mengdeasetilasi histon di wilayah promoter dan beberapa wilayah penggalak pada lokus *KLF6* yang dipandu oleh sgRNA. Kesan deasetilasi histon pada wilayah yang disasarkan ini dinilai melalui analisis ekspresi gen *KLF6* dan tahap isyarat H3K27ac.

Hasil kajian mendapati bahawa ekspresi *KLF6* pada promoter *KLF6* dan iSE_1 telah dilihat mengalami penurunan setelah deasetilasi histon dilakukan kecuali iSE_2 dan iSE_3. H3K27ac adalah penanda bagi penggalak super yang sedang mengalami transkripsi aktif. Oleh itu, eksperimen ChIP-qPCR untuk melihat kadar H3K27ac pada beberapa kawasan sasaran penggalak super dalam sel yang deasetilasi telah dilakukan. Hasil kajian mendapati bahawa deasetilasi histon pada kesemua kawasan sasaran mengurangkan isyarat H3K27ac terutamanya pada penggalak super iSE_1. Ini membuktikan bahawa deasetilasi histon mengubah landskap penggalak super *KLF6* dengan cara kromatin bergelung seterusnya mengurangkan kadar ekspresi gen hiliran iaitu *KLF6*.

Selain itu, dapatan kajian ini mungkin disebabkan oleh wilayah penggalak iSE_1 mempunyai peranan yang lebih penting berbanding wilayah penggalak lain yang mana kehadiran faktor transkripsi atau kofaktor yang mengikat pada wilayah penggalak super iSE_1 mengaruh ekspresi *KLF6* secara mendalam. Keberadaan penggalak super yang dekat dengan promoter dalam kedudukan linear bukanlah faktor utama yang menyumbang kepada peningkatan ekspresi *KLF6* dalam ccRCC, walaupun iSE_1 diketahui berada di hiliran promoter *KLF6*. Ini kerana penggalak super boleh berada pada mana-mana kedudukan sepanjang DNA dan masih mampu menyokong gen yang sama melalui interaksi dengan pelbagai faktor transkripsi, kofaktor, dan mediator pada promoter gen tersebut. Tambahan pula, struktur DNA yang bergelung membantu memudahkan interaksi antara penggalak super dan promoter, membolehkan penggalak mengikat pada promoter walaupun terletak pada jarak yang jauh secara fizikal dalam kedudukan linear (Rao et al. 2014; Zhang et al. 2020b). Selain itu, tahap ekspresi *KLF6* pada wilayah promoter *KLF6* yang deasetilasi mengalami penurunan yang ketara, yang menunjukkan kemungkinan pengurangan aktiviti penggalak. Penurunan ini mungkin bukan sahaja disebabkan oleh deasetilasi histon atau penggelungan kromatin, tetapi juga berkemungkinan disumbangkan oleh halangan sterik (*steric hindrance*) oleh dCas9-hHDAC3 yang menghalang akses mekanisme transkripsi.

Ikatan dCas9-hHDAC3 pada wilayah promoter ini menghalang *RNA polymerase* dan kompleks transkripsi lain daripada mengikat dan berfungsi untuk menjalankan transkripsi *KLF6* dengan berkesan. Kesan ini mirip kepada tindakan dCas9

asal yang tidak berkonjugat dengan KRAB, di mana ia menghalang akses komponen transkripsi dan secara langsung menindas aktiviti komponen epigenetik lain yang berkaitan. Dalam keadaan ini, kehadiran penggalak super mungkin tidak mencukupi untuk meningkatkan ekspresi gen sekiranya halangan sterik turut memainkan peranan dalam menyekat mekanisma transkripsi daripada berfungsi dengan optimum (Gilbert et al. 2013). Tambahan lagi, penggalak super *KLF6* adalah sangat kukuh dan berfungsi dalam cara modular, di mana beberapa penggalak lain mungkin turut berperanan mengawal ekspresi *KLF6*. Jika satu penggalak disasarkan atau dihalang, terdapat redundansi di mana penggalak-penggalak lain masih boleh diaktifkan untuk mengekalkan atau meningkatkan ekspresi *KLF6*. Ini menjadikan proses pengawalan gen *KLF6* sangat fleksibel dan sukar untuk dihentikan sepenuhnya hanya dengan menyekat satu penggalak sahaja, kerana banyak elemen penggalak lain turut memainkan peranan dalam menyokong ekspresi gen ini.

Pemerhatian yang sama juga dapat dilihat dalam kajian ke atas kanser kolon (CRC) yang menggunakan teknologi dCas9-hHDAC3 seperti dalam kajian ini. Teknologi ini digunakan untuk mengenalpasti elemen pengawalaturan yang terlibat dalam mengawal ekspresi *DPP4* yang menggalakkan proses metastatik ke hati dalam CRC. Deasetilasi terhadap beberapa pengawalaturan hulu gen *DPP4* mengurangkan ekspresi *DPP4*, yang seterusnya menjejaskan pertumbuhan sel CRC dan keupayaan metastatik dalam haiwan semasa suntikan *orthotopic* ke dalam model tikus metastatik CRC (Wang et al. 2021). Selain itu, kajian ke atas *rhabdomyosarcoma* (RMS) menunjukkan kepentingan HDAC3 dalam pembentukan sel kanser ini. Radioterapi sering digunakan dalam rawatan RMS. Kajian ini mendapati bahawa menyenyapkan HDAC3 secara khusus meningkatkan kepekaan RMS terhadap radiasi dengan mengurangkan pembentukan koloni dan mencetuskan apoptosis. Kehilangan fungsi HDAC3 meningkatkan kerosakan DNA dalam sel yang disinari, dan digabungkan dengan radioterapi, ia menghalang pertumbuhan tumor dengan lebih berkesan daripada rawatan tunggal radioterapi sahaja. Sebuah perencat HDAC3 baharu, MC4448, menunjukkan kesan yang serupa, menjadikan perencatan HDAC3 sebagai strategi yang berkebolehan untuk mengatasi rintangan radiasi dalam RMS (Cassandri et al. 2024).

5.2 KLF6 DAN PENGISYARATAN MTORC1 DALAM SEL CCRCC

Dalam kajian sebelum ini, *KLF6* telah dilaporkan berada di titik pusat laluan pengisyaratan selular yang menghubungkan beberapa ciri penting fenotip ccRCC. *KLF6* mengawal atur aktiviti hiliran yang melibatkan laluan pengisyaratan lipid di mana *KLF6* mengaruh ekspresi gen *SREBF1* dan *SREBF2* dengan mengikat elemen pengawalaturan hulu gen ini. *SREBP1* dan *SREBP2* merupakan faktor transkripsi utama yang mengawal atur proses lipid metabolisme dan homeostasis di dalam sel (Hua et al. 2024; Sethi, Shanmugam & Kumar 2017). Penurunan ekspresi *SREBF2* menggunakan perencat kimia dalam sel ccRCC merencatkan homeostasis kolesterol dan pertumbuhan sel ccRCC (Zhang et al. 2024). Selain itu, *KLF6* juga telah dilaporkan berperanan dalam mengaruh ekspresi gen *PDGFβ* yang merupakan agonis yang mengaktifkan tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC (Syafruddin et al. 2019).

Di samping itu, sel ccRCC juga telah didapati merembeskan keluar *PDGFβ* ke persekitaran di mana rembesan ekstraselular *PDGFβ* ini amat penting untuk mengaktifkan tapak laluan isyarat mTORC1 sama ada secara autokrin ataupun parakrin. Tahap rembesan *PDGFβ* berkorelasi positif dengan ekspresi *KLF6* dan *PDGFβ* dalam sel ccRCC (Abuhamad et al. 2023). Autokrin adalah pengaktifan sendiri tapak laluan isyarat mTORC1 manakala parakrin pula adalah pengaktifan sel ccRCC lain yang berada di dalam kawasan persekitaran. Ini dapat memastikan pertumbuhan dan perkembangan berterusan sel ccRCC kerana tapak laluan isyarat mTORC1 memainkan peranan penting dalam menggalakkan biosintesis protein dengan memodulasi proses translasi mRNA dan biogenesis ribosom. Selain itu, kompleks mTORC1 membantu dalam pengawalan biosintesis lipid dengan menjadi pengantara pengaktifan *SREBF* (Yang et al. 2022a). Hiperaktiviti tapak laluan isyarat mTORC1 dalam ccRCC disebabkan oleh ekspresi tinggi gen *KLF6* dalam sel ccRCC yang merupakan pengawalatur hulu *PDGFβ* yang bertindak sebagai agonis pengaktifan tapak laluan isyarat mTORC1.

Dalam kajian ini, aktiviti protein pengawalatur epigenetik BRD4 dan P300 telah disasarkan dengan menggunakan perencat kimia JQ1 dan A-485. Hasil dari perbincangan yang di atas, perencatan BRD4 dan P300 telah mengurangkan tahap ekspresi gen *KLF6* dalam ccRCC. Oleh kerana tahap ekspresi *PDGFβ* dan *KLF6* mempunyai kolerasi positif seperti yang telah dinyatakan di atas, analisis bagi menilai kadar ekspresi *PDGFβ* sejurus perencatan aktiviti BRD4 dan P300 telah dilaksanakan. Hasil kajian mendapati bahawa perencatan aktiviti BRD4 dan P300 juga telah menyebabkan pengurangan kadar ekspresi *PDGFβ* dalam sel ccRCC secara signifikan. Selain itu, tahap ekspresi *PDGFβ* mencatatkan pengurangan yang lebih tinggi berbanding tahap ekspresi *KLF6*. Pemerhatian ini mungkin disebabkan oleh kesan yang meluas (*widespread effect*) oleh penggunaan perencat kimia yang secara langsung memberi kesan terhadap struktur kromatin atau elemen pengawalaturan hulu *PDGFβ*.

Malah, analisis bagi melihat pengisyaratan mTORC1 dalam ccRCC menggunakan pembloatan Western telah menunjukkan penurunan pengaktifan tapak laluan isyarat mTORC1 setelah dirawat dengan JQ1. Penurunan ini mungkin disebabkan oleh pengurangan ekspresi protein *PDGFβ* yang merupakan agonis untuk tapak laluan isyarat mTORC1. Seperti yang dijelaskan di atas, tahap ekspresi *PDGFβ* menurun dengan signifikan setelah aktiviti BRD4 direncat secara kimia. Faktor yang disebutkan ini mungkin antara beberapa faktor yang mengurangkan kebolehhidupan sel ccRCC setelah perencatan aktiviti BRD4.

ccRCC turut dikenali sebagai penyakit metabolik. Kesan Warburg (*Warburg effect*) telah terbukti berlaku secara lebih ketara dalam ccRCC berbanding tisu biasa (Courtney et al. 2018). Kesan Warburg lebih cenderung kepada glikolisis berbanding pemfosforusan oksidaan. Dalam sel kanser, glikolisis menghasilkan piruvat dan asid laktik. Produk akhir piruvat adalah asetil-KoA, bahan asas kepada pembuatan kolesterol (Vaupel, Schmidberger & Mayer 2019). Ini membuktikan bahawa ccRCC mempunyai metabolit asetil-KoA yang tinggi dan membantu dalam metabolisme lipid. Menariknya, asetil-KoA turut terlibat dalam mekanisme mTORC1. Leusin mengawal mTORC1 melalui metabolit asetil-KoA dalam kebanyakan sel kanser, dan ini disokong oleh data korelatif *in vivo* (Son et al. 2019).

Kebanyakan P300 terdapat di kawasan nukleus tetapi ia boleh berulang-alik antara nukleus dan sitoplasma. Proses ini dikawal oleh protein ulang-alik BAT3 (Sebti et al. 2014). Asetil-KoA merupakan perantara metabolik intrasellular yang memainkan peranan utama dalam pengaktifan P300 dengan menyediakan kumpulan asetil bukan sahaja untuk substrat P300 tetapi juga untuk autoasetilasi P300 itu sendiri. Autoasetilasi ini menandakan pengaktifan P300 (Mariño et al. 2014). Selain itu, mTORC1 telah dikenalpasti mempunyai hubungkait yang rapat dengan P300. Kajian sebelum ini telah membuktikan bahawa mTORC1 mengaktifkan P300 secara langsung melalui fosforilasi dalam sel HeLa dan HEK293T. Fosforilasi pada empat sisa serina dalam domain terminal C mengaktifkan P300. Ini mendedahkan P300 sebagai sasaran langsung mTORC1 dan mencadangkan bahawa laluan mTORC1-P300 memainkan peranan penting dalam metabolisme sel dengan mengawal anabolisme dan katabolisme sel (Wan et al. 2017).

Sebaliknya, hasil yang didapati dalam kajian ini menunjukkan urutan pengawalan yang sedikit berbeza di mana penglibatan mTORC1 berada di laluan hiliran. Dalam kajian ini, P300 telah dikenalpasti terlibat dalam pengawalaturan struktur kromatin penggalak super di kawasan lokus *KLF6*. Perencatan P300 mengganggu pembangunan penggalak super *KLF6* yang dibuktikan melalui penurunan kadar ekspresi H3K27ac. Penurunan ekspresi H3K27ac menandakan bahawa proses transkripsi telah direncatkan seterusnya mengaruh ekspresi *KLF6*. Disebabkan *KLF6* dan *PDGFβ* mempunyai korelasi yang positif, penurunan ekspresi *PDGFβ* yang ditranskripsi turut diperhatikan. Ketiadaan *PDGFβ* untuk ditranslasi dalam sel mengakibatkan ketidakaktifan laluan pengisyaratan mTORC1.

Kajian terhadap penyakit *rhabdomyosarcoma* (RMS), pertambahan aktiviti pengisyaratan mTOR telah menggalakkan pertumbuhan tumor RMS dengan meningkatkan angiogenesis, percambahan, dan migrasi sel kanser yang membawa kepada neoplasma invasif (Srivastava et al. 2014). Disebabkan itu, kajian ini memberi fokus terhadap perencatan pengisyaratan mTOR dan BRD4. Kajian ini menggunakan perencat BRD4 RVX-208 dan perencat mTOR OSI-027. Rawatan menggunakan RVX-208 tidak memberi sebarang kesan, sebaliknya perencatan mTOR ke atas sel RMS memberi kesan penindasan yang efektif (Srivastava et al. 2019). Selain itu, rawatan

gabungan menggunakan RVX-208 dan OSI-027 telah memberi kesan yang efektif untuk mengurangkan isyarat ekspresi p-mTOR/mTOR. Ujian ChIP-qPCR untuk menilai kadar ekspresi H3K27ac terhadap perencatan BRD4 telah dilakukan. Hasil kajian mendapati bahawa ekspresi H3K27ac mengalami penurunan signifikan pada kawasan mTOR 5' UTR sejurus perencatan BRD4 (Srivastava et al. 2022). Pemerhatian ini bertepatan dengan dapatan kajian tesis ini yang membuktikan bahawa perencatan BRD4 mampu memberi impak penurunan terhadap pengaktifan pengisyaratan mTOR.

5.3 HUBUNGAN FAKTOR TRANSKRIPSI MEF2C DAN KLF6

Analisis *in silico* menggunakan aplikasi web FIMO dan MEME Suite bagi mengenalpasti motif DNA pada wilayah promotor *KLF6* telah dilakukan dalam kajian sebelum ini. Hasil kajian menggunakan data ChIP-seq H3K27ac dan P300 dalam sel ccRCC menjumpai kehadiran motif pengikat keluarga MEF2 pada promotor gen *KLF6* (Syafuruddin et al. 2019). Analisis seterusnya mendedahkan MEF2C sebagai transaktivator *KLF6*. Ekspresi *KLF6* dan *MEF2C* mempunyai korelasi yang positif seperti yang telah ditunjukkan dalam Rajah 4.21. Untuk mengesahkan penemuan ini, penindasan *MEF2C* dalam sel ccRCC menggunakan pendekatan CRISPRi dan RNAi telah dilaksanakan. Kemudian, penilaian ekspresi *KLF6* dan *MEF2C* di kawasan promotor *KLF6* dalam sel ccRCC yang mengalami penyenyapan ekspresi *MEF2C* telah dilakukan. Hasil kajian mendapati bahawa tahap ekspresi *KLF6* berkorelasi positif dengan ekspresi *MEF2C*. Selain itu, MEF2C ChIP-qPCR mengesahkan pengikatan MEF2C di kawasan promotor *KLF6*. Ini disokong oleh pengawalaturan ekspresi *KLF6* apabila pengekspresan semula eksogenus *MEF2C* dalam sel ccRCC yang mengalami penyenyapan *MEF2C*. Pembuktian ini menunjukkan MEF2C mengikat di kawasan penggalak super *KLF6* dan peranannya sebagai pengawalatur transkripsi hulu *KLF6*.

MEF2C boleh mengaktifkan atau meningkatkan ekspresi gen dengan mengikat pada kawasan promotor melalui jujukan DNA yang kaya dengan A/T yang dikenali sebagai tapak MEF2 (Sekiyama, Suzuki & Tsukahara 2012). Menariknya, tapak pengikatan MEF2C adalah motif yang paling banyak dalam carian ChIP-seq untuk jujukan penggalak *de novo* dalam makrofaj penyakit *Mycobacterium tuberculosis* (Bouttier et al. 2016).

MEF2C dan KLF6 mempunyai beberapa persamaan fungsi dalam badan. Pertamanya, MEF2C menggalakkan polarisasi makrofaj M1 dengan mengawal atur ekspresi makrofaj khususnya daripada salasilah sitokin (Zhao et al. 2022). Menariknya, KLF6 juga mengawal atur polarisasi makrofaj keatas fenotip M1 dan memaparkan gen proinflamasi (Date et al. 2014; Kim et al. 2016). Ini boleh disimpulkan bahawa MEF2C dan KLF6 mempunyai perhubungan yang rapat dalam pembentukan polarisasi makrofaj. Selain itu, seperti yang telah diketahui, MEF2C adalah faktor transkripsi penggalak miosit (subunit bagi pembentukan sel otot). Kajian terkini telah membuktikan penglibatan KLF6 dalam mengawal atur kelangsungan hidup sel neuron, pertumbuhan akson dan juga pembentukan tisu otot rangka (Dionyssiou et al. 2013). Ini boleh disimpulkan bahawa MEF2C dan KLF6 mempunyai hubungan dalam pembentukan sel otot. Selain itu, terdapat kajian yang menunjukkan peranan faktor transkripsi keluarga MEF2 dalam mengawal ekspresi *KLF6* di mana paksi MEF2-KLF6 ini bertindak sebagai faktor pro-survival dalam *hippocampal neurons* dan kardiomyosit (Hashemi et al. 2015; Salma & McDermott 2012).

Selain itu, kajian ini telah menganalisis kesan penyenyapan *MEF2C* menggunakan CRISPRi terhadap pertumbuhan sel ccRCC in vitro dalam asai migrasi sel, asai viabiliti sel dan asai pembentukan koloni. Dalam asai migrasi sel, sel ccRCC yang telah ditransduksi dengan iMEF2C menunjukkan tiada peningkatan dalam peratusan migrasi sel yang diperhatikan. Sebagai tambahan, sel yang mengalami penyenyapan MEF2C ini direncat menggunakan perencat angiogenesis dan mTOR. Hasil pemerhatian menunjukkan bahawa sel yang disenyapkan ini menunjukkan penurunan viabiliti sel yang signifikan selepas rawatan dengan *sunitinib*, manakala tiada perubahan signifikan diperhatikan selepas rawatan dengan *everolimus*. Meskipun terdapat trend penurunan viabiliti sel selepas rawatan dengan *everolimus*, perbezaan ini tidak signifikan secara statistik. Faktor yang mungkin menyumbang kepada keputusan ini termasuklah saiz sampel yang kecil, variabiliti biologi antara replikasi eksperimen, atau mungkin keberkesanan rawatan bergantung kepada masa atau dos yang lebih tinggi. Tambahan pula, penemuan ini menunjukkan bahawa rawatan tunggal mungkin tidak mencukupi untuk memberikan kesan yang ketara ke atas viabiliti sel dan kombinasi rawatan atau kajian susulan diperlukan untuk meneroka mekanisme yang lebih mendalam.

