

**PENGENALPASTIAN DAN PENJELASAN GEN YANG
MENINGKATKAN KEMOSENSITIVITI
ADENOKARSINOMA PARU-PARU**

PANG JYH CHYANG

**TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
DOKTOR FALSAFAH SAINS (PERUBATAN MOLEKUL)**

**INSTITUT PERUBATAN MOLEKUL
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR**

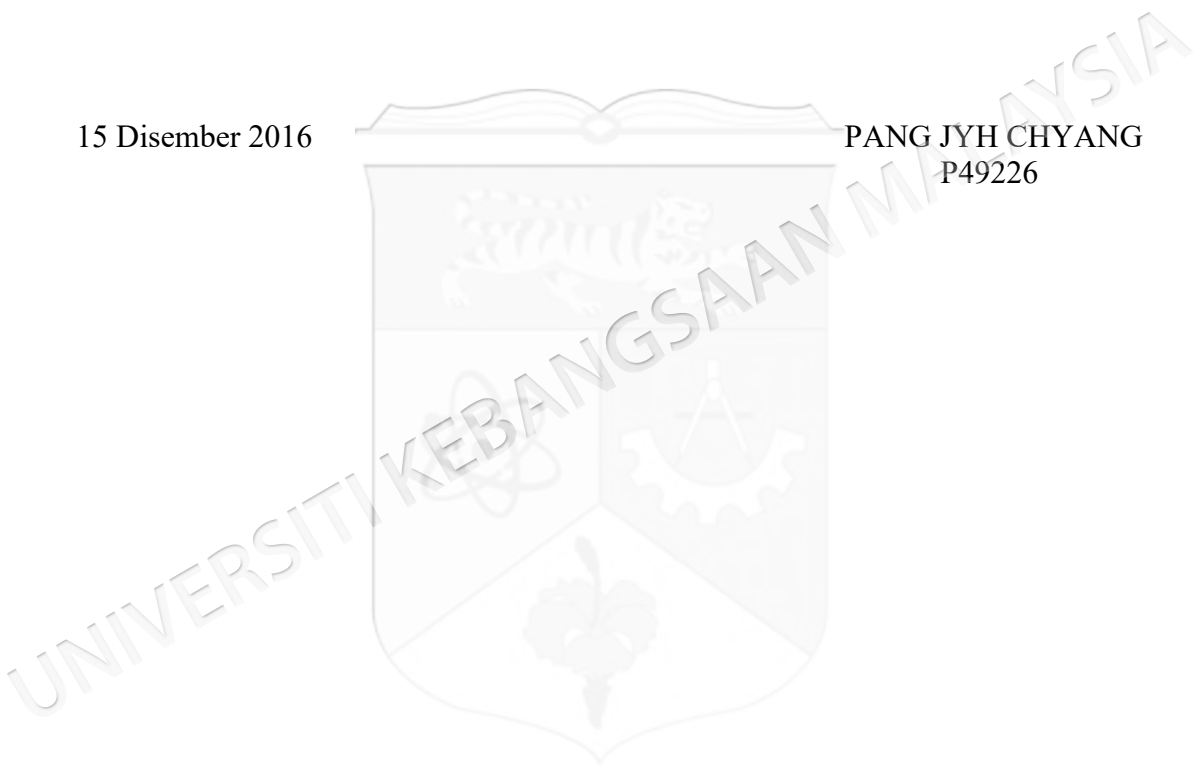
2016

PENGAKUAN

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

15 Disember 2016

PANG JYH CHYANG
P49226



PERAKUAN TESIS SARJANA /DOKTOR FALSAFAH
(CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS)

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : Pang Jyh Chyng

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P49226 Sesi Akademik
(Academic Session) : 2016/2017

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : Pengenalpastian dan pengelasan gen yang
meningkatkan kemerosotkan adeno karsinoma
paru-paru.

Merujuk kepada Klausa 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai:

(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:)

☐

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 organisation/body where the research was conducted)

☒

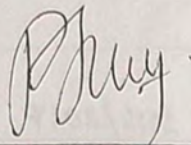
AKSES TERBUKA/TIDAK TERHAD
(OPEN ACCESS/NON-RESTRICTED)

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:

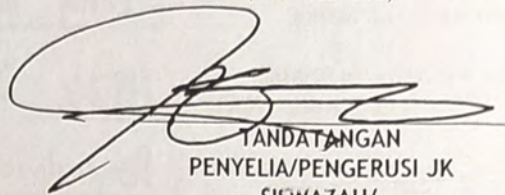
(For the Open Access/Non-Restricted category, I allow this (Master's/Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

1. 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.)
2. 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 purpose among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)



TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)



TANDATANGAN
PENYELIA/PENGERUSI JK
SISWAZAH/
(SUPERVISOR'S/ CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE
SIGNATURE)

791115-04-5027

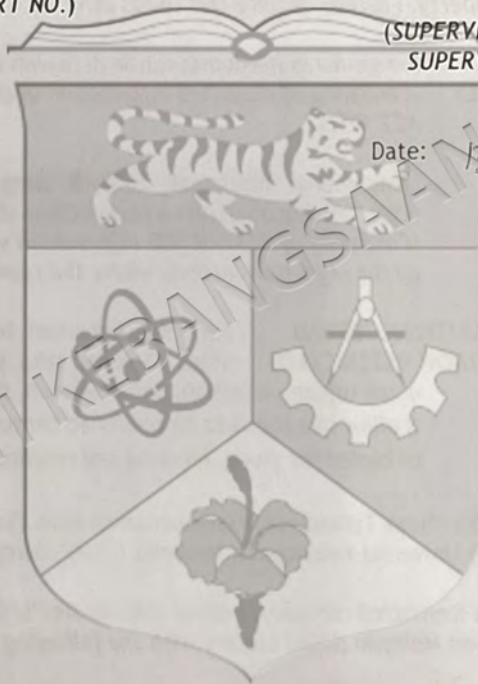
KAD PENGENALAN /NO.PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT NO.)

Date: 13/12/2016

PROFESOR DATUK DR. A RAHMAN A JAMA
Pengarah
Institut Perubatan Molekul UKM (UMBI)

NAMA PENYELIA/PENGERUSI JK
SISWAZAH
(SUPERVISOR'S /CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE
NAME)

Date: 13/12/2016



UNIVERSITI KUALA LUMPUR

PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih dirakamkan kepada Prof. Madya Dr. Roslan Harun atas segala nasihat, dorongan, bantuan, dan keprihatinan semasa menyempurnakan tesis ini. Bimbingan, pandangan dan tunjuk ajar yang dihulurkan oleh penyelia saya merupakan faktor utama kepada kejayaan tesis ini. Saya amat menghargai pimpinan dan kesabaran Prof. Madya Dr. Roslan Harun yang sedia berkongsi maklumat dan kepakaran beliau sepanjang pengajian ini.

Ribuan terima kasih diucapkan kepada Prof. Datuk Dr. A. Rahman A. Jamal, pengarah Institut Perubatan Molekul UKM (UMBI) atas usaha beliau menyediakan fasiliti, tempat dan peluang bagi saya mempelajari serta melakukan penyelidikan saya.

Saya ingin merakamkan budi kasih yang tidak terhingga kepada kedua ibu bapa saya dan keluarga saya atas segala galakkan dan sokongan yang diberikan kepada saya sepanjang tempoh pengajian ini. Mereka telah menjadi sumber dorongan dan inspirasi kepada saya ketika menyiapkan kajian ini.

Akhir sekali, ucapan terima kasih diucapkan kepada felo dan rakan-rakan di UMBI terutamanya khas kepada Dr Abu Bakar, Shukriyah, Dr Jalal, Suhada, Ziha, Husna, Firdaus, Kamariah dan Tan yang sentiasa menghulurkan bantuan, motivasi serta berjuang bersama-sama untuk mengharungi segala cabaran sepanjang pengajian ini serta ucapan terima kasih kepada geran penyelidikan yang diperolehi daripada Kementerian Pendidikan Tinggi (02-01-02-FGRS0399) yang menjayakan projek penyelidikan ini.