Disamping itu, sel yang sama telah menunjukkan kesan yang berbeza dalam asai pembentukan koloni. Sel yang ketiadaan MEF2C ini dilihat mampu membentuk koloni yang lebih banyak dan besar berbanding sel kawalan. Keputusan ini menunjukkan bahawa penyenyapan MEF2C tidak memberi kesan kepada viabiliti sel dalam jangka pendek, tetapi meningkatkan keupayaan sel untuk membentuk koloni dalam jangka panjang. Kejadian ini berkemungkinan disebabkan oleh sasaran hiliran MEF2C yang tidak diketahui terjejas, yang mungkin mempunyai kesan pro-onkogenik. Apabila MEF2C tiada, ekspresi gen hiliran meningkat naik dan menggalakkan pembentukan koloni. Seterusnya memacu sifat tumorigenik ccRCC.



BAB VI

KESIMPULAN

6.1 RUMUSAN KAJIAN

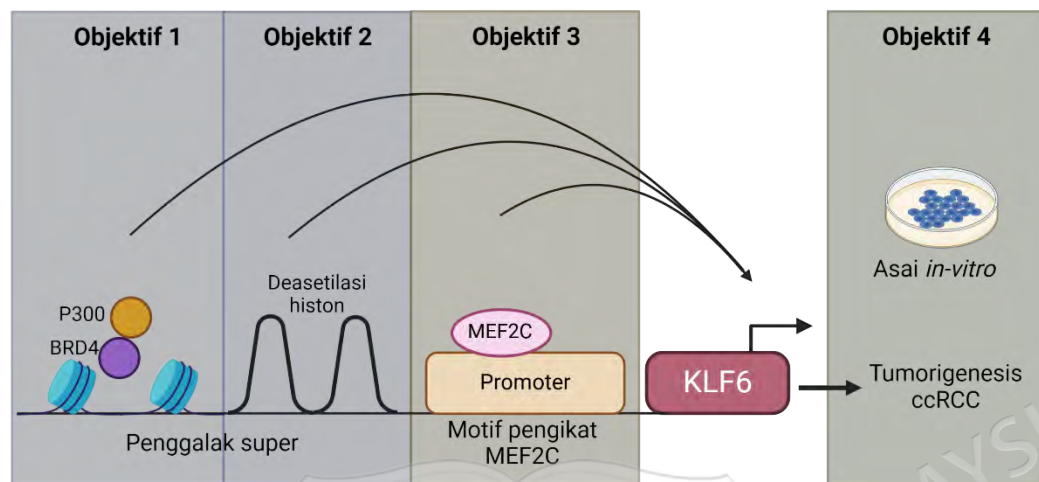
Secara keseluruhannya, kesemua objektif kajian dalam kajian ini telah berjaya dicapai. Perencatan aktiviti pengawalatur epigenetik BRD4 dan P300 mengurangkan ekspresi *KLF6* dan isyarat H3K27ac dalam sel ccRCC. Seterusnya menyahaktifkan ekspresi *PDGF β* dan laluan pengisyaratan mTORC1. Kesimpulannya, penggalak super *KLF6* telah menunjukkan kebergantungan terhadap aktiviti hulu pengawalatur epigenetik BRD4 dan P300. Seterusnya memacu transkripsi ekspresi *KLF6* dan pengaktifan pengisyaratan mTORC1 dalam ccRCC.

Deasetilasi pada promotor *KLF6* dan beberapa kawasan penggalak super *KLF6* telah dilakukan dengan menggunakan teknologi perubahan epigenetik CRISPR-dCas9-hHDAC3. Hasil kajian mendapati bahawa deasetilasi histon pada promotor *KLF6*, iSE_1, iSE_2 dan iSE_3 mengurangkan isyarat transkripsi aktif H3K27ac. Ini membuktikan bahawa deasetilasi histon mengubah landskap penggalak super *KLF6* dengan cara penggelungan kromatin seterusnya mengurangkan tahap ekspresi gen hiliran iaitu *KLF6*.

Penindasan *MEF2C* dalam sel ccRCC telah dilakukan menggunakan pendekatan CRISPRi dan RNAi. Kemudian, ekspresi *KLF6* dan *MEF2C* di kawasan dalam sel ccRCC yang mengalami penenyapan ekspresi *MEF2C* dianalisis. Hasil kajian mendapati bahawa tahap ekspresi *KLF6* berkorelasi positif dengan ekspresi *MEF2C*. Selain itu, MEF2C ChIP-qPCR mengesahkan pengikatan MEF2C di kawasan promotor *KLF6*. Pembuktian ini menunjukkan MEF2C mengikat di kawasan penggalak super *KLF6* dan peranannya sebagai pengawalatur transkripsi hulu *KLF6*.

Penyasaran *MEF2C* dalam model in vitro ccRCC menunjukkan kesan berbeza ke atas fenotip sel. Penyenyaan *MEF2C* tidak memberikan kesan ke atas migrasi sel. Selain itu, penyenyaan *MEF2C* menurunkan viabiliti sel secara signifikan selepas rawatan dengan *sunitinib*, manakala tiada perubahan signifikan diperhatikan dengan *everolimus*. Selain itu, penyasaran *MEF2C* meningkatkan potensi pembentukan koloni, yang mungkin disebabkan oleh pengaktifan gen hiliran yang berpotensi pro-onkogenik.

Akhir sekali, kajian ini melakar beberapa penemuan yang kukuh dan menyumbang kepada pemahaman dalam ccRCC. Gabungan teknik epigenomik dan transkriptomik telah memberikan gambaran terhadap keseluruhan landskap ccRCC. Gangguan pada aktiviti BRD4 dan P300 turut memberi impak terhadap laluan pengisyaratan mTORC1 disebabkan oleh regulasi pada paksi *KLF6-PDGFβ*. Bahkan, gangguan pada kedua-dua elemen epigenetik BRD4 dan P300 ini boleh menghalang pelekatan MEF2C pada promotor *KLF6* disebabkan oleh struktur kromatin yang mampat. Kajian ini menyediakan pengetahuan tambahan bagi membina landskap pergantungan transkrip *KLF6* yang lengkap dalam ccRCC serta membuka jalan untuk pembangunan alat diagnostik dan prognostik yang baru. Penemuan keseluruhan kajian ini diringkaskan dalam model yang ditunjukkan dalam Rajah 6.1.



Rajah 6.1

Model ringkasan penemuan kajian. Kajian ini menunjukkan bahawa BRD4 dan P300 adalah elemen pengawal atur epigenetik penting yang menyokong pengekspresan *KLF6* dalam ccRCC. Selain itu, deasetilasi histon pada beberapa kawasan penggalak *KLF6* menggunakan CRISPR-dCas9 mengubah landskap kromatin dan menekan ekspresi *KLF6*, mengesahkan peranan asetilasi dalam pengawalan ekspresi *KLF6*. Dari perspektif mekanisme transkripsi, kajian ini membuktikan bahawa MEF2C mengikat pada promoter *KLF6* dan bertindak sebagai faktor transkripsi. Walau bagaimanapun, penyenyapan *MEF2C* dalam ccRCC tidak memberi kesan terhadap migrasi sel dan viabiliti sel tetapi meningkatkan pembentukan koloni, mencadangkan peranan MEF2C dalam keseimbangan proliferasi dan survival jangka panjang dalam ccRCC.

6.2 LIMITASI KAJIAN

Walaupun kajian ini menunjukkan hasil yang signifikan, beberapa limitasi harus diakui. Pertama, kesan perencatan BRD4 dan P300 pada status H3K27ac hanya dinilai pada beberapa wilayah penggalak proksimal menggunakan ChIP-qPCR. Akan tetapi penggalak super *KLF6* merupakan penggalak super yang terbesar dan terkuat dalam sel ccRCC. Maka, amat sukar untuk menyiasat setiap satu penggalak yang menyokong ekspresi *KLF6*. Skop yang terhad ini mungkin tidak sepenuhnya memberi gambaran kesan yang meluas yang menjangkau pada lokus *KLF6* dan keseluruhan genom, dan mungkin mengabaikan beberapa penggalak lain yang relevan. Kedua, kajian ini memberi tumpuan kepada beberapa penggalak konstituen dalam lokus penggalak super *KLF6* dan memfokuskan kepada peranan BRD4 dan P300 sahaja. Kajian yang hanya fokus kepada kedua-dua protein ini sahaja boleh mengakibatkan pengabaian terhadap

pengawalatur epigenetik dan protein lain yang mungkin bermakna, seterusnya menghalang pemahaman menyeluruh mengenai landskap penggalak super *KLF6*. Selain itu, kajian ini juga hanya memfokuskan kepada penggunaan HDAC3 sebagai perencat *histone deacetylase* (HDAC), sedangkan terdapat pelbagai jenis HDAC lain yang turut memainkan peranan penting dalam pengawalaturan epigenetik. Penggunaan HDAC3 sahaja mungkin mengehadkan pemahaman terhadap kesan menyeluruh pengubahsuaian epigenetik dalam penggalak super *KLF6*.

Ketiga, analisis motif DNA menunjukkan kehadiran motif keluarga MEF2 (MEF2A, MEF2C dan MEF2D). Akan tetapi kajian ini memberi tumpuan kepada faktor transkripsi MEF2C sahaja disebabkan oleh korelasi positifnya dengan ekspresi *KLF6* walaupun ekspresi *MEF2A* dan *MEF2D* juga mempunyai korelasi yang positif dengan ekspresi *KLF6*. Walaupun pengetahuan ini memberikan pandangan yang berguna, ia mengehadkan penerokaan faktor transkripsi lain yang mungkin juga memainkan peranan penting dalam proses yang dikaji. Hal ini penting kerana penggalak super *KLF6*, mengawal ekspresi gen melalui interaksi kompleks antara pelbagai faktor transkripsi. Oleh kerana penggalak super mengikat pelbagai protein pengawalaturan, ramalan interaksi ini boleh membawa kepada kehadiran banyak faktor transkripsi atau kawasan penggalak yang berpotensi. Dalam konteks ini, adalah sukar untuk mengenalpasti faktor transkripsi atau kawasan penggalak sebenar yang memacu aktiviti penggalak super secara spesifik. Kajian yang hanya memfokuskan kepada satu faktor seperti MEF2C mungkin mengabaikan faktor transkripsi atau penggalak lain yang mungkin turut memainkan peranan penting, dan ini seterusnya mengehadkan pemahaman menyeluruh terhadap pengawalan ekspresi gen oleh penggalak super. Selain itu, teknik yang rumit dan kos yang mahal dalam ujian ChIP menyebabkan beberapa eksperimen dilakukan tanpa pengulangan. Batasan ini mungkin mempengaruhi kebolehhasilan dan keteguhan penemuan ini.

Tambahan pula, kajian ini hanya menggunakan PS6/S6 sebagai penanda aktiviti mTORC1 selepas rawatan JQ1. Walaupun PS6/S6 merupakan penanda downstream utama dalam laluan mTORC1, kebergantungan kepada satu penanda sahaja mungkin mengehadkan pemahaman menyeluruh terhadap aktiviti mTORC1. Hal ini kerana pengurangan tahap PS6 mungkin disebabkan oleh gangguan laluan isyarat lain yang

turut mempengaruhi translasi protein downstream. Oleh itu, penggunaan penanda tambahan seperti p70 S6 kinase dan p-AKT mungkin lebih efektif untuk memantapkan analisis aktiviti mTORC1 dan menilai potensi perubahan isyarat dalam laluan lain selepas rawatan JQ1. Kekangan ini boleh memberi kesan kepada ketepatan dalam menginterpretasi hasil kajian berkaitan aktiviti mTORC1.

Selain itu, eksperimen berkaitan plasmid pencernaan tidak menyertakan plasmid tidak dicerna (*undigested plasmid*) sebagai kawalan. Kekurangan kawalan ini mungkin mengurangkan kebolehpercayaan dalam analisis saiz dan integriti plasmid yang dicerna. Walau bagaimanapun, keputusan pencernaan telah disahkan dengan kaedah sequencing untuk memastikan ketepatan dan mengesahkan kejayaan pencernaan plasmid tersebut.

Di samping itu, hasil eksperimen berkaitan penenyapan MEF2C dalam objektif 4 menunjukkan keputusan yang berbeza daripada jangkaan awal. Penenyapan MEF2C tidak memberikan kesan signifikan ke atas migrasi sel dan viabiliti sel menggunakan perencat kimia *sunitinib* dan *everolimus*, tetapi meningkatkan potensi pembentukan koloni dalam sel ccRCC in vitro. Keputusan ini mungkin berpunca daripada mekanisme kompensasi oleh faktor transkripsi lain yang masih aktif dalam sel ccRCC atau kebergantungan sel ccRCC terhadap faktor pengawalan lain yang tidak diteliti dalam kajian ini. Oleh itu, had ini mungkin menghadkan keupayaan untuk memahami secara mendalam peranan spesifik MEF2C dalam kawalan fenotip ccRCC.

Akhir sekali, kajian ini tidak menggunakan model in vivo untuk menilai kesan perencatan *MEF2C* pada keupayaan pembentukan tumor dan penjajahan ke atas paru-paru oleh sel ccRCC. Selain itu, Penggunaan model in vivo yang lebih relevan adalah penting untuk menilai kesan sebenar perencatan BRD4 dan P300 dalam konteks tumor in vivo, kerana faktor seperti farmakokinetik, penyerapan ubat, dan tindak balas imun tidak dapat direplikasi sepenuhnya dalam in vitro. Ketiadaan pengesahan in vivo menghadkan keupayaan untuk menterjemahkan penemuan ini ke dalam aplikasi klinikal.

6.3 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

Salah satu hala tuju yang utama berkaitan cadangan kajian lanjutan adalah pembangunan strategi penyaringan genetik CRISPR-Cas9 berskala besar yang mengeksplotasi penggunaan sistem reporter endogenus *KLF6*. Pendekatan ini membolehkan siasatan dilakukan terhadap keseluruhan calon faktor transkripsi *KLF6* berdasarkan ramalan motif yang diberikan oleh analisis FIMO dan MEME suite. Calon faktor transkripsi yang telah disenarai pendek boleh digunakan dalam eksperimen. Setiap individu gen disasarkan menggunakan CRISPRi seterusnya penilaian tahap ekspresi *KLF6* dan isyarat H3K27ac dilakukan menggunakan qPCR dan ChIP-qPCR. Maka, pemahaman yang menyeluruh mengenai rangkaian pengawalan yang mengatur ekspresi *KLF6* dapat diketahui. Selain itu, memperluaskan skop kawasan penggalak super *KLF6* dan protein pengawalatur yang dianalisis akan memberikan gambaran yang lebih lengkap mengenai landskap pengawalan.

Kajian masa depan seharusnya meluaskan fokus kepada elemen pengawalan dan protein lain yang signifikan selain daripada BRD4 dan P300. Cara ini akan membantu mengatasi kelemahan kajian semasa yang hanya memfokuskan kepada beberapa penggalak super dan protein. Di samping itu, kajian lanjutan perlu memasukkan pendekatan penapisan genetik yang lebih luas untuk mensasarkan semua pengubah epigenetik yang diketahui, ko-aktivator transkripsi, dan faktor-faktor lain yang mungkin relevan dalam pengawalan ekspresi gen. Dengan memperluaskan skop ini, ia akan membolehkan penemuan yang lebih komprehensif dan mendalam mengenai interaksi kompleks yang mengawal penggalak super dan aktiviti transkripsi, serta mengenal pasti sasaran terapeutik baru dalam konteks pengawalan epigenetik. Mengambil kira teknik yang rumit dan kos yang mahal dalam ujian ChIP, kajian masa hadapan perlu menyertakan eksperimen yang diulang untuk memastikan kebolehpercayaan dan kebolehulangan penemuan.

Kajian lanjutan seharusnya memberi tumpuan untuk menilai potensi tumorigenik sel ccRCC setelah intervensi oleh molekul tertentu. Pertama, menilai kesan perencatan BRD4 dan P300 ke atas sel ccRCC dalam model in-vivo amat penting untuk memahami peranan mereka dalam perkembangan tumor dan potensi sebagai sasaran terapeutik. Kedua, sasaran MEF2C dalam model in-vivo akan memberikan maklumat berharga mengenai impak perencatan MEF2C ke atas kemampuan pembentukan tumor dan penjajahan paru-paru oleh sel ccRCC. Ketiadaan pengesahan in-vivo dalam kajian semasa membatasi kemampuan untuk mentranslasi penemuan ini ke dalam aplikasi klinikal.



RUJUKAN

- Abou Youssif, T., Fahmy, M.A., Koumakpayi, I.H., Ayala, F., Al Marzooqi, S., Chen, G., Tamboli, P., Squire, J., Tanguay, S. & Sircar, K. 2011. The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases. *Cancer* 117(2): 290–300.
- Abuhamad, A.Y., Mohamad Zamberi, N.N., Vanharanta, S., Mohd Yusuf, S.N.H., Mohtar, M.A. & Syafruddin, S.E. 2023. Cancer Cell-Derived PDGFB Stimulates mTORC1 Activation in Renal Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 24(7): 6447.
- Acharya, V. & Olivero, J. 2018. The Kidney as an Endocrine Organ. *Methodist DeBakey cardiovascular journal* 14(4): 305–307.
- Addis, R.C., Ifkovits, J.L., Pinto, F., Kellam, L.D., Estes, P., Rentschler, S., Christoforou, N., Epstein, J.A. & Gearhart, J.D. 2013. Optimization of direct fibroblast reprogramming to cardiomyocytes using calcium activity as a functional measure of success. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 60: 97–106.
- An, J., González-Avalos, E., Chawla, A., Jeong, M., López-Moyado, I.F., Li, W., Goodell, M.A., Chavez, L., Ko, M. & Rao, A. 2015. Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice. *Nature Communications* 6(1): 10071.
- Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., Ntini, E., Arner, E., Valen, E., Li, K., Schwarzfischer, L., Glatz, D., Raithel, J., Lilje, B., Rapin, N., Bagger, F.O., Jørgensen, M., Andersen, P.R., Bertin, N., Rackham, O., Burroughs, A.M., Baillie, J.K., Yuri, I., Yuri, S., Erina, F., Shiori, M., Yutaka, N., Mungall, C.J., Meehan, T.F., Lassmann, T., Masayoshi, I., Hideya, K., Naoto, K., Jun, K., Lennartsson, A., Daub, C.O., Heutink, P., Hume, D.A., Jensen, T.H., Harukazu, S., Yoshihide, H., Müller, F., Forrest, A.R.R., Carninci, P., Rehli, M. & Sandelin, A. 2014. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 507(7493): 455–461.
- Asangani, I.A., Dommeti, V.L., Wang, X., Malik, R., Cieslik, M., Yang, R., Escara-Wilke, J., Wilder-Romans, K., Dhanireddy, S., Engelke, C., Iyer, M.K., Jing, X., Wu, Y.-M., Cao, X., Qin, Z.S., Wang, S., Feng, F.Y. & Chinnaiyan, A.M. 2014. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 510(7504): 278–282.
- Assali, A., Harrington, A.J. & Cowan, C.W. 2019. Emerging roles for MEF2 in brain development and mental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 59: 49–58.
- Audia, J.E. & Campbell, R.M. 2016. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(4): 019521.