ABSTRAK

Kemoterapi memainkan peranan yang penting dalam kes lewat kanser paru-paru bukan sel kecil (NSCLC). Walaupun objektif dan manfaat memanjangkan jangka hayat dapat diperhatikan berikutan daripada rawatan kemoterapi, namun terdapat tumor mempamerkan kepelbagaian genetik yang tidak sensitif terhadap kemoterapi. Perubahan dalam tindak balas kemoterapi mungkin disebabkan oleh sifat-sifat biologi yang berbeza pada sel-sel kanser. Tujuan kajian ini adalah untuk mengenal pasti gen yang mensensitifkan sel-sel adenokarsinoma paru-paru terhadap rawatan kemoterapi dan menentukan tapak jalan biologi molekul yang merangsangkan sensitiviti kemoterapi sel-sel kanser. Perlombongan data dan analisis-meta telah dilakukan ke atas 56 data set pengekspresan gen mikroatur kanser paru-paru dari pangkalan data Oncomine untuk mengenal pasti gen yang meningkat pengekspresan gen pada adenokarsinoma paru-paru berbanding dengan tisu normal. Sel adenokarsinoma paru-paru yang hipotriploid, A549 (1×10^4 sel) ditransfeksi-berbalik dengan menggunakan gangguan RNA kecil (siRNA) yang mensasarkan gen khusus selama 24 jam sebelum dirawat dengan dos sublethal cisplatin selama 48 jam. Salah satu gen positif, SON, telah dipilih untuk analisis lanjut fungsinya. Sensitiviti kemoterapi sel A549 terhadap venorelbine dan etoposide juga dinilai dengan siRNA SON. Pengekspresan protein SON dalam NSCLC yang diperolehi dari 208 orang pesakit telah dinilai dengan menggunakan tisu mikroatur-Imunohistokimia (TMA-IHC). Gen-gen bawahan dan tapak jalan biologi molekul SON disiasat dengan menggunakan HumanRef-8 Illumina Expression BeadChips v3.0. Tapak jalan biologi molekul yang dikenal pasti telah disahkan menggunakan kuantitatif PCR (qPCR) dengan mensasarkan gen *MDM2*, *β -ACTIN* dan *SON*. Model xenograft kanser paru-paru manusia A549 ditubuhkan di dalam tubuh tikus untuk menentukan sama ada penindasan SON berupaya mengurangkan pertumbuhan tumor secara in vivo. Daripada 80 sasaran gen yang dipilih, penindasan lima gen (*SON*, *API5*, *FGF2*, *MCL1* dan *PSMA6*) menghalang pertumbuhan sel A549 dengan ketara dan meningkatkan kepekaan A549 terhadap dos sublethal cisplatin. Kesan sitotoksik sinergi yang paling berkesan diperhatikan apabila A549 telah dirawat dengan siRNA SON dan venorelbine, yang berjaya mengurangkan viabiliti sel kepada 26% ($p = 0.025$). Tahap pengekspresan protein SON dalam NSCLC didapati mempunyai kaitan yang ketara dengan gred tumor dan peringkat patologi NSCLC. Analisis pengekspresan gen mikroatur mendapati bahawa penindasan SON mengurangkan pengekspresan gen-gen yang terlibat dalam fasa G kitaran sel dan tapak jalan biologi Notch dan keputusannya disahkan dengan analisis qPCR gen *SON* ($2^{-\Delta\Delta C_t} = 891.4$, $p = 0.12$), *MDM2* ($2^{-\Delta\Delta C_t} = 64$, $p = 0.23$) dan *β -ACTIN* ($2^{-\Delta\Delta C_t} = 1.4$, $p = 0.43$). Rawatan xenografts adenokarsinoma paru-paru dengan siRNA SON menyebabkan pengurangan purata 48.33% pertumbuhan tumor (saiz tumor purata: 3.1 mm (rawatan) melawan 6.0 mm (kawalan), $p=0.0016$) jika dibandingkan dengan tumor kawalan. Kesimpulan, SON berkemungkinan mempunyai potensi sebagai sasaran terapi baru untuk kanser paru-paru di mana perencatan gen ini menggalakkan perencatan pertumbuhan tumor serta meningkatkan sensitiviti kemoterapi.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ELUCIDATION OF GENES THAT ENHANCE CHEMOSENSITIVITY IN LUNG ADENOCARCINOMA