- Ba, M., Long, H., Yan, Z., Wang, S., Wu, Y., Tu, Y., Gong, Y. & Cui, S. 2018. BRD4 promotes gastric cancer progression through the transcriptional and epigenetic regulation of c-MYC. *Journal of Cellular Biochemistry* 119(1): 973–982.
- Barata, P.C. & Brian I. Rini. 2017. Treatment of Renal Cell Carcinoma : Current Status and Future Directions Treatment of Renal Cell Carcinoma : Current Status and Future Directions. *A Cancer Journal for Clinicians Practical* 67(6): 507–524.
- Baretić, D. & Williams, R.L. 2014. PIKKs--the solenoid nest where partners and kinases meet. *Current opinion in structural biology* 29: 134–142.
- Barnes, R.M., Harris, I.S., Jaehnig, E.J., Sauls, K., Sinha, T., Rojas, A., Schachterle, W., McCulley, D.J., Norris, R.A. & Black, B.L. 2016. MEF2C regulates outflow tract alignment and transcriptional control of Tdgfl. *Development* 143(5): 774–779.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M.F., Monahan, J.E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., Mapa, F.A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P., Shipway, A., Engels, I.H., Cheng, J., Yu, G.K., Jianjun, Yu, Aspesi, P., de Silva, M., Jagtap, K., Jones, M.D., Li, Wang, Hatton, C., Palescandolo, E., Gupta, S., Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R.C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler, W., Reich, M., Nanxin, Li, Mesirov, J.P., Gabriel, S.B., Getz, G., Ardlie, K., Chan, V., Myer, V.E., Weber, B.L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J.L., Meyerson, M., Golub, T.R., Morrissey, M.P., Sellers, W.R., Schlegel, R. & Garraway, L.A. 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391): 603–607.
- Baxter, E., Windloch, K., Gannon, F. & Lee, J.S. 2014. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell & Bioscience* 4: 45.
- Benzeno, S., Narla, G., Allina, J., Cheng, G., Reeves, H., Banck, M., Odin, J., Diehl, J., Germain, D. & Friedman, S. 2004. Cyclin-Dependent Kinase Inhibition by the KLF6 Tumor Suppressor Protein through Interaction with Cyclin D1. *Cancer research* 64: 3885–3891.
- Berland, S. & Houge, G. 2010. Late-onset gain of skills and peculiar jugular pit in an 11-year-old girl with 5q14.3 microdeletion including MEF2C. *Clinical Dysmorphology* 19(4): 222–224.
- Bhagwat, A.S., Roe, J.-S., Mok, B.Y.L., Hohmann, A.F., Shi, J. & Vakoc, C.R. 2016. BET Bromodomain Inhibition Releases the Mediator Complex from Select cis-Regulatory Elements. *Cell Reports* 15(3): 519–530.
- Blanco, A.I., Teh, B.S. & Amato, R.J. 2011. Role of radiation therapy in the management of renal cell cancer. *Cancers* 3(4): 4010–4023.
- Borrescio-Higa, F. & Valdés, N. 2022. The Psychosocial Burden of Families with Childhood Blood Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(1): 599.

- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M.P., Ratzliff, V., Langa, C., Vary, C.P.H., Ramirez, J.R., Friedman, S. & Bernabéu, C. 2002. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100(12): 4001–4010.
- Boutelle, A.M. & Attardi, L.D. 2021. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends in Cell Biology* 31(4): 298–310.
- Bouttier, M., Laperriere, D., Memari, B., Mangiapane, J., Fiore, A., Mitchell, E., Verway, M., Behr, M.A., Sladek, R., Barreiro, L.B., Mader, S. & White, J.H. 2016. Alu repeats as transcriptional regulatory platforms in macrophage responses to M. tuberculosis infection. *Nucleic Acids Research* 44(22): 10571–10587.
- Bradner, J.E., Hnisz, D. & Young, R.A. 2017. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* 168(4): 629–643.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S. & Schreiber, S.L. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369(6483): 756–758.
- Brownlee, P.M., Chambers, A.L., Oliver, A.W. & Downs, J.A. 2012. Cancer and the bromodomains of BAF180. *Biochemical Society Transactions* 40(2): 364–369.
- Bruick, R.K. & McKnight, S.L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294(5545): 1337–1340.
- Buecker, C. & Wysocka, J. 2012. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends in genetics : TIG* 28(6): 276–284.
- Bulger, M. & Groudine, M. 2011. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144(3): 327–339.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407): 330–337.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2016. Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 374(2): 135–145.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C. & Stuart, J.M. 2013. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature Genetics* 45(10): 1113–1120.
- Capodiferro, S., Limongelli, L., Mastropasqua, M.G., Favia, G., Lajolo, C., Colella, G., Tempesta, A. & Maiorano, E. 2020. Metastatic Tumors of the Oro-Facial Tissues: Clear Cell Renal Cell Carcinoma. A Clinico-Pathological and Immunohistochemical Study of Seven Cases. *Journal of clinical medicine* 9(4).

- Cassandri, M., Porrazzo, A., Pomella, S., Noce, B., Zwergel, C., Aiello, F.A., Vulcano, F., Milazzo, L., Camero, S., Pajalunga, D., Spada, M., Manzi, V., Gravina, G.L., Codenotti, S., Piccione, M., Tomaciello, M., Signore, M., Barillari, G., Marchese, C., Fanzani, A., De Angelis, B., Quintarelli, C., Vakoc, C.R., Chen, E.Y., Megiorni, F., Locatelli, F., Valente, S., Mai, A., Rota, R. & Marampon, F. 2024. HDAC3 genetic and pharmacologic inhibition radiosensitizes fusion positive rhabdomyosarcoma by promoting DNA double-strand breaks. *Cell Death Discovery* 10(1): 1–20.
- Chapuy, B., McKeown, M.R., Lin, C.Y., Monti, S., Roemer, M.G.M., Qi, J., Rahl, P.B., Sun, H.H., Yeda, K.T., Doench, J.G., Reichert, E., Kung, A.L., Rodig, S.J., Young, R.A., Shipp, M.A. & Bradner, J.E. 2013. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 24(6): 777–790.
- Chen, T. & Dent, S.Y.R. 2013. Chromatin modifiers: regulators of cellular differentiation. *Nature reviews. Genetics* 15(2): 93.
- Chen, T., Gao, D., Zhang, R., Zeng, G., Yan, H., Lim, E. & Liang, F.-S. 2017. Chemically Controlled Epigenome Editing Through an Inducible dCas9 System. *Journal of the American Chemical Society* 139(33): 11337–11340.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y.-H., Yeo, H.C., Yeo, Z.X., Narang, V., Govindarajan, K.R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W.-K., Clarke, N.D., Wei, C.-L. & Ng, H.-H. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133(6): 1106–1117.
- Choueiri, T.K. & Motzer, R.J. 2017. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 376(4): 354–366.
- Chow, W.-H., Dong, L.M. & Devesa, S.S. 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature reviews. Urology* 7(5): 245–257.
- Christakoudi, S., Kakourou, A., Markozannes, G., Tzoulaki, I., Weiderpass, E., Brennan, P., Gunter, M., Dahm, C.C., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Boutron-Ruault, M.-C., Madika, A.-L., Severi, G., Katzke, V., Kühn, T., Bergmann, M.M., Boeing, H., Karakatsani, A., Martimianaki, G., Thriskos, P., Masala, G., Sieri, S., Panico, S., Tumino, R., Ricceri, F., Agudo, A., Redondo-Sánchez, D., Colorado-Yohar, S.M., Mokoroa, O., Melander, O., Stocks, T., Häggström, C., Harlid, S., Bueno-de-Mesquita, B., van Gils, C.H., Vermeulen, R.C.H., Khaw, K.-T., Wareham, N.J., Tong, T.Y.N., Freisling, H., Johansson, M., Lennon, H., Aune, D., Riboli, E., Trichopoulos, D., Trichopoulou, A. & Tsilidis, K.K. 2020. Blood pressure and risk of cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International journal of cancer* 146(10): 2680–2693.

- Chung, J., Grammar, T.C., Lemon, K.P., Kazlauskas, A. & Blenis, J. 1994. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370(6484): 71–75.
- Clapier, C.R. & Cairns, B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* 78: 273–304.
- Clark, D.J., Dhanasekaran, S.M., Petralia, F., Jianbo, Pan, Xiaoyu, Song, Yingwei, Hu, da Veiga Leprevost, F., Reva, B., Tung-Shing, M. Lih, Hui-Yin, Chang, Weiping, Ma, Chen, Huang, Ricketts, C.J., Lijun, Chen, Krek, A., Yize, Li, Rykunov, D., Qing, Kay Li, Lin, S. Chen, Ozbek, U., Vasaikar, S., Yige, Wu, Seungyeul, Yoo, Chowdhury, S., Wyczalkowski, M.A., Jiayi, Ji, Schnaubelt, M., Kong, A., Sethuraman, S., Avtonomov, D.M., Minghui, Ao, Colaprico, A., Song, Cao, Kyung-Cho, Cho, Kalayci, S., Shiyong, Ma, Wenke, Liu, Ruggles, K., Calinawan, A., Gümüş, Z.H., Geizler, D., Kawaler, E., Guo, Ci Teo, Bo, Wen, Yuping, Zhang, Keegan, S., Kai, Li, Feng, Chen, Edwards, N., Pierorazio, P.M., Chen, X.S., Pavlovich, C.P., Hakimi, A.A., Brominski, G., Hsieh, J.J., Antczak, A., Omelchenko, T., Lubinski, J., Wiznerowicz, M., Linehan, W.M., Kinsinger, C.R., Thiagarajan, M., Boja, E.S., Mesri, M., Hiltke, T., Robles, A.I., Rodriguez, H., Jiang, Qian, Fenyö, D., Bing, Zhang, Li, Ding, Schadt, E., Chinnaiyan, A.M., Zhen, Zhang, Omenn, G.S., Cieslik, M., Chan, D.W., Nesvizhskii, A.I., Pei, Wang & Zhen, Zhang. 2019. Integrated Proteogenomic Characterization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell* 179(4): 964–983.
- Cooley Coleman, J.A., Sarasua, S.M., Moore, H.W., Boccuto, L., Cowan, C.W., Skinner, S.A. & DeLuca, J.M. 2022. Clinical findings from the landmark MEF2C -related disorders natural history study. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 10(6): 1919.
- Courtney, K.D., Infante, J.R., Lam, E.T., Figlin, R.A., Rini, B.I., Brugarolas, J., Naseem, J., Lowe, A.M., Wang, K., Wallace, E.M., Josey, J.A. & Choueiri, T.K. 2018. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385 , a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 a Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 36(9).
- Crawford, N.P.S., Alsarraj, J., Lukes, L., Walker, R.C., Officewala, J.S., Yang, H.H., Lee, M.P., Ozato, K. & Hunter, K.W. 2008. Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17): 6380–6385.
- Cree, I.A. 2011. Cancer biology. *Methods in Molecular Biology* 731: 1–11.
- Cserni, G. 2002. Tumour histological grade may progress between primary and recurrent invasive mammary carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 55(4): 293–297.
- Czyzyk-Krzeska, M.F., Meller, J., Landero Figueroa, J.A., Plas, D.R. & Cunningham, J.T. 2021. Metabolic subtypes of clear cell renal cell carcinoma defined by tobacco smoking. *Molecular & cellular oncology* 8(2): 1859917–1859917.

- Dang, C.V. 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149(1): 22–35.
- Dao, L.T.M., Galindo-Albarrán, A.O., Castro-Mondragon, J.A., Andrieu-Soler, C., Medina-Rivera, A., Souaid, C., Charbonnier, G., Griffon, A., Vanhille, L., Stephen, T., Alomairi, J., Martin, D., Torres, M., Fernandez, N., Soler, E., van Helden, J., Puthier, D. & Spicuglia, S. 2017. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nature Genetics* 49(7): 1073–1081.
- Date, D., Das, R., Narla, G., Simon, D.I., Jain, M.K. & Mahabeleshwar, G.H. 2014. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *The Journal of biological chemistry* 289(15): 10318–10329.
- Davis, C.F., Ricketts, C.J., Wang, M., Yang, L., Cherniack, A.D., Shen, H., Buhay, C., Kang, H., Kim, S.C., Fahey, C.C., Hacker, K.E., Bhanot, G., Gordenin, D.A., Chu, A., Gunaratne, P.H., Biehl, M., Seth, S., Kaiparettu, B.A., Bristow, C.A., Donehower, L.A., Wallen, E.M., Smith, A.B., Tickoo, S.K., Tamboli, P., Reuter, V., Schmidt, L.S., Hsieh, J.J., Choueiri, T.K., Hakimi, A.A., The Cancer Genome Atlas Research Network, Chin, L., Meyerson, M., Kucherlapati, R., Park, W.-Y., Robertson, A.G., Laird, P.W., Henske, E.P., Kwiatkowski, D.J., Park, P.J., Morgan, M., Shuch, B., Muzny, D., Wheeler, D.A., Linehan, W.M., Gibbs, R.A., Rathmell, W.K. & Creighton, C.J. 2014. The Somatic Genomic Landscape of Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 26(3): 319–330.
- Davoody, S., Asgari Taei, A., Khodabakhsh, P. & Dargahi, L. 2024. mTOR signaling and Alzheimer's disease: What we know and where we are? *CNS neuroscience & therapeutics* 30(4): 14463.
- De, S., Sahu, R., Palei, S. & Narayan Nanda, L. 2024. Synthesis, SAR, and application of JQ1 analogs as PROTACs for cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 112: 117875.
- Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A.C., McKeown, M.R., Heffernan, T.P., Vakoc, C.R., Bergsagel, P.L., Ghobrial, I.M., Richardson, P.G., Young, R.A., Hahn, W.C., Anderson, K.C., Kung, A.L., Bradner, J.E. & Mitsiades, C.S. 2011. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146(6): 904–917.
- Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J. & Ozato, K. 2009. Brd4 Marks Select Genes on Mitotic Chromatin and Directs Postmitotic Transcription. *Molecular Biology of the Cell* 20(23): 4899–4909.
- Dhayalan, A., Rajavelu, A., Rathert, P., Tamas, R., Jurkowska, R.Z., Ragozin, S. & Jeltsch, A. 2010. The Dnmt3a PWWP Domain Reads Histone 3 Lysine 36 Trimethylation and Guides DNA Methylation. *Journal of Biological Chemistry* 285(34): 26114–26120.

- Di Micco, R., Fontanals-Cirera, B., Low, V., Ntziachristos, P., Yuen, S.K., Lovell, C.D., Dolgalev, I., Yonekubo, Y., Zhang, G., Rusinova, E., Gerona-Navarro, G., Cañamero, M., Ohlmeyer, M., Aifantis, I., Zhou, M.-M., Tsirigos, A. & Hernando, E. 2014. Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Reports* 9(1): 234–247.
- Diamond, E., Molina, A.M., Carbonaro, M., Akhtar, N.H., Giannakakou, P., Tagawa, S.T. & Nanus, D.M. 2015. Cytotoxic chemotherapy in the treatment of advanced renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 96(3): 518–526.
- Difeo, A., Huang, F., Sangodkar, J., Terzo, E.A., Leake, D., Narla, G. & Martignetti, J.A. 2009. KLF6-SV1 is a novel antiapoptotic protein that targets the BH3-only protein NOXA for degradation and whose inhibition extends survival in an ovarian cancer model. *Cancer research* 69(11): 4733–4741.
- Dionyssiou, M.G., Salma, J., Bevzyuk, M., Wales, S., Zakharyan, L. & McDermott, J.C. 2013. Krüppel-like factor 6 (KLF6) promotes cell proliferation in skeletal myoblasts in response to TGF β /Smad3 signaling. *Skeletal Muscle* 3(1): 7.
- Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J. & Espinosa, J.M. 2010. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(2): 194–201.
- Ebrahimi, A., Sevinç, K., Gürhan Sevinç, G., Cribbs, A.P., Philpott, M., Uyulur, F., Morova, T., Dunford, J.E., Göklemez, S., Ari, Ş., Oppermann, U. & Önder, T.T. 2019. Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nature Chemical Biology* 15(5): 519–528.
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Grünwald, V., Gillessen, S. & Horwich, A. 2019. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 30(5): 706–720.
- Features, C. & Pathology, G. 2019. Clear Cell Papillary Renal Cell Carcinoma. *Archive of Pathology & Laboratory Medicine* 143: 1154–1158.
- Fellmann, C., Hoffmann, T., Sridhar, V., Hopfgartner, B., Muhar, M., Roth, M., Lai, D.Y., Barbosa, I.A.M., Kwon, J.S., Guan, Y., Sinha, N. & Zuber, J. 2013. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Reports* 5(6): 1704–1713.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M.R., Wang, Y., Christie, A.L., West, N., Cameron, M.J., Schwartz, B., Heightman, T.D., La Thangue, N., French, C.A., Wiest, O., Kung, A.L., Knapp, S. & Bradner, J.E. 2010. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468(7327): 1067–1073.

- Fischer, E.A., Verpont, M.-C., Garrett-Sinha, L.A., Ronco, P.M. & Rossert, J.A. 2001. Klf6 is a zinc finger protein expressed in a cell-specific manner during kidney development. *Journal of the American Society of Nephrology* 12(4): 726–735.
- Flavahan, W.A., Gaskell, E. & Bernstein, B.E. 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* 357(6348): 2380.
- Flavell, S.W., Kim, T.-K., Gray, J.M., Harmin, D.A., Hemberg, M., Hong, E.J., Markenscoff-Papadimitriou, E., Bear, D.M. & Greenberg, M.E. 2008. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60(6): 1022–1038.
- Gabay, M., Li, Y. & Felsher, D.W. 2014. MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4: 1–13.
- Ganner, A., Gehrke, C., Klein, M., Thegtmeier, L., Matulenski, T., Wingendorf, L., Wang, L., Pilz, F., Greidl, L., Meid, L., Kotsis, F., Walz, G., Frew, I.J. & Neumann-Haefelin, E. 2021. VHL suppresses RAPTOR and inhibits mTORC1 signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Scientific Reports* 11(1): 14827.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C. & Schultz, N. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6(269): p11–p11.
- Garcia, P.L., Miller, A.L., Gamblin, T.L., Council, L.N., Christein, J.D., Arnoletti, J.P., Heslin, M.J., Reddy, S., Richardson, J.H., Cui, X., van Waardenburg, R.C.A.M., Bradner, J.E., Yang, E.S. & Yoon, K.J. 2018. JQ1 Induces DNA Damage and Apoptosis, and Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Xenograft Model of Cholangiocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1): 107–118.
- Garcia-Carpizo, V., Ruiz-Llorente, S., Sarmentero, J., Graña-Castro, O., Pisano, D.G. & Barrero, M.J. 2018. CREBBP/EP300 bromodomains are critical to sustain the GATA1/MYC regulatory axis in proliferation. *Epigenetics & Chromatin* 11(1): 30.
- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A.J. & Salm, M.P. 2014. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature Genetics* 46(3): 225–233.
- Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C., Qi, L.S., Kampmann, M. & Weissman, J.S. 2014. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159(3): 647–661.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S. & Qi, L.S. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154(2): 442–451.

- Gjaltema, R.A.F. & Rots, M.G. 2020. Advances of epigenetic editing. *Current Opinion in Chemical Biology* 57: 75–81.
- Gopal Krishnan, P.D., Golden, E., Woodward, E.A., Pavlos, N.J. & Blancafort, P. 2020. Rab GTPases: Emerging Oncogenes and Tumor Suppressive Regulators for the Editing of Survival Pathways in Cancer. *Cancers* 12(2): 259.
- Gorkin, D.U., Leung, D. & Ren, B. 2014. The 3D genome in transcriptional regulation and pluripotency. *Cell Stem Cell* 14(6): 762–775.
- Gossage, L., Eisen, T. & Maher, E.R. 2015. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature Reviews Cancer* 15(1): 55–64.
- Gounder, M.M., Thomas, D.M. & Tap, W.D. 2018. Locally Aggressive Connective Tissue Tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36(2): 202–209.
- Guo, Guangwu, Gui, Yaoting, Gao, Shengjie, Tang, Aifa, Hu, Xueda, Huang, Yi, Jia, Wenlong, Li, Zesong, He, Minghui, Sun, Liang, Song, Pengfei, Sun, Xiaojuan, Zhao, Xiaokun, Yang, Sangming, Liang, Chaozhao, Wan, Shengqing, Zhou, Fangjian, Chen, Chao, Zhu, Jialou, Li, Xianxin, Jian, Minghan, Zhou, Liang, Ye, Rui, Huang, Peide, Chen, Jing, Jiang, Tao, Liu, Xiao, Wang, Yong, Zou, Jing, Jiang, Zhimao, Wu, Renhua, Wu, Song, Fan, Fan, Zhang, Zhongfu, Liu, Lin, Yang, Ruilin, Liu, Xingwang, Wu, Haibo, Yin, Weihua, Zhao, Xia, Liu, Yuchen, Peng, Huanhuan, Jiang, Binghua, Feng, Qingxin, Li, Cailing, Xie, Jun, Lu, Jingxiao, Kristiansen, Karsten, Li, Yingrui, Zhang, Xiuqing, Li, Songgang, Wang, Jian, Yang, Huanming, Cai, Zhiming & Wang, Jun. 2012. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics* 44(1): 17–19.
- Hafner, A., Bulyk, M.L., Jambhekar, A. & Lahav, G. 2019. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20(4): 199–210.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12(1): 31–46.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1): 57–70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646–674.
- Harwood, F.C., Klein Geltink, R.I., O'Hara, B.P., Cardone, M., Janke, L., Finkelstein, D., Entin, I., Paul, L., Houghton, P.J. & Grosveld, G.C. 2018. ETV7 is an essential component of a rapamycin-insensitive mTOR complex in cancer. *Science advances* 4(9).
- Hashemi, S., Salma, J., Wales, S. & McDermott, J.C. 2015. Pro-survival function of MEF2 in cardiomyocytes is enhanced by β -blockers. *Cell Death Discovery* 1(1): 1–11.

- Heintzman, N.D. & Ren, B. 2009. Finding distal regulatory elements in the human genome. *Current Opinion in Genetics & Development* 19(6): 541–549.
- Hilton, I.B. & others. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33: 510–517.
- Hogg, S.J., Motorna, O., Cluse, L.A., Johanson, T.M., Coughlan, H.D., Raviram, R., Myers, R.M., Costacurta, M., Todorovski, I., Pijpers, L., Bjelosevic, S., Williams, T., Huskins, S.N., Kearney, C.J., Devlin, J.R., Fan, Zheng, Jabbari, J.S., Martin, B.P., Fareh, M., Kelly, M.J., Dupéré-Richer, D., Sandow, J.J., Feran, B., Knight, D., Khong, T., Spencer, A., Harrison, S.J., Gregory, G., Wickramasinghe, V.O., Webb, A.I., Taberlay, P.C., Bromberg, K.D., Lai, A., Papenfuss, A.T., Smyth, G.K., Allan, R.S., Licht, J.D., Landau, D.A., Abdel-Wahab, O., Shortt, J., Vervoort, S.J. & Johnstone, R.W. 2021. Targeting histone acetylation dynamics and oncogenic transcription by catalytic P300/CBP inhibition. *Molecular Cell* 81(10): 2183–2200.
- Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooi, J.J., Stubbs, A., Versteegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooi, C., Klous, P., van Vlierberghe, P., Ferrando, A.A., Cayuela, J.M., Verhaaf, B., Beverloo, H.B., Horstmann, M., de Haas, V., Wiekmeijer, A.S., Pike-Overzet, K., Staal, F.J.T., de Laat, W., Soulier, J., Sigaux, F. & Meijerink, J.P.P. 2011. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 19(4): 484–497.
- Hsu, E., Zemke, N.R. & Berk, A.J. 2021. Promoter-specific changes in initiation, elongation, and homeostasis of histone H3 acetylation during CBP/p300 inhibition. *eLife* 10: 63512.
- Hua, X., Ge, S., Zhang, L., Jiang, Q., Chen, J., Xiao, H. & Liang, C. 2024. MED15 is upregulated by HIF-2 α and promotes proliferation and metastasis in clear cell renal cell carcinoma via activation of SREBP-dependent fatty acid synthesis. *Cell Death Discovery* 10: 188.
- Huang, Y., Mouttet, B., Warnatz, H.-J., Risch, T., Rietmann, F., Frommelt, F., Ngo, Q.A., Dobay, M.P., Marovca, B., Jenni, S., Tsai, Y.-C., Matzk, S., Amstislavskiy, V., Schrappe, M., Stanulla, M., Gstaiger, M., Bornhauser, B., Yaspo, M.-L. & Bourquin, J.-P. 2019. The Leukemogenic TCF3-HLF Complex Rewires Enhancers Driving Cellular Identity and Self-Renewal Conferring EP300 Vulnerability. *Cancer Cell* 36(6): 630–644.
- Inuzuka, H., Nanbu-Wakao, R., Masuho, Y., Muramatsu, M., Tojo, H. & Wakao, H. 1999. Differential regulation of immediate early gene expression in preadipocyte cells through multiple signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 265(3): 664–668.
- Ito, G., Uchiyama, M., Kondo, M., Mori, S., Usami, N., Maeda, O., Kawabe, T., Hasegawa, Y., Shimokata, K. & Sekido, Y. 2004. Krüppel-like factor 6 is

frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer research* 64(11): 3838–3843.

Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Günzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway, J.W. & Kaelin, W.G.J. 2002. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13459–13464.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M.A., Hall, A. & Hall, M.N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* 6(11): 1122–1128.

Jere, S.W., Houreld, N.N. & Abrahamse, H. 2019. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 50: 52–59.

Jin, S., Zong, Y., Gao, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Qin, P., Liang, C., Wang, D., Qiu, J.-L., Zhang, F. & Gao, C. 2019. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* 364(6437): 292–295.

Jin, W., Shang, Y., Peng, J. & Jiang, S. 2016. Histone H3 Methyltransferase Suv39h1 Prevents Myogenic Terminal Differentiation by Repressing MEF2 Activity in Muscle Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 17(12): 1908.

Joseph, R.W., Kapur, P., Serie, D.J., Parasramka, M., Ho, T.H., Cheville, J.C., Frenkel, E., Parker, A.S. & Brugarolas, J. 2016. Clear Cell Renal Cell Carcinoma Subtypes Identified by BAP1 and PBRM1 Expression. *The Journal of Urology* 195(1): 180–187.

Junwei, S. & Vakoc, C.R. 2014. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Molecular cell* 54(5): 728–736.

Kaelin, W.G.J. 2002. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nature reviews. Cancer* 2(9): 673–682.

Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., Taatjes, D.J., Dekker, J. & Young, R.A. 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467(7314): 430–435.

Kamus Dewan. 2005. . Edisi Kedua. Dewan Bahasa Dan Pustaka: Kuala Lumpur.

Kapur, P., Peña-Llopis, S., Christie, A., Zhrebker, L., Pavía-Jiménez, A., Rathmell, W.K., Xie, X.-J. & Brugarolas, J. 2013. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *The Lancet. Oncology* 14(2): 159–167.

Kastenhuber, E.R. & Lowe, S.W. 2017. Putting p53 in Context. *Cell* 170(6): 1062–1078.

- Kawashima-Goto, S., Imamura, T., Tomoyasu, C., Yano, M., Yoshida, H., Fujiki, A., Tamura, S., Osone, S., Ishida, H., Morimoto, A., Kuroda, H. & Hosoi, H. 2015. BCL2 Inhibitor (ABT-737): A Restorer of Prednisolone Sensitivity in Early T-Cell Precursor-Acute Lymphoblastic Leukemia with High MEF2C Expression? *PloS One* 10(7): 0132926.
- Keith, B., Johnson, R.S. & Simon, M.C. 2011. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer* 12(1): 9–22.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A. & Kaelin, W.G.J. 1995. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269(5229): 1444–1446.
- Kim, G.-D., Das, R., Goduni, L., McClellan, S., Hazlett, L.D. & Mahabeleshwar, G.H. 2016. Kruppel-like Factor 6 Promotes Macrophage-mediated Inflammation by Suppressing B Cell Leukemia/Lymphoma 6 Expression. *The Journal of biological chemistry* 291(40): 21271–21282.
- Kim, G.-D., Ng, H.P., Chan, E.R. & Mahabeleshwar, G.H. 2020. Kruppel-like factor 6 promotes macrophage inflammatory and hypoxia response. *The FASEB Journal* 34(2): 3209–3223.
- Kishida, T., Stackhouse, T.M., Chen, F., Lerman, M.I. & Zbar, B. 1995. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer research* 55(20): 4544–4548.
- Klann, T.S., Black, J.B., Chellappan, M., Safi, A., Song, L., Hilton, I.B., Crawford, G.E., Reddy, T.E. & Gersbach, C.A. 2017. CRISPR–Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature Biotechnology* 35(6): 561–568.
- Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Velasco-Herrera, M.D.C. & Yusa, K. 2014. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nature Biotechnology* 32(3): 267–273.
- Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M.P. & Friedman, S.L. 2000. Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood* 95(4): 1309–1316.
- Kopeina, G.S. & Zhivotovsky, B. 2022. Programmed cell death: Past, present and future. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 633: 55–58.
- Koritschoner, N.P., Bocco, J.L., Panzetta-Dutari, G.M., Dumur, C.I., Flury, A. & Patrito, L.C. 1997. A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *The Journal of biological chemistry* 272(14): 9573–9580.
- Kucejova, B., Peña-Llopis, S., Yamasaki, T., Sivanand, S., Tran, T.A.T., Alexander, S., Wolff, N.C., Lotan, Y., Xie, X.-J., Kabbani, W., Kapur, P. & Brugarolas, J.

2011. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Molecular cancer research: MCR* 9(9): 1255–1265.
- Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., Nagae, G., Yoshida, H., Aburatani, H. & Koike, K. 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Science* 103(4): 670–676.
- Kuscu, C., Mammadov, R., Czikora, A., Unlu, H., Tufan, T., Fischer, N.L., Arslan, S., Bekiranov, S., Kanemaki, M. & Adli, M. 2019. Temporal and Spatial Epigenome Editing Allows Precise Gene Regulation in Mammalian Cells. *Journal of Molecular Biology* 431(1): 111–121.
- Kwon, D.-Y. & others. 2017. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun* 8: 15315.
- Lai, B., Lee, J.-E., Jang, Y., Wang, L., Peng, W. & Ge, K. 2017. MLL3/MLL4 are required for CBP/p300 binding on enhancers and super-enhancer formation in brown adipogenesis. *Nucleic Acids Research* 45(11): 6388–6403.
- Laitman, B.M., Asp, L., Mariani, J.N., Zhang, J., Liu, J., Sawai, S., Chapouly, C., Horng, S., Kramer, E.G., Mitiku, N., Loo, H., Burlant, N., Pedre, X., Hara, Y., Nudelman, G., Zaslavsky, E., Lee, Y.-M., Braun, D.A., Lu, Q.R., Narla, G., Raine, C.S., Friedman, S.L., Casaccia, P. & John, G.R. 2016. The Transcriptional Activator Krüppel-like Factor-6 Is Required for CNS Myelination. *PLoS biology* 14(5).
- Lasko, L.M., Jakob, C.G., Edalji, R.P., Qiu, W., Montgomery, D., Digiammarino, E.L., Hansen, T.M., Risi, R.M., Frey, R., Manaves, V., Shaw, B., Algire, M., Hessler, P., Lam, L.T., Uziel, T., Faivre, E., Ferguson, D., Buchanan, F.G., Martin, R.L., Torrent, M., Chiang, G.G., Karukurichi, K., Langston, J.W., Weinert, B.T., Choudhary, C., de Vries, P., Van Drie, J.H., McElligott, D., Kesicki, E., Marmorstein, R., Sun, C., Cole, P.A., Rosenberg, S.H., Michaelides, M.R., Lai, A. & Bromberg, K.D. 2017. Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature* 550(7674): 128–132.
- Laub, F., Aldabe, R., Ramirez, F. & Friedman, S. 2001. Embryonic expression of Krüppel-like factor 6 in neural and non-neural tissues. *Mechanisms of development* 106(1–2): 167–170.
- Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G.N. & Klausner, R.D. 1999. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biology* 19(2): 1486–1497.
- Lee, T.I. & Young, R.A. 2013. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* 152(6): 1237–1251.
- Leifer, D., Krainc, D., Yu, Y.T., McDermott, J., Breitbart, R.E., Heng, J., Neve, R.L., Kosofsky, B., Nadal-Ginard, B. & Lipton, S.A. 1993. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(4): 1546–1550.

Leow, C.C., Wang, B.-E., Ross, J., Chan, S.M., Zha, J., Carano, R.A.D., Frantz, G., Shen, M.M., de Sauvage, F.J. & Gao, W.-Q. 2009. Prostate-specific Klf6 inactivation impairs anterior prostate branching morphogenesis through increased activation of the Shh pathway. *The Journal of biological chemistry* 284(31): 21057–21065.

Levine, D.A. 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497(7447): 67–73.

Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J.M., Friedman, S.L. & Walsh, M.J. 2005. Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *The Journal of biological chemistry* 280(29): 26941–26952.

Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W. & Li, G.-M. 2013. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSα. *Cell* 153(3): 590–600.

Li, J., Wang, Y., Zhang, X., Yang, X., Qi, Q., Mi, Q., Feng, M., Wang, Y., Wang, C., Li, P. & Du, L. 2023. Characterisation of a novel transcript LNPPS acting as tumour suppressor in bladder cancer via PDCD5-mediated p53 degradation blockage. *Clinical and Translational Medicine* 13(1): 1149.

Lin, H., Liang, Z.-Y., Tang, H. & Chen, W. 2019. Identifying Sigma70 Promoters with Novel Pseudo Nucleotide Composition. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics* 16(4): 1316–1321.

Liu, B., Liu, X., Han, L., Chen, X., Wu, X., Wu, J., Yan, D., Wang, Y., Liu, S., Shan, L., Zhang, Y. & Shang, Y. 2022. BRD4-directed super-enhancer organization of transcription repression programs links to chemotherapeutic efficacy in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(6): 2109133119.

Liu, W., Stein, P., Cheng, X., Yang, W., Shao, N.-Y., Morrissey, E.E., Schultz, R.M. & You, J. 2014. BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death & Differentiation* 21(12): 1950–1960.

Liu, Y., Liu, H., Ye, M., Jiang, M., Chen, X., Song, G., Ji, H., Wang, Z.-W. & Zhu, X. 2023. Methylation of BRD4 by PRMT1 regulates BRD4 phosphorylation and promotes ovarian cancer invasion. *Cell Death & Disease* 14(9): 624.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. & Hall, M.N. 2002. Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell* 10(3): 457–468.

- Lorzadeh, A., Bilenky, M., Hammond, C., Knapp, D.J.H.F., Li, L., Miller, P.H., Carles, A., Heravi-Moussavi, A., Gakkhar, S., Moksa, M., Eaves, C.J. & Hirst, M. 2016. Nucleosome Density ChIP-Seq Identifies Distinct Chromatin Modification Signatures Associated with MNase Accessibility. *Cell Reports* 17(8): 2112–2124.
- Lovén, J., Hoke, H.A., Lin, C.Y., Lau, A., Orlando, D.A., Vakoc, C.R., Bradner, J.E., Lee, T.I. & Young, R.A. 2013. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153(2): 320–334.
- Ma, Y., Patel, N., Yell, P., Hao, G., Yousuf, Q., Joyce, A., Pedrosa, I., Geiger, H., Zhang, H., Chang, J., Gardner, K.H., Bruick, R.K., Reeves, C., Hwang, T.H., Courtney, K., Frenkel, E., Sun, X., Zojwalla, N., Wong, T., James, P., McKay, R.M. & Brugarolas, J. 2016. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* 539(7627): 112–117.
- Machida, Y.J., Machida, Y., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A. & Dutta, A. 2009. The Deubiquitinating Enzyme BAP1 Regulates Cell Growth via Interaction with HCF-1. *The Journal of Biological Chemistry* 284(49): 34179–34188.
- Malaysian National Cancer Registry Report. 2012. .
- Mansour, M.R., Abraham, B.J., Anders, L., Berezovskaya, A., Gutierrez, A., Durbin, A.D., Etchin, J., Lawton, L., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Loh, M.L., Hunger, S.P., Sanda, T., Young, R.A. & Look, A.T. 2014. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science* 346(6215): 1373–1377.
- Mariño, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S.A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., Zamzami, N., Scoazec, M., Durand, S., Enot, D.P., Fernández, Á.F., Martins, I., Kepp, O., Senovilla, L., Bauvy, C., Morselli, E., Vacchelli, E., Bennetzen, M., Magnes, C., Sinner, F., Pieber, T., López-Otín, C., Maiuri, M.C., Codogno, P., Andersen, J.S., Hill, J.A., Madeo, F. & Kroemer, G. 2014. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Molecular Cell* 53(5): 710–725.
- Martire, S., Nguyen, J., Sundaresan, A. & Banaszynski, L.A. 2020. Differential contribution of p300 and CBP to regulatory element acetylation in mESCs. *BMC molecular and cell biology* 21(1): 55.
- Mertz, J.A., Conery, A.R., Bryant, B.M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D.A., Bergeron, L. & Sims, R.J. 2011. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(40): 16669–16674.
- Meyer, N. & Penn, L.Z. 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews. Cancer* 8(12): 976–990.
- Min, J.-H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G.J. & Pavletich, N.P. 2002. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296(5574): 1886–1889.