ABSTRACT

Chemotherapy plays a major role in the treatment of advanced stage of non-small cell lung cancer (NSCLC). Although objective responses and survival benefits are seen following chemotherapy, the tumour exhibits considerable heterogeneity in its sensitivity to chemotherapy. The variation in chemotherapy response is likely due to the different biological properties of the cancer cells. The aims of this study were to identify the genes that sensitized the lung adenocarcinoma cells to chemotherapy and to determine the molecular pathways underlying the chemosensitivity of the cancer cells. Data mining and meta-analysis were performed on 56 microarray gene expression lung cancer datasets from Oncomine database to identify common upregulated genes in lung adenocarcinoma. The hypotriploid lung adenocarcinoma, A549 cells (1×10^4 cells) were reverse-transfected with gene-specific small interfering RNA (siRNA) for 24 hours before being treated with sublethal dose of cisplatin for 48 hours. One of the positive genes, SON, was selected for further functional analysis. The chemosensitivity of A549 cells to venorelbine and etoposide following treatment with SON siRNA was also evaluated. SON protein expressions in NSCLC obtained from 208 patients were evaluated by tissue microarray-immunohistochemistry (TMA-IHC). The downstream genes and molecular pathways of SON were interrogated using Illumina HumanRef-8 v3.0 Expression BeadChips. The identified pathways were validated using quantitative PCR (qPCR) by targeted gen *MDM2*, *β -ACTIN* and SON. A human A549 lung cancer xenograft model in nude mice was established to determine whether silencing of SON reduced tumour growth in vivo. Out of 80 selected targets, silencing of five genes (SON, API5, FGF2, MCL1 and PSMA6) significantly inhibited the growth of A549 cells and increased the sensitivity of the A549 to sublethal dose of cisplatin. The most powerful synergistic cytotoxic effect was observed when A549 was treated with SON siRNA and venorelbine, which reduced cell viability to 26% ($p=0.025$). Expression levels of SON protein in NSCLC were significantly associated with tumour grade and pathologic stage. Microarray gene expression analysis revealed that silencing of SON reduced the expression of genes in the G phase of the cell cycle and Notch pathway and verified by analyzed qPCR gen SON ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 891.4$, $p = 0.12$), *MDM2* ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 64$, $p = 0.23$) and *β -ACTIN* ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.4$, $p = 0.43$). Treatment of lung adenocarcinoma xenografts with SON siRNA resulted in 48.33% reduction in tumour growth (average tumour sizes: 3.1 mm (treated) vs 6.0 mm (control), $p=0.0016$) when compared with control injected tumour. In conclusions, SON may be a plausible potential novel therapeutic target for lung cancer where by inhibit expression of this gene inducing inhibition of tumour growth as well as enhancing chemosensitivity.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI MIKROGRAPH	xi
SENARAI ILUSTRASI	xii
SENARAI SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Penyelidikan	4
1.3 Hipotesis Penyelidikan	5
BAB II ULASAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Pengenalan	6
2.2 Kanser Paru-paru di Malaysia	8
2.3 Ciri-ciri Klinikal Kanser Paru-paru	12
2.4 Biologi Molekul Kanser Paru-paru	16
2.4.1 Epidemiologi molekul kanser paru-paru	17
2.4.2 Penanda piawaian kanser paru-paru	18
a Pembekalan isyarat pertumbuhan: proto-onkogen	19
b Ketidakpekaan terhadap isyarat anti pertumbuhan: Gen penindas tumor	21
c Kemampuan untuk menghindar apoptosis	25