- Moldvai, D., Sztankovics, D., Dankó, T., Vetlényi, E., Petővári, G., Márk, Á., Patonai, A., Végső, G., Piros, L., Hosszú, Á., Pápay, J., Krencz, I. & Sebestyén, A. 2024. Tumorigenic role of tacrolimus through mTORC1/C2 activation in post-transplant renal cell carcinomas. *British Journal of Cancer* 130(7): 1119–1130.
- Moore, L.D., Le, T. & Fan, G. 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38(1): 23–38.
- Muerdter, F., Boryń, Ł.M., Woodfin, A.R., Neumayr, C., Rath, M., Zabidi, M.A., Pagani, M., Haberle, V., Kazmar, T., Catarino, R.R., Schernhuber, K., Arnold, C.D. & Stark, A. 2018. Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. *Nature Methods* 15(2): 141–149.
- Nagarajan, S., Rao, S.V., Sutton, J., Cheeseman, D., Dunn, S., Papachristou, E.K., Prada, J.-E.G., Couturier, D.-L., Kumar, S., Kishore, K., Chilamakuri, C.S.R., Glont, S.-E., Archer Goode, E., Brodie, C., Guppy, N., Natrajan, R., Bruna, A., Caldas, C., Russell, A., Siersbæk, R., Yusa, K., Chernukhin, I. & Carroll, J.S. 2020. ARID1A influences HDAC1/BRD4 activity, intrinsic proliferative capacity and breast cancer treatment response. *Nature Genetics* 52(2): 187–197.
- Nakamura, H., Chiambaretta, F., Sugar, J., Sapin, V. & Yue, B.Y.J.T. 2004. Developmentally regulated expression of KLF6 in the mouse cornea and lens. *Investigative ophthalmology & visual science* 45(12): 4327–4332.
- Narita, T., Ito, S., Higashijima, Y., Chu, W.K., Neumann, K., Walter, J., Satpathy, S., Liebner, T., Hamilton, W.B., Maskey, E., Prus, G., Shibata, M., Iesmantavicius, V., Brickman, J.M., Anastassiadis, K., Koseki, H. & Choudhary, C. 2021. Enhancers are activated by p300/CBP activity-dependent PIC assembly, RNAPII recruitment, and pause release. *Molecular Cell* 81(10): 2166–2182.e6.
- Narla, G., Heath, K.E., Reeves, H.L., Li, D., Giono, L.E., Kimmelman, A.C., Glucksman, M.J., Narla, J., Eng, F.J., Chan, A.M., Ferrari, A.C., Martignetti, J.A. & Friedman, S.L. 2001. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294(5551): 2563–2566.
- National Cancer Institute. 2011. Urinary system. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/urinary-system> [19 Jun 2024].
- National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. 2014. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.
- Natoli, G. 2010. Maintaining cell identity through global control of genomic organization. *Immunity* 33(1): 12–24.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C.M., Lora, J.M., Prinjha, R.K., Lee, K. & Tarakhovsky, A. 2010. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468(7327): 1119–1123.

- Ogiwara, H., Sasaki, M., Mitachi, T., Oike, T., Higuchi, S., Tominaga, Y. & Kohno, T. 2016. Targeting p300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death due to Abrogation of MYC Expression. *Cancer Discovery* 6(4): 430–445.
- de Oliveira, D.T. & Guerra-Sá, R. 2020. Uncovering epigenetic landscape: a new path for biomarkers identification and drug development. *Molecular Biology Reports* 47(11): 9097–9122.
- Ong, C.-T. & Corces, V.G. 2011. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics* 12(4): 283–293.
- Ortega, E., Rengachari, S., Ibrahim, Z., Hoghoughi, N., Gaucher, J., Holehouse, A.S., Khochbin, S. & Panne, D. 2018. Transcription factor dimerization activates the p300 acetyltransferase. *Nature* 562(7728): 538–544.
- Pal, S.K., Ali, S.M., Yakirevich, E., Geynisman, D.M., Karam, J.A., Elvin, J.A., Frampton, G.M., Huang, X., Lin, D.I., Rosenzweig, M., Lipson, D., Stephens, P.J., Ross, J.S., Miller, V.A., Agarwal, N., Shuch, B., Choueiri, T.K. & Chung, J.H. 2018. Characterization of Clinical Cases of Advanced Papillary Renal Cell Carcinoma via Comprehensive Genomic Profiling. *European Urology* 73(1): 71–78.
- Pan, M. & Blattner, C. 2021. Regulation of p53 by E3s. *Cancers* 13(4): 745.
- Pantuck, A.J., Seligson, D.B., Klatte, T., Yu, H., Leppert, J.T., Moore, L., O'Toole, T., Gibbons, J., Beldegrun, A.S. & Figlin, R.A. 2007. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 109(11): 2257–2267.
- Park, J.-H., Eliyahu, E., Narla, G., DiFeo, A., Martignetti, J.A. & Schuchman, E.H. 2005. KLF6 is one transcription factor involved in regulating acid ceramidase gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1732(1–3): 82–87.
- Park, S.-Y., Hwang, B.-O. & Song, N.-Y. 2023. The role of myokines in cancer: crosstalk between skeletal muscle and tumor. *BMB reports* 56(7): 365–373.
- Patel, S.A., Hirosue, S., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Richardson, E.K., Ge, J., Syafruddin, S.E., Speed, A., Papachristou, E.K., Baker, D., Clarke, D., Purvis, S., Wesolowski, L., Dyas, A., Castillon, L., Caraffini, V., Bihary, D., Yong, C., Harrison, D.J., Stewart, G.D., Machiela, M.J., Purdue, M.P., Chanock, S.J., Warren, A.Y., Samarajiwa, S.A., Carroll, J.S. & Vanharanta, S. 2022. The renal lineage factor PAX8 controls oncogenic signalling in kidney cancer. *Nature* 606(7916): 999–1006.
- Pater, L., Melchior, P., Rübe, C., Cooper, B.T., McAleer, M.F., Kalapurakal, J.A. & Paulino, A.C. 2021. Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer* 68(S2): 28257.
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., Kinch, L., Hambuch, T., Jain, S., Lotan, Y., Margulis, V., Sagalowsky, A.I., Summerour, P.B.,

- Kabbani, W., Wong, S.W.W., Grishin, N., Laurent, M., Xie, X.-J., Haudenschild, C.D., Ross, M.T., Bentley, D.R., Kapur, P. & Brugarolas, J. 2012. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature Genetics* 44(7): 751–759.
- Plank, J.L. & Dean, A. 2014. Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together. *Molecular Cell* 55(1): 5–14.
- Pullen, N. & Thomas, G. 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS letters* 410(1): 78–82.
- Qian, H., Zhu, M., Tan, X., Zhang, Y., Liu, X. & Yang, L. 2023. Super-enhancers and the super-enhancer reader BRD4: tumorigenic factors and therapeutic targets. *Cell Death Discovery* 9(1): 1–11.
- Racca, A.C., Camolotto, S.A., Ridano, M.E., Bocco, J.L., Genti-Raimondi, S. & Panzetta-Dutari, G.M. 2011. Krüppel-like factor 6 expression changes during trophoblast syncytialization and transactivates β hCG and PSG placental genes. *PloS one* 6(7).
- Raisner, R., Kharbanda, S., Jin, L., Jeng, E., Chan, E., Merchant, M., Haverty, P.M., Bainer, R., Cheung, T., Arnott, D., Flynn, E.M., Romero, F.A., Magnuson, S. & Gascoigne, K.E. 2018. Enhancer Activity Requires CBP/P300 Bromodomain-Dependent Histone H3K27 Acetylation. *Cell Reports* 24(7): 1722–1729.
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S. & Aiden, E.L. 2014. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159(7): 1665–1680.
- Ratzliff, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S. & Friedman, S.L. 1998. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(16): 9500–9505.
- Rebel, V.I., Kung, A.L., Tanner, E.A., Yang, H., Bronson, R.T. & Livingston, D.M. 2002. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(23): 14789–14794.
- Robb, V.A., Karbowiczek, M., Klein-Szanto, A.J. & Henske, E.P. 2007. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma. *The Journal of Urology* 177(1): 346–352.
- Rodrigues, P., Patel, S.A., Harewood, L., Olan, I. & Vojtasova, E. 2018. NF-kappaB-dependent lymphoid enhancer co-option promotes renal carcinoma metastasis. *Cancer discovery* 8(7): 850–865.
- Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., Li, C.H., Guo, Y.E., Day, D.S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T.I., Cisse,

- I.I., Roeder, R.G., Sharp, P.A., Chakraborty, A.K. & Young, R.A. 2018. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361(6400): 3958.
- Sahay, M., Kalra, S. & Bandgar, T. 2012. Renal endocrinology: The new frontier. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 16(2): 154–155.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. 2010. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews. Immunology* 10(7): 490–500.
- Salma, J. & McDermott, J.C. 2012. Suppression of a MEF2-KLF6 Survival Pathway by PKA Signaling Promotes Apoptosis in Embryonic Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 32(8): 2790–2803.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadou, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafeinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M.H., Liang, W.-W., Foltz, S.M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Ochoa, A., Gross, B., Gao, J., Zhang, H., Kundra, R., Kandoth, C., Bahceci, I., Dervishi, L., Dogrusoz, U., Zhou, W., Shen, H., Laird, P.W., Way, G.P., Greene, C.S., Liang, H., Xiao, Y., Wang, C., Iavarone, A., Berger, A.H., Bivona, T.G., Lazar, A.J., Hammer, G.D., Giordano, T., Kwong, L.N., McArthur, G., Huang, C., Tward, A.D., Frederick, M.J., McCormick, F., Meyerson, M., Cancer Genome Atlas Research Network, Van Allen, E.M., Cherniack, A.D., Ciriello, G., Sander, C. & Schultz, N. 2018. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173(2): 321–337.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology* 14(14): 1296–1302.
- Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., Nagata, Y., Yoshida, K., Kon, A., Suzuki, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Niida, A., Fujimoto, A., Tsunoda, T., Morikawa, T., Maeda, D., Kume, H., Sugano, S., Fukayama, M., Aburatani, H., Sanada, M., Miyano, S., Homma, Y. & Ogawa, S. 2013. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature genetics* 45(8): 860–867.
- Saxton, R.A. & Sabatini, D.M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168(6): 960–976.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3(6): 1101–1108.
- Schoenfeld, A.R., Davidowitz, E.J. & Burk, R.D. 2000. Elongin BC complex prevents degradation of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(15): 8507–8512.

- Sebti, S., Prébois, C., Pérez-Gracia, E., Bauvy, C., Desmots, F., Pirot, N., Gongora, C., Bach, A.-S., Hubberstey, A.V., Palissot, V., Berchem, G., Codogno, P., Linares, L.K., Liaudet-Coopman, E. & Pattingre, S. 2014. BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(11): 4115–4120.
- Sekiyama, Y., Suzuki, H. & Tsukahara, T. 2012. Functional gene expression analysis of tissue-specific isoforms of Mef2c. *Cellular and Molecular Neurobiology* 32(1): 129–139.
- Sembulingam, K. & Sembulingam, P. 2012. Renal Physiology and Skin. *Essentials of Medical Physiology*, hlm. 303–369.
- Semenza, G.L. 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences* 33(4): 207–214.
- Sengupta, S. & George, R.E. 2017. Super-enhancer-driven Transcriptional Dependencies in Cancer. *Trends Cancer* 176(3): 139–148.
- Sethi, G., Shanmugam, M.K. & Kumar, A.P. 2017. SREBP-1c as a molecular bridge between lipogenesis and cell cycle progression of clear cell renal carcinoma. *Bioscience Reports* 37(6).
- Shen, C., Beroukhim, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S. & Kaelin, W.G.J. 2011. Genetic and functional studies implicate HIF1 α as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer discovery* 1(3): 222–235.
- Shendy, N.A.M., Bikowitz, M., Sigua, L.H., Zhang, Y., Mercier, A., Khashana, Y., Nance, S., Liu, Q., Delahunty, I.M., Robinson, S., Goel, V., Rees, M.G., Ronan, M.A., Wang, T., Kocak, M., Roth, J.A., Wang, Y., Freeman, B.B., Orr, B.A., Abraham, B.J., Roussel, M.F., Schonbrunn, E., Qi, J. & Durbin, A.D. 2024. Group 3 medulloblastoma transcriptional networks collapse under domain specific EP300/CBP inhibition. *Nature Communications* 15(1): 3483.
- Shorstova, T., Foulkes, W.D. & Witcher, M. 2021. Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer* 124(9): 1478–1490.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69(1): 7–34.
- Simicevic, J. & Deplancke, B. 2017. Transcription factor proteomics—Tools, applications, and challenges. *proteomics* 17(3–4).
- Slavin, D., Sapin, V., López-Díaz, F., Jacquemin, P., Koritschoner, N., Dastugue, B., Davidson, I., Chatton, B. & Bocco, J.L. 1999. The Krüppel-like core promoter binding protein gene is primarily expressed in placenta during mouse development. *Biology of reproduction* 61(6): 1586–1591.

- Slavin, D.A., Koritschoner, N.P., Prieto, C.C., López-Díaz, F.J., Chatton, B. & Bocco, J.L. 2004. A new role for the Krüppel-like transcription factor KLF6 as an inhibitor of c-Jun proto-oncoprotein function. *Oncogene* 23(50): 8196–8205.
- Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M. & Shendure, J. 2016. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 164(0): 57–68.
- Son, S.M., Park, S.J., Lee, H., Siddiqi, F., Lee, J.E., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C. 2019. Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metabolism* 29(1): 192–201.
- Song, C.-Z., Keller, K., Chen, Y. & Stamatoyannopoulos, G. 2003. Functional interplay between CBP and PCAF in acetylation and regulation of transcription factor KLF13 activity. *Journal of molecular biology* 329(2): 207–215.
- Soshnev, A.A., Josefowicz, S.Z. & Allis, C.D. 2018. Greater Than the Sum of Parts: Complexity of the Dynamic Epigenome. *Molecular Cell* 69(3): 533.
- Speicher, M.R., Schoell, B., du Manoir, S., Schröck, E., Ried, T., Cremer, T., Störkel, S., Kovacs, A. & Kovacs, G. 1994. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *The American Journal of Pathology* 145(2): 356–364.
- Spitz, F. & Furlong, E.E.M. 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics* 13(9): 613–626.
- Srivastava, R.K., Guroji, P., Jin, L., Mukhtar, M.S. & Athar, M. 2022. Combined Inhibition of BET Bromodomain and mTORC1/2 Provides Therapeutic Advantage for Rhabdomyosarcoma by Switching Cell Death Mechanism. *Molecular carcinogenesis* 61(8): 737–751.
- Srivastava, R.K., Kaylani, S.Z., Edrees, N., Li, C., Talwelkar, S.S., Xu, J., Palle, K., Pressey, J.G. & Athar, M. 2014. GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis. *Oncotarget* 5(23): 12151–12165.
- Srivastava, R.K., Li, C., Khan, J., Banerjee, N.S., Chow, L.T. & Athar, M. 2019. Combined mTORC1/mTORC2 inhibition blocks growth and induces catastrophic macropinocytosis in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(49): 24583–24592.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G.J. & Pavletich, N.P. 1999. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284(5413): 455–461.
- Stein, R.A. & Riber, L. 2023. Epigenetic effects of short-chain fatty acids from the large intestine on host cells. *microLife* 4.
- Stratton, M.S., Lin, C.Y., Anand, P., Tatman, P.D., Ferguson, B.S., Wickers, S.T., Ambardekar, A.V., Sucharov, C.C., Bradner, J.E., Halder, S.M. & McKinsey, J.

- T.A. 2016. Signal-Dependent Recruitment of BRD4 to Cardiomyocyte Super-Enhancers Is Suppressed by a MicroRNA. *Cell Reports* 16(5): 1366–1378.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–249.
- Syafruddin, S.E. 2019. A KLF6-driven transcriptional network links lipid homeostasis and tumour growth in clear cell renal cell carcinoma. University of Cambridge, St Edmund's College.
- Syafruddin, S.E., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Patel, S.A., Zaini, M.N., Burge, J., Warren, A.Y., Stewart, G.D., Eisen, T., Bihary, D., Samarajiwa, S.A. & Vanharanta, S. 2019. A KLF6-driven transcriptional network links lipid homeostasis and tumour growth in renal carcinoma. *Nature Communications* 10(1): 1–13.
- Sydor, S., Manka, P., Best, J., Jafoui, S., Sowa, J.-P., Zoubek, M.E., Hernandez-Gea, V., Cubero, F.J., Kälsch, J., Vetter, D., Fiel, M.I., Hoshida, Y., Bian, C.B., Nelson, L.J., Moshage, H., Faber, K.N., Paul, A., Baba, H.A., Gerken, G., Friedman, S.L., Canbay, A. & Bechmann, L.P. 2017. Krüppel-like factor 6 is a transcriptional activator of autophagy in acute liver injury. *Scientific Reports* 7(1): 8119–8119.
- Tang, F. 2020. Super-enhancer function and its application in cancer targeted therapy. *NPJ Precision Oncology* 4: 2–2.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. Comprehensive Molecular Characterization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Nature* 499(7456): 43–49.
- Theis, R.P., Dolwick Grieb, S.M., Burr, D., Siddiqui, T. & Asal, N.R. 2008. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC cancer* 8: 387–387.
- Thurnher, M., Putz, T., Rahm, A., Gander, H., Ramoner, R., Bartsch, G., Hörtl, L. & Falkensammer, C. 2017. Renal Cell Carcinoma. *Handbook of Dendritic Cells* 3: 1117–1127.
- Tsang, F.H.-C., Law, C.-T., Tang, T.-C.C., Cheng, C.L.-H., Chin, D.W.-C., Tam, W.-S.V., Wei, L., Wong, C.C.-L., Ng, I.O.-L. & Wong, C.-M. 2019. Aberrant Super-Enhancer Landscape in Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 69(6): 2502–2517.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J.I., Nicol, D., O'Brien, T., Larkin, J., Horswell, S., Stares, M., Au, L., Jamal-Hanjani, M., Challacombe, B., Chandra, A., Hazell, S., Eichler-Jonsson, C., Soultati, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Lynch, J., Fernando, A., Stamp, G., Nye, E., Jabbar, F., Spain, L., Lall, S., Guarch, R., Falzon, M., Proctor, I., Pickering, L., Gore, M., Watkins, T.B.K., Ward, S., Stewart, A., DiNatale, R., Becerra, M.F., Reznik, E., Hsieh, J.J., Richmond, T.A., Mayhew, G.F., Hill, S.M., McNally,

- C.D., Jones, C., Rosenbaum, H., Stanislaw, S., Burgess, D.L., Alexander, N.R., Swanton, C., PEACE, & TRACERx Renal Consortium. 2018a. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* 173(3): 581–594.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Horswell, S., Chambers, T., O'Brien, T., Lopez, J.I., Watkins, T.B.K., Nicol, D., Stares, M., Challacombe, B., Hazell, S., Chandra, A., Mitchell, T.J., Au, L., Eichler-Jonsson, C., Jabbar, F., Soultati, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Lynch, J., Fernando, A., Stamp, G., Nye, E., Stewart, A., Xing, W., Smith, J.C., Escudero, M., Huffman, A., Matthews, N., Elgar, G., Phillimore, B., Costa, M., Begum, S., Ward, S., Salm, M., Boeing, S., Fisher, R., Spain, L., Navas, C., Grönroos, E., Hobor, S., Sharma, S., Aurangzeb, I., Lall, S., Polson, A., Varia, M., Horsfield, C., Fotiadis, N., Pickering, L., Schwarz, R.F., Silva, B., Herrero, J., Luscombe, N.M., Jamal-Hanjani, M., Rosenthal, R., Birkbak, N.J., Wilson, G.A., Pipek, O., Ribli, D., Krzystanek, M., Csabai, I., Szallasi, Z., Gore, M., McGranahan, N., Van Loo, P., Campbell, P., Larkin, J., Swanton, C., & TRACERx Renal Consortium. 2018b. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* 173(3): 595–610.
- Vaddavalli, P.L. & Schumacher, B. 2022. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in genetics* 38(6): 598–612.
- Vanharanta, S., Shu, W., Brenet, F., Hakimi, A.A., Heguy, A., Viale, A., Reuter, V.E., Hsieh, J.J.-D., Scandura, J.M. & Massagué, J. 2013. Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. *Nature Medicine* 19(1): 50–56.
- Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.-L., Teague, J., Bignell, G., Butler, A., Cho, J., Dalgliesh, G.L., Galappaththige, D., Greenman, C., Hardy, C., Jia, M., Latimer, C., Lau, K.W., Marshall, J., McLaren, S., Menzies, A., Mudie, L., Stebbings, L., Largaespada, D.A., Wessels, L.F.A., Richard, S., Kahnoski, R.J., Anema, J., Tuveson, D.A., Perez-Mancera, P.A., Mustonen, V., Fischer, A., Adams, D.J., Rust, A., Chanon, W., Subimerb, C., Dykema, K., Furge, K., Campbell, P.J., Teh, B.T., Stratton, M.R. & Futreal, P.A. 2011. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 469(7331): 539–542.
- Vaupel, P., Schmidberger, H. & Mayer, A. 2019. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology* 95(7): 912–919.
- Vézina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S.N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28(10): 721–726.
- Vrečar, I., Innes, J., Jones, E.A., Kingston, H., Reardon, W., Kerr, B., Clayton-Smith, J. & Douzgou, S. 2017. Further Clinical Delineation of the MEF2C Haploinsufficiency Syndrome: Report on New Cases and Literature Review of

- Severe Neurodevelopmental Disorders Presenting with Seizures, Absent Speech, and Involuntary Movements. *Journal of Pediatric Genetics* 6(3): 129–141.
- Wagner, E.J. & Carpenter, P.B. 2012. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(2): 115–126.
- Wallace, M.A. 1998. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal* 68(5): 803–819.
- Wan, W., You, Z., Xu, Y., Zhou, L., Guan, Z., Peng, C., Wong, C.C.L., Su, H., Zhou, T., Xia, H. & Liu, W. 2017. mTORC1 Phosphorylates Acetyltransferase p300 to Regulate Autophagy and Lipogenesis. *Molecular Cell* 68(2): 323-335.e6.
- Wang, D., Zhu, Z., Fu, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, T., Weng, Y., Wen, Y., Cao, W., Tao, G. & Wang, Y. 2023. Bromodomain-containing protein 4 activates androgen receptor transcription and promotes ovarian fibrosis in PCOS. *Cell Reports* 42(9): 113090.
- Wang, L., Wang, E., Prado Balcazar, J., Wu, Z., Xiang, K., Wang, Y., Huang, Q., Negrete, M., Chen, K.-Y., Li, W., Fu, Y., Dohlman, A., Mines, R., Zhang, L., Kobayashi, Y., Chen, T., Shi, G., Shen, J.P., Kopetz, S., Tata, P.R., Moreno, V., Gersbach, C., Crawford, G., Hsu, D., Huang, E., Bu, P. & Shen, X. 2021. Chromatin Remodeling of Colorectal Cancer Liver Metastasis is Mediated by an HGF-PU.1-DPP4 Axis. *Advanced Science* 8(19).
- Wang, L., Xu, M., Kao, C.-Y., Tsai, S.Y. & Tsai, M.-J. 2020. Small molecule JQ1 promotes prostate cancer invasion via BET-independent inactivation of FOXA1. *The Journal of Clinical Investigation* 130(4): 1782–1792.
- Wang, Y.-C., Wu, Y.-S., Hung, C.-Y., Wang, S.-A., Young, M.-J., Hsu, T.-I. & Hung, J.-J. 2018. USP24 induces IL-6 in tumor-associated microenvironment by stabilizing p300 and β -TrCP and promotes cancer malignancy. *Nature Communications* 9(1): 3996.
- Wang, Z., Strasser, A. & Kelly, G.L. 2022. Should mutant TP53 be targeted for cancer therapy? *Cell Death and Differentiation* 29(5): 911–920.
- Waryah, C., Cursons, J., Foroutan, M., Pflueger, C., Wang, E., Molania, R., Woodward, E., Sorolla, A., Wallis, C., Moses, C., Glas, I., Magalhães, L., Thompson, E.W., Fearnley, L.G., Chaffer, C.L., Davis, M., Papenfuss, A.T., Redfern, A., Lister, R., Esteller, M. & Blancafort, P. 2023. Synthetic Epigenetic Reprogramming of Mesenchymal to Epithelial States Using the CRISPR/dCas9 Platform in Triple Negative Breast Cancer. *Advanced Science* 10(22).
- Weinert, B.T., Narita, T., Satpathy, S., Srinivasan, B., Hansen, B.K., Schölz, C., Hamilton, W.B., Zucconi, B.E., Wang, W.W., Liu, W.R., Brickman, J.M., Kesicki, E.A., Lai, A., Bromberg, K.D., Cole, P.A. & Choudhary, C. 2018. Time-Resolved Analysis Reveals Rapid Dynamics and Broad Scope of the CBP/p300 Acetylome. *Cell* 174(1): 231–244.

- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I. & Young, R.A. 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153(2): 307–319.
- Wilson, B.G. & Roberts, C.W.M. 2011. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nature Reviews Cancer* 11(7): 481–492.
- Wu, T., Kamikawa, Y.F. & Donohoe, M.E. 2018. Brd4's Bromodomains Mediate Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Pluripotent Cells through P300 and Brg1. *Cell Reports* 25(7): 1756–1771.
- Wu, T., Pinto, H.B., Kamikawa, Y.F. & Donohoe, M.E. 2015. The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem Cell Reports* 4(3): 390–403.
- Wu, X. & Zhang, Y. 2017. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics* 18(9): 517–534.
- Xu, J., Pham, C.G., Albanese, S.K., Dong, Y., Oyama, T., Lee, C.-H., Rodrik-Outmezguine, V., Yao, Z., Han, S., Chen, D., Parton, D.L., Chodera, J.D., Rosen, N., Cheng, E.H. & Hsieh, J.J. 2016. Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin. *The Journal of clinical investigation* 126(9): 3526–3540.
- Yan, M.S.-C., Matouk, C.C. & Marsden, P.A. 2010. Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology* 109(3): 916–926.
- Yang, M., Lu, Y., Piao, W. & Jin, H. 2022a. The Translational Regulation in mTOR Pathway. *Biomolecules* 12(6): 802.
- Yang, Y., Schubert, M.C., Kuner, T., Wick, W., Winkler, F. & Venkataramani, V. 2022b. Brain Tumor Networks in Diffuse Glioma. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 19(6): 1832–1843.
- Yang, Z., He, N. & Zhou, Q. 2008. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology* 28(3): 967–976.
- Yao, L., Shen, H., Laird, P.W., Farnham, P.J. & Berman, B.P. 2015. Inferring regulatory element landscapes and transcription factor networks from cancer methylomes. *Genome Biology* 16(1): 105.
- Yoshino, S. & Suzuki, H.I. 2022. The molecular understanding of super-enhancer dysregulation in cancer. *Nagoya Journal of Medical Science* 84(2): 216.
- Yu, J., Hu, D., Wang, L., Fan, Z., Xu, C., Lin, Y., Chen, X., Lin, J. & Peng, F. 2022. Hyperglycemia induces gastric carcinoma proliferation and migration via the Pin1/BRD4 pathway. *Cell Death Discovery* 8(1): 224.

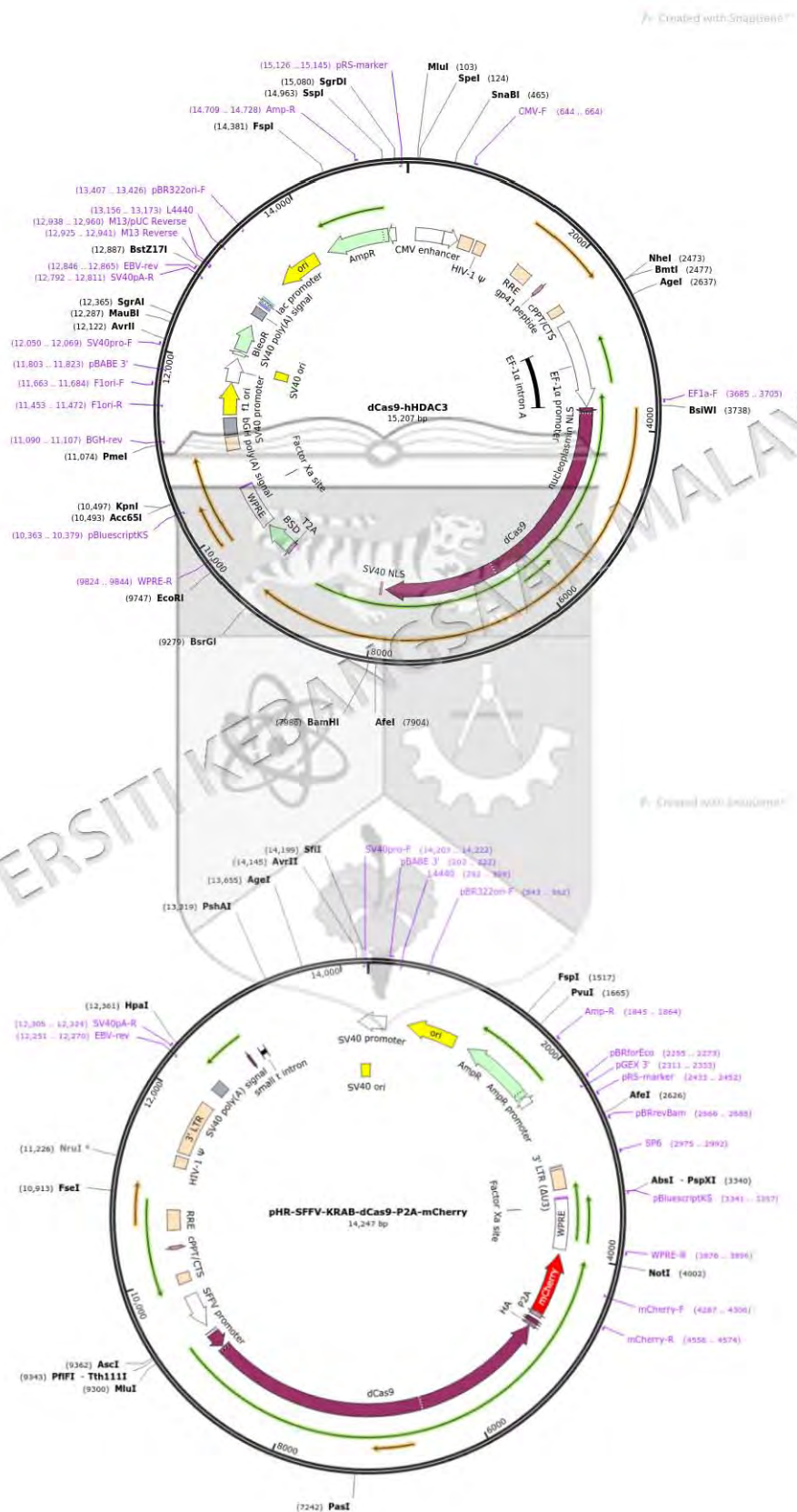
- Zhang, B., Chen, D., Liu, B., Dekker, F.J. & Quax, W.J. 2020a. A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL. *Biochemical Pharmacology* 175: 113914.
- Zhang, H., Cheng, J., Li, Z. & Xi, Y. 2019. Identification of hub genes and molecular mechanisms in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *PeerJ* 7: 7628.
- Zhang, J., Yue, W., Zhou, Y., Liao, M., Chen, X. & Hua, J. 2020b. Super enhancers: Functional cores under the 3D genome. *Cell Proliferation* 54(2): 12970.
- Zhang, J. & Zhang, Q. 2018. VHL and hypoxia signaling: Beyond HIF in cancer. *Biomedicines* 6(1): 1–13.
- Zhang, S., Fang, T., He, Y., Feng, W., Yu, Z., Zheng, Y., Zhang, C., Hu, S., Liu, Z., Liu, J., Yu, J., Zhang, H., He, A., Gong, Y., He, Z., Yang, K., Xi, Z., Yu, W., Zhou, L., Yao, L. & Yue, S. 2024. VHL mutation drives human clear cell renal cell carcinoma progression through PI3K/AKT-dependent cholesteryl ester accumulation. *eBioMedicine* 103: 105070.
- Zhang, W., Cao, H., Yang, J., Zhao, J., Liang, Z., Kang, X. & Wang, R. 2022. The identification and validation of EphA7 hypermethylation, a novel biomarker, in cervical cancer. *BMC cancer* 22(1): 636.
- Zhang, Z., Zhang, X., Ren, Z., Wu, X., Qiao, H., Huang, X., Zhao, W., Zhang, Y. & Lou, K. 2023. Biomimetic black phosphorus nanosheets codeliver CDK9 and BRD4 inhibitors for gastric cancer targeted therapy. *Journal of Materials Chemistry* 11(26): 6131–6140.
- Zhao, X., Di, Q., Liu, H., Quan, J., Ling, J., Zhao, Z., Xiao, Y., Wu, H., Wu, Z., Song, W., An, H. & Chen, W. 2022. MEF2C promotes M1 macrophage polarization and Th1 responses. *Cellular and Molecular Immunology* 19(4): 540–553.
- Zheng, J., Huang, B., Xiao, L. & Wu, M. 2024. Effects of BRD4 inhibitor JQ1 on the expression profile of super-enhancer related lncRNAs and mRNAs in cervical cancer HeLa cells. *PeerJ* 12: 17035.
- Zhou, R.W. & Parsons, R.E. 2023. Etiology of super-enhancer reprogramming and activation in cancer. *Epigenetics & Chromatin* 16(1): 29.
- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A. & Bray, F. 2015. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European urology* 67(3): 519–530.
- Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(1): 21–35.
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., Taylor, M.J., Johns, C., Chicas, A., Mulloy, J.C., Kogan, S.C., Brown, P., Valent, P., Bradner, J.E., Lowe, S.W. & Vakoc,

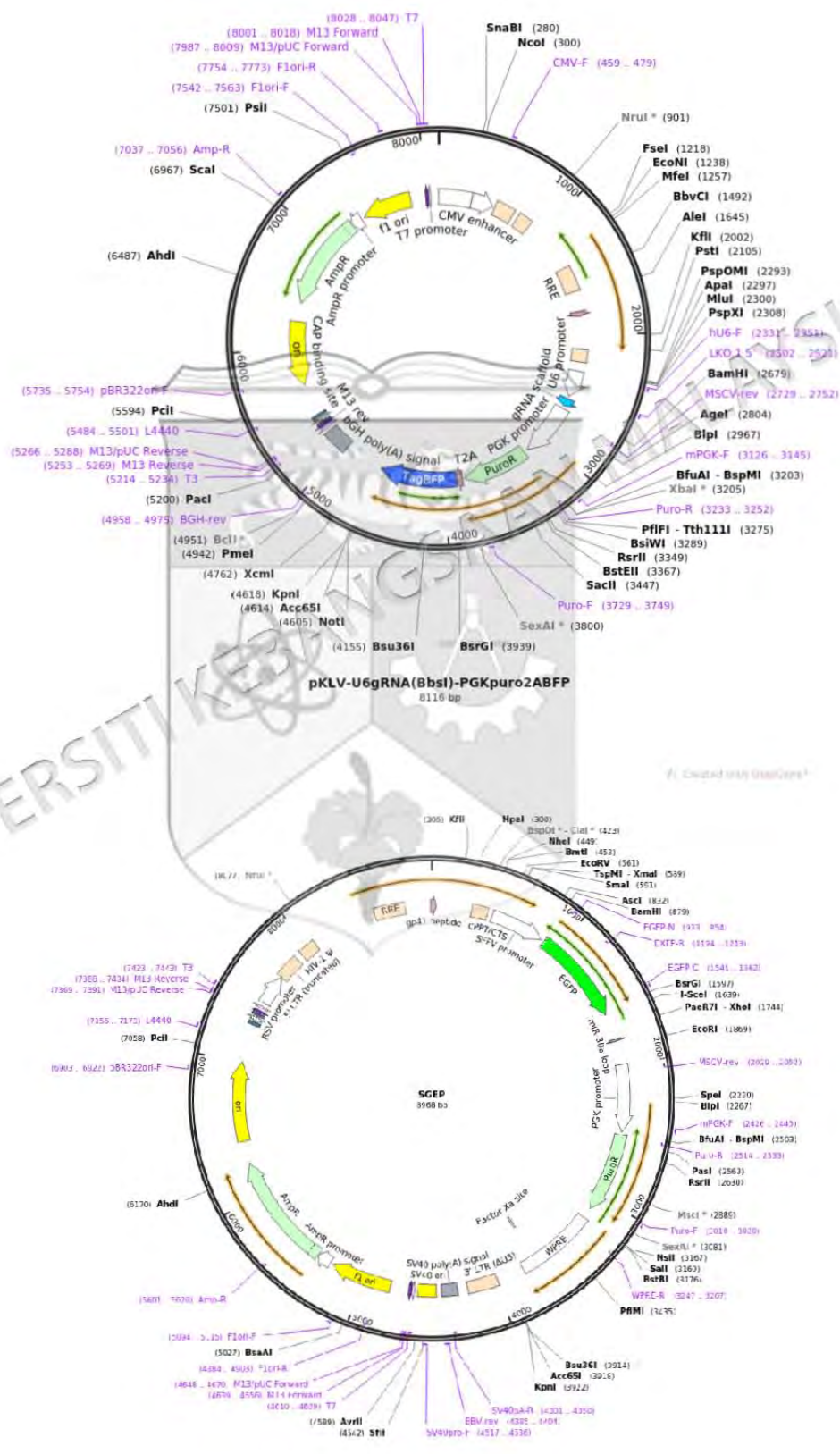
C.R. 2011. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478(7370): 524–528.