	d	Potensi tak terbatas replikasi sel	26
	e	Kemampuan untuk mempertahankan angiogenesis	26
2.5		Kerintangan Platinum	27
	2.5.1	Mekanisme kerintangan Cisplatin	28
	a	Aliran darah dan pengangkutan ubat	29
	b	Persekitaran luar sel	30
	c	Pengambilan ubat	31
	d	Pengeluar ubat	32
	e	Detoksifikasi ubat	33
	f	Pengikatan ubat	33
	g	Pembaikan DNA	35
	h	Pengurangan tindak balas apoptosis	36
	i	Penghalang apoptosis	38
2.6		Interferens RNA	39
	2.6.1	Mekanisme tindak balas siRNA	39
	2.6.2	Fungsi biologi RNAi	41
	a	Imuniti	41
	b	Penurunan pengekspresan gen	42
	c	Peningkatan pengekspresan gen	43
2.7		Mikroatur DNA	43
2.8		Mikroatur Tisu	46
BAB III		KAEDAH KAJIAN	
3.1		Bahan dan Reagen	48
	3.1.1	Bahan kimia dan biokimia	48
	3.1.2	Enzim-enzim	48
	3.1.3	Kit reagen	48
	3.1.4	Media kultur sel	49
3.2		Prosedur Am	49
	3.2.1	Pensterilan	49
	3.2.2	Penentuan kepekatan asid nukleik	49
	3.2.3	Penentuan pH	49
3.3		Pencarian Pangkalan Data Oncomine	50
3.4		Pembinaan Tapak Jalan Biologi Molekul NSCLC	51
3.5		Penentuan Kuantiti Dan Kualiti RNA	51
	3.5.1	Penentuan integriti RNA 2100 Bioanalyzer	51
	a	Penyedialan cip mikrofluidik	51

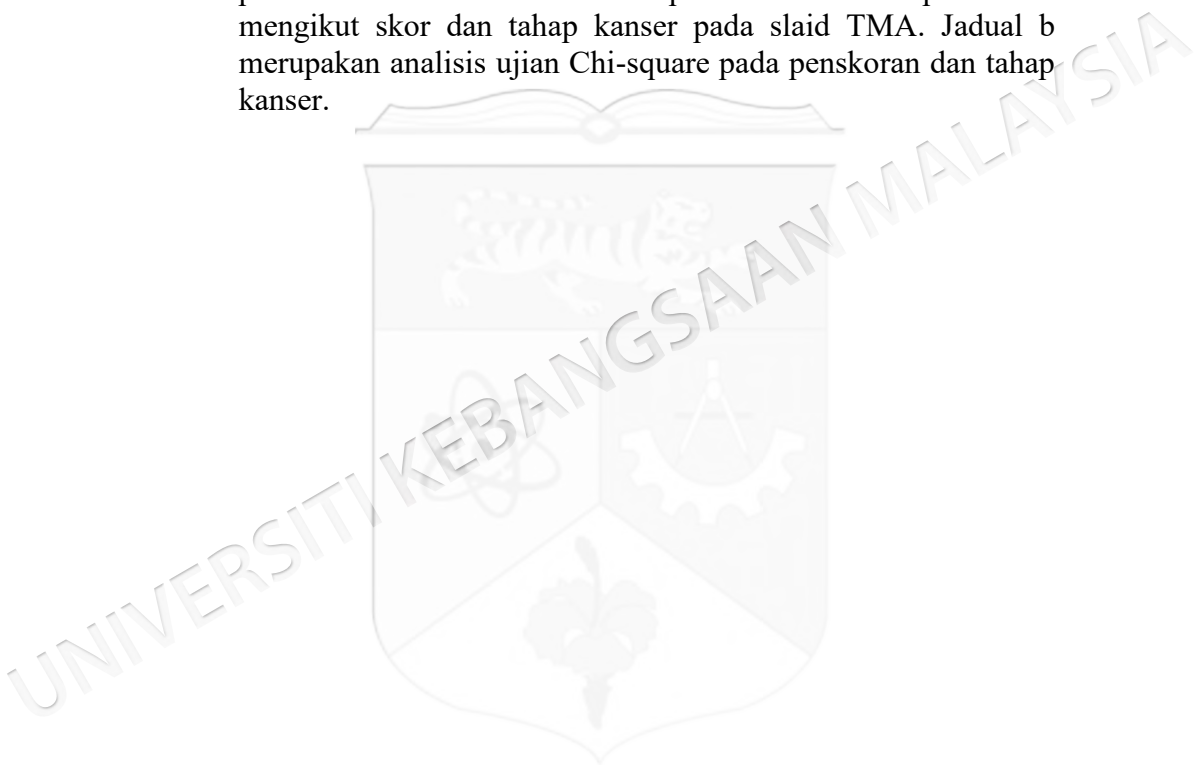
	b Elektroforesis cip	52
3.6	Pengkulturan Titisan Sel	52
	3.6.1 Pengiraan sel	53
	3.6.2 Penentuan viabiliti sel	53
	3.6.3 Pengkulturan sel A549	53
3.7	Pengekstrakan Asid Nukleik	53
	3.7.1 Pengekstrakan RNA	54
	3.7.2 Isolasi produk amplifikasi PCR	54
3.8	Tindak Balas Rantai Polimerase Masa Nyata (PCR)	55
3.9	Asai Fungsi Sel	55
	3.9.1 Asai proliferasi sel	55
	3.9.2 Asai apoptosis	56
	3.9.3 Asai migrasi	56
	3.9.4 Tindak balas dos kemoterapi	57
3.10	Mikroatur DNA	57
	3.10.1 Transkripsi berbalik	58
	a Sintesis bebenang DNA komplementari	58
	b Sintesis bebenang DNA komplementari	58
	c Penulenan cDNA	59
	d Sintesis cRNA secara transkripsi in vitro	59
	e Penulenan RNA komplementari	60
	f Penentuan kuantiti dan kualiti cRNA	60
	3.10.2 Mikroatur	61
	3.10.3 Analisis data	62
3.11	Analisis Ekspresis Protein	63
	3.11.1 Pemblotan Western	63
	3.11.2 Imunohistokimia	64
3.12	Interferen RNA Secara In Vitro dan In Vivo	65
	3.12.1 Pengoptimuman transfeksi siRNA pada sel 549	66
	3.12.2 Haiwan	71
	3.12.3 Transplantasi Xenograf	71
	3.12.4 Gangguan RNA dalam model tumor Xenograf	72
3.13	Analisis Statistik	73
BAB IV	KEPUTUSAN	
4.1	Carian Gen Sasaran Yang Berpotensi Untuk Rawatan NSCLC	75
	4.1.1 Carian pangkalan data Oncomine untuk identifikasi gen sasaran	75