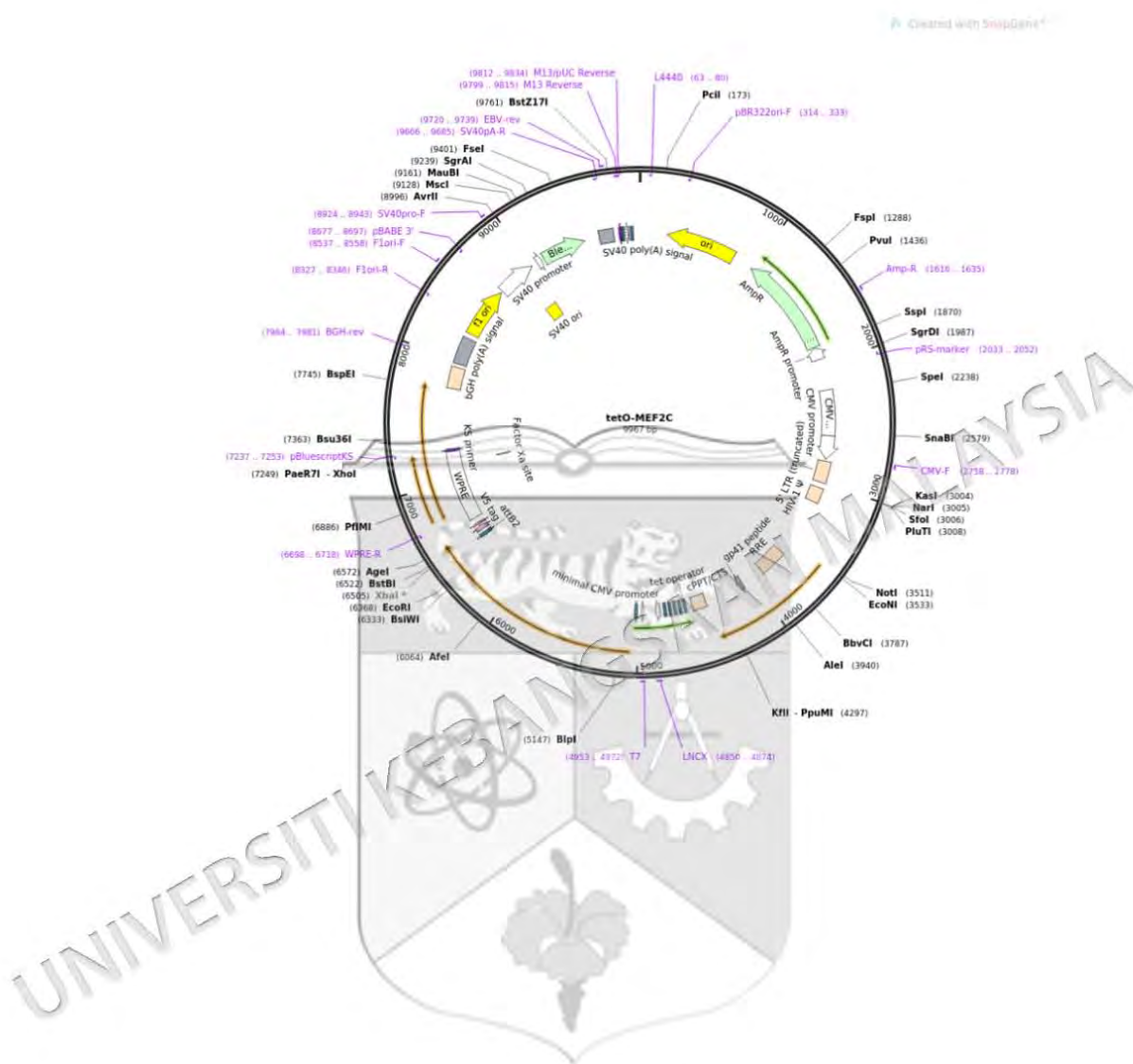
Zweier, M. & Rauch, A. 2012. The MEF2C-Related and 5q14.3q15 Microdeletion Syndrome. *Molecular Syndromology* 2(3–5): 164–170.



GAMBARAJAH PETA PLASMID







LAMPIRAN B

MAKLUMAT SEL YANG DIGUNAKAN DALAM KAJIAN

Syarikat	Tiada maklumat
Designasi	786-M1A
No. Katalog	CVCL_VR30
Sifat pertumbuhan	Melekat (<i>adherent</i>)
Organisma	<i>Homo sapiens</i> (manusia)
Morfologi	Epitelium
Sumber	Organ: Buah pinggang Penyakit: RCC
Tumorigenik	Ya
Umur/etnik	58 (Kaukasia)
Komen	Depositor: Sakari Vanharanta Sel hasil penjaan terbitan metastatik sel 786-O Sel selanjar ini mempunyai mutasi pada gen PTEN, TERT, TP53 dan VHL
Pembiakan	Nisbah sub-kultur: 1:3 hingga 1:8 adalah disyorkan Penukaran medium: 2 hingga 3 kali seminggu
Pengkulturan	Media asas bagi sel selanjar ini adalah Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Untuk membuat media pertumbuhan yang lengkap, komponen berikut ditambah kepada media asas: serum lembu janin kepada kepekatan akhir sebanyak 10% dan antibiotik PenStrep sebanyak 1%. Suhu: 37°C
Penyimpanan	Media pembekuan: 90% serum janin lembu dan 10% DMSO Suhu penyimpanan: fasa wap cecair nitrogen

Syarikat	Tiada maklumat
Designasi	OS-LM1B
No. Katalog	Tiada maklumat
Sifat pertumbuhan	Melekat (<i>adherent</i>)
Organisma	<i>Homo sapiens</i> (manusia)
Morfologi	Epitelium
Sumber	Organ: Buah pinggang Penyakit: RCC
Tumorigenik	Ya
Umur/etnik	Tidak dinyatakan
Komen	Dihasilkan oleh: Sakari Vanharanta Sel hasil penjaan terbitan metastatik sel OS-RC2
Pembiakan	Nisbah sub-kultur: 1:3 hingga 1:8 adalah disyorkan Penukaran medium: 2 hingga 3 kali seminggu
Pengkulturan	Media asas bagi sel selanjut ini adalah Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Untuk membuat media pertumbuhan yang lengkap, komponen berikut ditambah kepada media asas: serum lembu janin kepada kepekatan akhir sebanyak 10% dan antibiotik PenStrep sebanyak 1%. Suhu: 37°C
Penyimpanan	Media pembekuan: 90% serum janin lembu dan 10% DMSO Suhu penyimpanan: fasa wap cecair nitrogen

Syarikat	Tiada maklumat
Designasi	UOK101
No. Katalog	CVCL_B076
Sifat pertumbuhan	Melekat (<i>adherent</i>)
Organisma	<i>Homo sapiens</i> (manusia)
Morfologi	Epitelium
Sumber	Organ: Buah pinggang Penyakit: ccRCC
Tumorigenik	Ya
Umur/etnik	Umur tidak dinyatakan Etnik: Afrika, Asia timur, Asia selatan, Eropah
Komen	Depositor: Sakari Vanharanta Sel selanjut ini mempunyai mutasi pada gen VHL
Pembiakan	Nisbah sub-kultur: 1:3 hingga 1:8 adalah disyorkan Penukaran medium: 2 hingga 3 kali seminggu
Pengkulturan	Media asas bagi sel selanjut ini adalah Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Untuk membuat media pertumbuhan yang lengkap, komponen berikut ditambah kepada media asas: serum lembu janin kepada kepekatan akhir sebanyak 10% dan antibiotik PenStrep sebanyak 1%. Suhu: 37°C
Penyimpanan	Media pembekuan: 90% serum janin lembu dan 10% DMSO Suhu penyimpanan: fasa wap cecair nitrogen

LAMPIRAN C
PERSEDIAAN PENIMBAL CHIP

Jenis penimbal	Komponen
Penimbal lisis	20 mM Tris-HCl pH8.0 150 mM NaCl 2mM EDTA pH 8.0 0.1% SDS 1% Triton X-100
Penimbal kurang garam	50 mM HEPES pH 7.5 140 mM NaCl 1% Triton
Penimbal tinggi garam	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 1% Triton
Penimbal elusi	50 mM NaHCO 1% SDS

LAMPIRAN D

PERSEDIAAN PEMBLOTAN WESTERN

Penimbal berikut disediakan dalam larutan 10x dan dicairkan dengan air bebas RNase kepada larutan kerja 1x sebelum kerja pemblotan Western dilakukan. Untuk pencairan penimbal pemindahan, metanol mutlak ditambahkan sehingga mencapai kepekatan akhir 20%, iaitu 100 mL penimbal pemindahan 10x dan 200 mL metanol ditambahkan ke 700 mL air bebas RNase untuk menghasilkan 1 L penimbal pemindahan 1x. Untuk menyediakan 1x TBS-T, 100 mL TBS 10x dan 1 mL Tween 20 ditambahkan ke dalam 900 mL air bebas RNase.

Resepi penimbal pemblotan Western

No	Komponen	Jumlah isipadu
1	Salin Tris Bertimbal (TBS) 20 mM Tris Bes, 150 mM NaCl, pH 7.6 Resepi stok 10x Tris bes Sodium klorida Air bebas RNase	24 g 88 g Sehingga 1 L
2	Penimbal Larian SDS Tris-Glisin 25 mM Tris Bes, 192 mM glisin, 0.1% SDS, pH 8.3 Resepi stok 10x Tris bes Glisin SDS Air bebas RNase	30 g 144 g 10 g Sehingga 1 L
3	Penimbal Pemindahan Tris-Glisin 25 Mm Tris Bes, 192 mM glisin, 20% metanol Resepi stok 10x Tris bes Glisin Air bebas RNase	30.28 g 144 g Sehingga 1 L

Resepi 10% gel pemisah SDS-PAGE

Komponen	Jumlah isipadu (mL)
30% Acrylamide/Bis-acrylamide	4.0
10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	0.1
10% ammonium persulfate (APS)	0.1
1.5 M penimbal Tris HCl (pH 8.8)	2.5
TEMED	0.004
Air bebas RNase	3.3
Jumlah	10

Resepi 5% gel penyusun SDS-PAGE

Komponen	Jumlah isipadu (mL)
30% Acrylamide/Bis-acrylamide	0.33
10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	0.02
10% ammonium persulfate (APS)	0.02
1.5 M penimbal Tris HCl (pH 6.8)	0.25
TEMED	0.002
Air bebas RNase	1.4
Jumlah	2

LAMPIRAN E

SENARAI PEMBENTANGAN DALAM PERSIDANGAN

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Asmaa Y. Abuhamad, Teck Yew Low, M. Aiman Mohtar, and Saiful Effendi Syafruddin. The Epigenetic Modulators BRD4 and P300 Support KLF6 Super Enhancer Activity in Promoting Renal Tumorigenesis. Pembentangan oral di the 46th Annual Conference of the Malaysian Society for Biochemistry and Molecular Biology (MSBMB46), 24-25 Ogos 2022, Bangi Resort Hotel.

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf, M. Aiman Mohtar, dan Saiful Effendi Syafruddin. MEF2C Transactivates the Expression of Growth-Promoting KLF6 in Renal Carcinoma. Pembentangan oral di 6th International Conference on Molecular Biology & Biotechnology (ICMBB2023), 7-9 Jun 2023, Persidangan dalam talian.

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Asmaa Y. Abuhamad, Teck Yew Low, M. Aiman Mohtar, dan Saiful Effendi Syafruddin. Super Enhancer Perturbations Alter the Growth Potential and Transcriptional Landscape in Renal Carcinoma. Pembentangan poster di 19th Annual Meeting of the Korean Society of Medical Oncology 2023 (KSMO2023), 7-8 September 2023, Grand Walkerhill Seoul, Korea.

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Jie Sheng Aik, Zulkifli Bin Md. Zainuddin, M. Aiman Mohtar, dan Saiful Effendi Syafruddin. Super Enhancer Upstream Regulators Drive KLF6-PDGF β Expression and MTORC1 Pathway Activation in Renal Carcinoma. Pembentangan oral di 9th Regional Conference on Molecular Medicine (RCMM) in Conjunction with 5th National Conference for Cancer Research (NCCR), 14-15 Oktober 2023, Bangi Resort Hotel.

077-084 GES 2

THE EPIGENETIC MODULATORS BRD4 AND p300 SUPPORT KLF6 SUPER ENHANCER ACTIVITY IN PROMOTING RENAL TUMORIGENESIS

Nurul Nadia Mohamad Zamberi¹, Asmaa Y. Abuhamad², Teck Yew Low¹,
M. Aiman Mohhtar¹ and Saiful Effendi Syafruddin^{*1}

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia;

²Nanobiotechnology Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia

*Corresponding author: effendisy@ppukm.ukm.edu.my

Kruppel-like factor 6 (KLF6), a super enhancer-driven transcription factor, is at the epicentre of a cellular signalling loop that functionally links several hallmark features of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). CRISPR/Cas9-mediated KLF6 targeting impaired ccRCC cells growth *in-vitro* and *in-vivo*, which were in line with the reported cancer cells high dependency on super enhancer-driven genes. Therefore, targeting cancer-specific super enhancer has been explored as potential cancer therapeutic strategy. KLF6 expression in ccRCC cells is regulated by robust super enhancer, however, the components that establish and maintain the KLF6 super enhancer landscape remains elusive. Herein, we chemically perturbed the activity of super enhancer regulators BRD4 and p300 in ccRCC cells. This was followed by assessing the cells growth and KLF6 expression and H3K27ac signal levels via qPCR and ChIP-qPCR, respectively. Also, we deacetylated several individual KLF6 super enhancer regions using CRISPR/dCas9-HDAC3 approach and assessed the KLF6 expression and H3K27ac signal levels. We found that the chemical inhibitions of BRD4 and p300 impaired ccRCC cells growth and colony-forming ability. Importantly, KLF6 expression and H3K27ac signal levels were significantly reduced upon BRD4 and p300 inhibition in ccRCC cells. Notably, deacetylation of individual KLF6 super enhancer region also downregulated KLF6 expression and H3K27ac signal levels. Our results have thus far demonstrated KLF6 super enhancer dependency on the BRD4 and p300 activities. Lastly, this study provides additional jigsaws for the construction of complete ccRCC molecular dependencies, which this knowledge can be translated for the development of novel ccRCC treatment strategy.

Keywords: KLF6, renal cancer, epigenetic modifications, CRISPR, ChIP-qPCR



O13

MEF2C Transactivates the Expression of Growth-Promoting KLF6 in Renal Carcinoma

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf, M. Aiman Mohtar, Saiful Effendi Syafruddin*

UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia, 56000 Kuala Lumpur, Malaysia

*Corresponding author email: effendisya@ppukm.ukm.edu.my

Introduction: Kruppel-like factor 6 (KLF6), a super enhancer-driven transcription factor, is at the epicentre of a cellular signalling loop that links several hallmark features of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). CRISPR/Cas9-mediated KLF6 targeting impaired ccRCC cells growth in-vitro and in-vivo, which were in line with the reported cancer cells high dependency on super enhancer-driven genes. However, little is known about regulatory elements that establish the large super enhancer region spanning the KLF6 locus and drive high expression of this gene in ccRCC. **Methods:** Herein, we performed DNA motif analysis on ccRCC H3K27ac and p300 ChIP-Seq data and found MEF2 family binding motif at the KLF6 promoter. Subsequent analyses revealed MEF2C as the putative KLF6 transactivator and to validate this, we repressed MEF2C in ccRCC cells using CRISPRi and RNAi approaches. Then, we assessed KLF6 expression and MEF2C binding signals at the KLF6 promoter region in the MEF2C-engineered ccRCC cells via qPCR and MEF2C ChIP-qPCR, respectively. **Results:** We found that KLF6 expression level positively correlated with the expression of MEF2C. Moreover, MEF2C ChIP-qPCR confirmed the binding of MEF2C at the KLF6 promoter region. This was corroborated by the upregulation of KLF6 expression upon reintroduction of exogenous MEF2C in MEF2C-targeted ccRCC cells. **Conclusion:** Our results have thus far shown MEF2C binding at the KLF6 super enhancer region and its role as direct KLF6 upstream transcription regulator. Lastly, this study paves the way for further dissection of KLF6 super enhancer landscape establishment, which the long-term aim is to construct a complete ccRCC molecular dependencies map.

Keywords: KLF6, MEF2C, renal cancer, CRISPR/Cas9, super enhancer

SUPER ENHANCER PERTURBATIONS ALTER THE GROWTH POTENTIAL AND TRANSCRIPTIONAL LANDSCAPE IN RENAL CARCINOMA

Nurul Nadia Mohamad Zamberi¹, Asmaa Y. Abuhamad², Teck Yew Low¹, M. Aiman Mohtar¹ & Saiful Effendi Syafruddin^{*1}

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, Kuala Lumpur 56000, Malaysia; ²Nanobiotechnology Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, Serdang 43400, Selangor, Malaysia

*Corresponding author: effendisy@ppukm.ukm.edu.my

Abstract

Background: Super enhancer (SE) is a large enhancers cluster that is enriched with high H3K27ac signals, marker for open chromatin and active transcription. SE has been widely shown to drive the expression of genes that are critical in driving the cancer phenotypes. Due to cancer cells dependency on SE-driven genes, several inhibitors targeting SE have been tested as novel cancer treatments and yielded promising results. Hence, we previously performed SE profiling in renal carcinoma and identified a catalogue of TFs that are located near strong SE in this cancer type. Herein, we investigated the roles and robustness of SE that are in the vicinity of *KLF6* and *NR3C1* locus.

Methods: We perturbed these SE by either (i) targeting the epigenetic regulators BRD4 and p300 or (ii) deacetylating the constituent enhancers via CRISPR-based approach. This was followed by assessing the respective gene expression and H3K27ac signals levels via qPCR and ChIP-qPCR, respectively. Additionally, we also determined whether MEF2C, a predicted *KLF6* upstream regulator, transactivates *KLF6* expression by suppressing *MEF2C* via CRISPRi and RNAi approaches. Luciferase reporter assay was performed to confirm MEF2C binding at *KLF6* promoter region.

Results: The chemical inhibition of BRD4 and p300 impaired ccRCC cells growth and their ability to form colonies. Moreover, these also reduced the expression of *KLF6* and *NR3C1*, as well as the H3K27ac signals at the respective constituent enhancer regions. Similar observations were obtained upon deacetylating the specific constituent enhancers within the *KLF6* and *NR3C1* super enhancer locus. Moreover, we found the repression of MEF2C reduced the expression of *KLF6*, indicating that MEF2C is involved in transactivating *KLF6* expression in ccRCC. This observation was further corroborated via MEF2C ChIP-qPCR and luciferase reporter assay, which demonstrated MEF2C direct binding at the *KLF6* promoter region.

Conclusion: Our results have thus far demonstrated that perturbing the super enhancer regions reduced the expression of *KLF6* and *NR3C1*, as well as the chromatin landscape in ccRCC cells. Moreover, we found that MEF2C is involved in transactivating the expression of pro-tumorigenic *KLF6* in ccRCC cells. Overall, the findings of this study has provided better insight on the importance of super enhancers in promoting ccRCC growth and progression. Also, it adds several important jigsaws for the construction of complete ccRCC molecular dependencies map, which this knowledge could pave the way for the development of novel ccRCC clinical strategies. (2596 characters)

Keywords: KLF6, NR3C1, renal cancer, super enhancer, histone modification, CRISPR/Cas9

Abstract for 9th Regional Conference on Molecular Medicine (RCMM) in
Conjunction with 5th National Conference for Cancer Research (NCCR)
14-15th October 2023

SUPER ENHANCER UPSTREAM REGULATORS DRIVE KLF6-PDGFB EXPRESSION AND mTORC1 PATHWAY ACTIVATION IN RENAL CARCINOMA

¹Nurul Nadia Mohamad Zamberi, ²Jie Sheng Aik, ³Zulkifli Bin Md. Zainuddin, ¹M. Aiman Mohtar
& ¹Saiful Effendi Syafruddin*.

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff, Bandar
Tun Razak, Kuala Lumpur 56000, Malaysia; ²St Edmund's College, University of Cambridge, Cambridge, CB3
0BN, United Kingdom; ³Department of Surgery, Level 8, Clinical Block, Hospital Canselor Tuanku Muhriz, Jalan
Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, Kuala Lumpur 56000, Malaysia.