4.1.2	Pembinaan tapak jalan biologi molekul NSCLC	78
4.2	Kesan Penyenyanan Gen Pada Viabiliti dan Kemosensitiviti Sel A549	85
4.2.1	Pembangunan asai penskrinan dan pengoptimuman Tansfeksis siRNA dalam sel A549	86
4.2.2	Kesan saringan siRNA gen sasaran pada viabiliti sel A549	90
4.2.3	Kesan penyenyanan gen sasaran pada sensitiviti sel A549 terhadap Cisplatin	95
4.3	Analisis Fungsi Gen SON	104
4.3.1	Pencarian domain Gen SON	104
4.3.2	Analisis fungsi gen SON dalam apoptosis dan migrasi Sel A549	112
4.4	Analisis Mikroatur Sel A549 Defisien SON	114
4.4.1	Pengekstrakan RNA dan hibridisasi mikroatur DNA	114
4.4.2	Semakan kualiti data mikroatur	115
4.4.3	Analisis pengayaan set gen	120
4.4.4	Analisis tapak jalan SON	125
4.5	Pencerapan Ekspresi Protein SON Dalam NSCLC Menggunakan Mikroatur Tisu	129
4.5.1	Tahap Pengekspresan Protein SON Dalam Tisu NSCLC	129
4.6	Kesan Rawatan siRNA Gen SON Pada Pertumbuhan Tumor Xenograf	140
BAB V	PERBINCANGAN	
5.1	Pengenalpastian Sasaran Terapi NSCLC	148
5.2	Penskrinan RNAi dan Pengenalpastian Gen Yang Sensitif Pada Terapi Kimia	149
5.3	Analisis Fungsi SON	156
5.3.1	Kajian In vitro gen SON	157
5.3.2	Kajian In vivo gen SON	164
5.3.3	Pengekspresan SON pada sampel klinikal tisu mikroatur	165
BAB VI	KESIMPULAN	167
	SENARAI RUJUKAN	171
	LAMPIRAN	207