ABSTRACT

Kruppel-like factor 6 (KLF6), a super enhancer-driven transcription factor, supports clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) growth by controlling cellular loop that links several ccRCC hallmark features including mTORC1 pathway hyperactivation. We have previously demonstrated that KLF6 transcriptionally regulates *PDGFB* expression, which will subsequently activate mTORC1 pathway in ccRCC via autocrine and paracrine manners. Nonetheless, whether the KLF6-PDGFB axis-mediated mTORC1 activation in ccRCC is also dependent on the function of super enhancer regulators, namely BRD4 and P300, remains elusive. Hence, to address this, we chemically perturbed BRD4 and P300 activities in a panel of ccRCC in-vitro models using inhibitor JQ1 and A485, respectively. This was followed by assessing (i) H3K27ac level, marker for active enhancer, via ChIP-qPCR, (ii) *KLF6* and *PDGFB* expression level via qPCR and (iii) mTORC1 activity via Western blot. We found that BRD4 and P300 inhibitions reduced H3K27ac signals at several *KLF6* locus constituent enhancers, in line with the critical roles of these factors in maintaining the super enhancer landscape. Moreover, the inhibition of BRD4 and p300 significantly reduced the expression of *KLF6* and *PDGFB* in ccRCC cells, which consequently impaired the mTORC1 activity in the JQ1 and A485-treated cells. Our findings unravel the functional link between super enhancer upstream regulators, BRD4 and P300, and mTORC1 activation in ccRCC, which is via the transcriptional regulation of KLF6-PDGFB axis. Collectively, this study provides another important jigsaw for the construction of transcriptional dependency landscape in ccRCC, contributing to the holistic understanding on ccRCC pathogenesis for the development of novel and efficient clinical strategies.



UNIVERSITI
KEBANGSAAN
MALAYSIA
The National University
of Malaysia

KSMO 2023



UMB
UMBI
UMBI

SUPER ENHANCER PERTURBATIONS ALTER THE GROWTH POTENTIAL AND TRANSCRIPTIONAL LANDSCAPE IN RENAL CARCINOMA

Nurul Nadia Mohamad Zamberi, Asmaa Y. Abuhamad, Teck Yew Low, M. Aiman Mohtar & Saiful Effendi Syafruddin

UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Jalan Yaacob Latiff, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, MALAYSIA

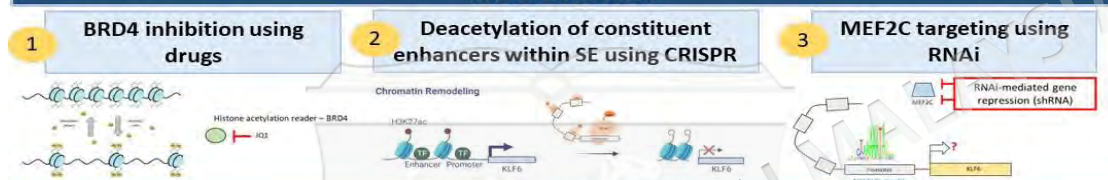
BACKGROUND

Super enhancer (SE) is a large enhancers cluster that is enriched with high H3K27ac signals, marker for open chromatin and active transcription. SE has been widely shown to drive the expression of genes that are critical in driving the cancer phenotypes. Due to cancer cells dependency on SE-driven genes, several inhibitors targeting SE have been tested as novel cancer treatments and yielded promising results. Hence, we previously performed SE profiling in renal carcinoma and identified a catalogue of TFs that are located near strong SE in this cancer type.

AIM

In this study, we investigated the robustness and transcriptional regulatory role of SE that are in the vicinity of *KLF6* and *NR3C1* locus.

METHODOLOGY



RESULTS

BRD4 inhibition reduced ccRCC cells growth, and expression of *KLF6* and *NR3C1*

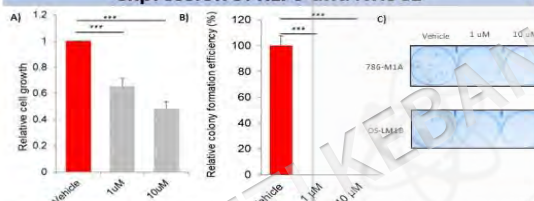


Fig 1: A, B, C) The bar graph showed reduced relative cell growth and colony formation ability upon BRD4 inhibition using JQ1 drug in a dose dependent manner in ccRCC cell line, all results were reproducible in OS-LM18 and UOK101 cell lines.

CRISPR-mediated H3K27ac deacetylation of *KLF6* SE

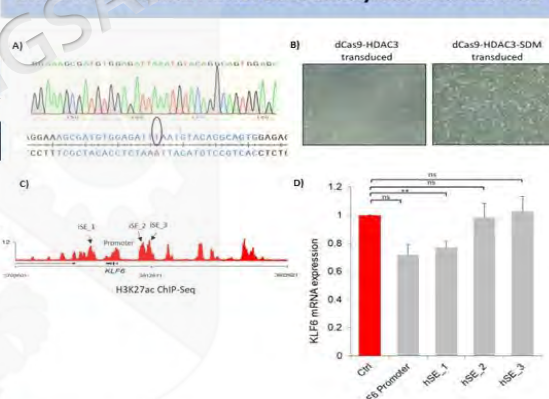
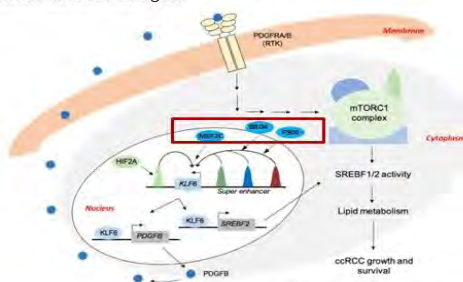


Fig 3: A) Sequencing electropherogram highlighting the dCas9-HDAC3 site-directed mutagenesis (stop codon (TAA) → Alanine (AAA)). B) Blastocidin-treated 786-M1A ccRCC cells (30 μ g/mL). C) H3K27ac ChIP-Seq data result indicating the position of different SE regions; D) The bar graph showed reduced expression of *KLF6* measured by qPCR at several different SE regions in the 786-M1A cells.

CONCLUSION

Overall, the findings of this study provided insight on the importance of SE in promoting renal cancer growth & progression. Also, it adds several important jigsaws for the construction of complete renal cancer molecular dependencies map, which this knowledge could pave the way for the development of novel renal cancer clinical strategies.



Adapted by Syafruddin et al. Nature Communications (2019)

MEF2C transactivates *KLF6* expression in ccRCC

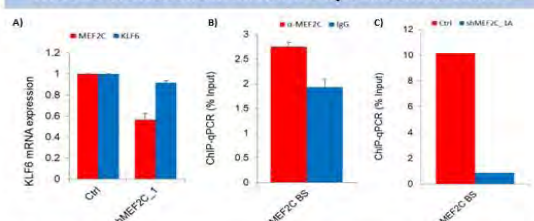


Fig 4: A) Expression of *KLF6* were downregulated upon targeting MEF2C as measured by qPCR in 786-M1A cells; B) MEF2C analysis at the *KLF6* promoter region in 786-M1A parental cells as measured by ChIP-qPCR; C) MEF2C analysis at the *KLF6* promoter region in 786-M1A MEF2C-targeted cell as measured by ChIP-qPCR.

REFERENCES

Sengupta, S. & George, R. E. 2017. Trends Cancer 17(3): 139–148.

Syafruddin, S. E. et al., 2019. Nature Communications 10(1): 1–13.

ACKNOWLEDGEMENT

This study is supported by the FRGS research grant (FRGS/1/2020/SKK0/UKM/03/3)

LAMPIRAN F**SENARAI ANUGERAH DAN PENCAPAIAN**

Tempat Pertama *Young Investigator Award* (Kategori Kanser) di 9th Regional Conference on Molecular Medicine (RCMM) in Conjunction with 5th National Conference for Cancer Research (NCCR) pada 14-15 Oktober 2023, bertempat di Bangi Resort Hotel.



LAMPIRAN G

SENARAI PENERBITAN

1. Asmaa Y Abuhamad, **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Ling Sheen, Safaa M Naes, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf, Asilah Ahmad Tajudin, M Aiman Mohtar, Amir Syahir Amir Hamzah, dan Saiful Effendi Syafruddin. Reverting TP53 mutation in breast cancer cells: prime editing workflow and technical consideration. Cells, May 2022.
2. Asmaa Y. Abuhamad, **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Sakari Vanharanta, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf, M. Aiman Mohtar dan Saiful Effendi Syafruddin. Cancer cell-derived PDGF β stimulates mTORC1 activation in renal carcinoma. International Journal of Molecular Science, March 2023.
3. Poh Kuan Wong, **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Saiful Effendi Syafruddin, Fook Choe Cheah, Norazrina Azmi, Jia Xian Law, dan Eng Wee Chua. The promises and pitfalls of crispr-mediated base editing in stem cells. The CRISPR Journal, May 2023.
4. **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Asmaa Y. Abuhamad, Teck Yew Low, M. Aiman Mohtar dan Saiful Effendi Syafruddin. Dead Cas9 tells tales: probing gene function and transcription regulation in cancer. The CRISPR Journal, April 2024.
5. **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Mohd Raziff Alias, M. Aiman Mohtar dan Saiful Effendi Syafruddin. Teknologi penyuntingan genom CRISPR/Cas9 dan prime editing. Jurnal Sains Kesihatan Malaysia, telah diterima oleh jurnal.
6. **Nurul Nadia Mohamad Zamberi**, Asmaa Y Abuhamad, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf, Nur Qurratu' Athirah A Rahman, M. Aiman Mohtar, Saiful Effendi Syafruddin. Perturbation of BRD4 and P300 activity suppresses super enhancer-driven KLF6 expression in renal carcinoma. Epigenetics & Chromatin, telah dihantar kepada jurnal.

Article

Reverting *TP53* Mutation in Breast Cancer Cells: Prime Editing Workflow and Technical Considerations

Asmaa Y. Abuhamad ¹, Nurul Nadia Mohamad Zamberi ², Ling Sheen ², Safaa M. Naes ³, Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf ², Asilah Ahmad Tajudin ^{1,4}, M. Aiman Mohtar ², Amir Syahir Amir Hamzah ^{1,5,*} and Saiful Effendi Syafruddin ^{2,*}

¹ Nanobiotechnology Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia, Serdang 43400, Selangor, Malaysia; gs56789@student.upm.edu.my (A.Y.A.); asilah_at@upm.edu.my (A.A.T.)

² UKM Medical Molecular Biology Institute, University Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, Kuala Lumpur 56000, Malaysia; sakinahjz@gmail.com (N.N.M.Z.); ling_sheen@yahoo.com (L.S.); hasanahyusuf@ukm.edu.my (S.N.H.M.Y.); m.aimanmohtar@ppukm.ukm.edu.my (M.A.M.)

³ Department of Biochemistry & Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University Teknologi MARA, Cawangan Selangor, Kampus Sungai Buloh, Sungai Buloh 47000, Selangor, Malaysia; safanaes@gmail.com

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia, Serdang 43400, Selangor, Malaysia

⁵ UPM-MAKNA Cancer Research Laboratory, Institute of Bioscience, University Putra Malaysia, Serdang 43400, Selangor, Malaysia

* Correspondence: amirsyahir@upm.edu.my (A.S.A.H.); effendisya@ppukm.ukm.edu.my (S.E.S.)



Citation: Abuhamad, A.Y.; Mohamad Zamberi, N.N.; Sheen, L.; Naes, S.M.; Mohd Yusuf, S.N.H.; Ahmad Tajudin, A.; Mohtar, M.A.; Amir Hamzah, A.S.; Syafruddin, S.E. Reverting *TP53* Mutation in Breast Cancer Cells: Prime Editing Workflow and Technical Considerations. *Cells* **2022**, *11*, 1612. <https://doi.org/10.3390/cells11101612>

Academic Editors: Baohong Zhang, Turgay Unver and Rami Aqeilan

Received: 18 September 2021

Accepted: 4 May 2022

Published: 11 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths in women. The aggressive breast cancer subtype is commonly linked to the genetic alterations in the *TP53* tumor suppressor gene, predominantly the missense mutations. Robust experimental models are needed to gain better insights into these mutations' molecular properties and implications in tumorigenesis. The generation of such models harboring the alterations is feasible with the CRISPR-based gene editing technology. Moreover, the development of new CRISPR applications, particularly DNA base and prime editing, has considerably improved the precision and versatility of gene editing. Here, we employed the prime editing tool to revert a *TP53* missense C > T mutation (L194I) in a T47D luminal A breast cancer cell line. In parallel, this prime editing tool was also utilized to introduce the L194F mutation in HEK293T cells. To assess the prime editing efficiency in both cell lines, we first performed Sanger sequencing in the prime-edited cells pool and single cell-derived clones. However, the Sanger sequencing approach did not detect any base substitution in these cell lines. Next, by employing the more sensitive amplicon target sequencing, we managed to identify the expected substitution in these T47D and HEK293T cells, albeit the editing efficiency was low. In light of these findings, we discussed the technical aspects and provided suggestions for improve the prime editing workflow and efficiency for future experiments.

Keywords: prime editing; CRISPR; *TP53*; missense mutation; tumor suppressor; breast cancer



Article

Cancer Cell-Derived PDGFB Stimulates mTORC1 Activation in Renal Carcinoma

Asmaa Y. Abuhamad ^{1,†}, Nurul Nadia Mohamad Zamberi ², Sakari Vanharanta ^{3,4},
Siti Nur Hasanah Mohd Yusuf ², M. Aiman Mohtar ² and Saiful Effendi Syafruddin ^{2,*,†}

¹ Bionanotechnology Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, Serdang 43400, Malaysia

² UKM Medical Molecular Biology Institute, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, Kuala Lumpur 56000, Malaysia

³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Helsinki, 00014 Helsinki, Finland

⁴ Translational Cancer Medicine Program, Faculty of Medicine, University of Helsinki, 00014 Helsinki, Finland

* Correspondence: effendisy@ppukm.ukm.edu.my

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is a hypervascular tumor that is characterized by bi-allelic inactivation of the *VHL* tumor suppressor gene and mTOR signalling pathway hyperactivation. The pro-angiogenic factor PDGFB, a transcriptional target of super enhancer-driven KLF6, can activate the mTORC1 signalling pathway in ccRCC. However, the detailed mechanisms of PDGFB-mediated mTORC1 activation in ccRCC have remained elusive. Here, we investigated whether ccRCC cells are able to secrete PDGFB into the extracellular milieu and stimulate mTORC1 signalling activity. We found that ccRCC cells secreted PDGFB extracellularly, and by utilizing KLF6- and PDGFB-engineered ccRCC cells, we showed that the level of PDGFB secretion was positively correlated with the expression of intracellular KLF6 and PDGFB. Moreover, the reintroduction of either KLF6 or PDGFB was able to sustain mTORC1 signalling activity in KLF6-targeted ccRCC cells. We further demonstrated that conditioned media of PDGFB-overexpressing ccRCC cells was able to re-activate mTORC1 activity in KLF6-targeted cells. In conclusion, cancer cell-derived PDGFB can mediate mTORC1 signalling pathway activation in ccRCC, further consolidating the link between the KLF6-PDGFB axis and the mTORC1 signalling pathway activity in ccRCC.

Keywords: renal cancer; mTOR signalling pathway; PDGFB; KLF6; CRISPR/Cas9



Citation: Abuhamad, A.Y.; Mohamad Zamberi, N.N.; Vanharanta, S.; Mohd Yusuf, S.N.H.; Mohtar, M.A.; Syafruddin, S.E. Cancer Cell-Derived PDGFB Stimulates mTORC1



REVIEW ARTICLE

The Promises and Pitfalls of CRISPR-Mediated Base Editing in Stem Cells

Poh Kuan Wong,¹ Nurul Nadia Mohamad Zamberi,² Saiful Effendi Syafruddin,² Fook Choe Cheah,³ Norazrina Azmi,¹ Jia Xian Law,⁴ and Eng Wee Chua^{1,*}

Stem cells such as induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, and hematopoietic stem and progenitor cells are growing in importance in disease modeling and regenerative medicine. The applications of CRISPR-based gene editing to create a mélange of disease and nondisease stem cell lines have further enhanced the utility of this innately versatile group of cells in the studies of human genetic disorders. Precise base edits can be achieved using a variety of CRISPR-centric approaches, particularly homology-directed repair and the recently developed base editors and prime editors. Despite its much-touted potential, editing single DNA bases is technically challenging. In this review, we discuss the strategies for achieving exact base edits in the creation of various stem cell-based models for use in elucidating disease mechanisms and assessing drug efficacy, and the unique characteristics of stem cells that warrant special considerations.

Introduction

Stem cells are characterized by their ample capacity for self-renewal and differentiation into a variety of cell types, such as hematopoietic stem cells, hepatocytes, and neurons.^{1–5} These characteristics make stem cells versatile tools for research into disease mechanisms and future therapeutics.⁶ Stem cells are typically grown in monolayers but can be converted into three-dimensional organoids to better mimic how cells behave within the *in vivo* environment.^{7–9} Their origin can be *embryonic* or *somatic*. Embryonic stem cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are obtained from somatic cells reprogrammed by a combination of stemness transcription factors, namely Sox2, Oct4, and Nanog. The cultivation of somatic stem cells was intended primarily to address the ethical concerns associated with embryonic stem cells.^{10–12}

Point mutations cause most of the known human pathogenic genetic variants.¹³ Of the 54 444 human disease-

that lead to diseases or alter drug responsiveness. This may in turn facilitate the development of novel therapeutics or more precise treatments.^{15,16} For example, several isogenic models of UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) myopathy were created with point mutations in the *GNE* gene for use in the preclinical testing of a drug currently being evaluated in clinical trials. The models harbored four distinct variants previously reported in patients with GNE myopathy, and aided the discovery that response to the drug was mutation specific.¹⁷

However, stem cells are resistant to genome modifications because of low transfection efficiency.^{15,18,19} This has prompted efforts to overcome the technical difficulties around gene editing of stem cells, which have growing importance in disease modeling and regenerative medicine. In this review, we discuss the strategies for achieving exact base edits in the creation of various stem cell-based models and the unique characteristics

dCas9 Tells Tales: Probing Gene Function and Transcription Regulation in Cancer

Authors: Nurul Nadia Mohamad Zamberij, Asmaa Y. Abuhamad, Teck Yew Low, M. Aiman Mohitar, and Saiful Effendi Syafruddin  [AUTHORS INFO & AFFILIATIONS](#)

Publication: The CRISPR Journal • <https://doi.org/10.1089/crispr.2023.0078>

 Permissions & Citations



 GET ACCESS

Abstract

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-based genome editing is evolving into an essential tool in the field of biological and medical research. Notably, the development of catalytically deactivated Cas9 (dCas9) enzyme has substantially broadened its traditional boundaries in gene editing or perturbation. The conjugation of dCas9 with various molecular effectors allows precise control over transcriptional processes, epigenetic modifications, visualization of chromosomal dynamics, and several other applications. This expanded repertoire of CRISPR-Cas9 applications has emerged as an invaluable molecular tool kit that empowers researchers to comprehensively interrogate and gain insights into health and diseases. This review delves into the advancements in Cas9 protein engineering, specifically on the generation of various dCas9 tools that have significantly enhanced the CRISPR-based technology capability and versatility. We subsequently discuss the multifaceted applications of dCas9, especially in interrogating the regulation and function of genes that involve in supporting cancer pathogenesis. In addition, we also delineate the designing and utilization of dCas9-based tools as well as highlighting its current constraints and transformative potentials in cancer research.