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2.1	Ciri-ciri SCLC dan NSCLC.	13
2.2	Sistem TNM yang digunakan untuk menentukan tahap kanser.	15
3.1	Kuantiti reagen DCCR yang ditambahkan ke dalam telaga mengikut susunan.	67
3.2	Kuantiti transfeksi reagen DF1 yang ditambahkan ke dalam telaga ke-12.	67
3.3	Carta aliran metodologi kajian in vivo	73
4.1	Hasil saringan GSEA dengan menggunakan gen-gen yang telah disenarai pendek.	76
4.2	Senarai gen yang dipilih untuk ujikaji sasaran terapi bagi kanser paru-paru.	85
4.3	Senarai gen dan fungsi biologi yang memberikan keputusan positif penskrinan siRNA dan sensitiviti Cisplatin.	103
4.4	Rumusan fungsi domain-domain yang terdapat pada jujukan gen <i>SON</i> .	107
4.5	Set gen dari koleksi C2: CP: BIOCARTE yang mempunyai skor pengkayaan (ES) positif apabila disaringkan dengan set gen yang mengalami penurunan pengekspresan gen susulan penindasan RNA gen <i>SON</i> . (a) merupakan senarai set gen. (b) merupakan senarai gen di dalam set gen.	121
4.6	Set gen dari koleksi C2 yang mempunyai skor pengkayaan (ES) yang positif atau yang diperkayakan dalam sel A549 yang mengalami gangguan RNA gen <i>SON</i> .	126
4.7	Pengiraan perubahan gandaan (FC) daripada analisis tindak balas rantaian polimerase masa nyata.	128
4.8	Taburan frekuensi jenis tisu-tisu kanser paru-paru yang berada di dalam slaid TMA.	136
4.9	Taburan frekuensi tahap kanser paru-paru pada slaid TMA.	130
4.10	Penskoran keputusan protein <i>SON</i> .	132
4.11	Rumusan penskoran slaid TMA mengikut intensiti cerapan protein <i>SON</i> .	134

- 4.12 Rumusan kombinasi penskoran slaid TMA yang melibatkan gabungan penskoran intensiti pengekspresan gen SON dan peratusan liputan gen SON di dalam slaid. 135
- 4.13 Heat map yang dihasilkan dengan pertukaran skor ke warna di mana warna hijau merupakan skor 1, warna kuning merupakan skor 2, warna perang merupakan skor 3 dan warna merah merupakan skor 4. Jadual a merupakan Heat map bagi skor dan kred tisu tumor. Jadual b merupakan Heat map bagi skor dan tahap tumor. 136
- 4.14 Rumusan kombinasi penskoran slaid TMA yang mengikut peratusan taburan pengekspresan SON dan intensity pewarnaan protein SON. Jadual a adalah peratusan taburan penskoran mengikut skor dan tahap kanser pada slaid TMA. Jadual b merupakan analisis ujian Chi-square pada penskoran dan tahap kanser. 139



SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
2.1	Plot insiden kanser paru-paru berdasarkan usia mengikut kedudukan geografi. Data ditunjukkan per 100 000 orang mengikut jantina.	8
2.2	Carta 10 kanser paling prevalen bagi lelaki di Malaysia. Kanser paru-paru menduduki tempat teratas sebanyak 16.3% diikuti lain-lain jenis kanser.	9
2.3	Bagi wanita di Malaysia, kanser paru-paru berada pada kedudukan ke-5 paling ramai jumlah pengidap iaitu 5.4% berbanding kanser payudara yang menduduki tempat paling atas.	9
2.4	Prevalen kanser bersarkan jantina lelaki mengikut etnik. Bagi kaum Melayu dan Cina, kanser paru-paru paling kerap terjadi manakala bagi etnik India, kanser paru-paru adalah kanser jenis ke-2 paling kerap terjadi.	10
2.5	Kekerapan kanser bagi wanita mengikut pecahan etnik di Malaysia. Bagi kaum Melayu dan Cina, kanser paru-paru berada pada kedudukan ke-5 dan ke-4 antara 10 jenis kanser paling kerap berlaku. Bagi etnik wanita India pula, kanser paru-paru tidak tersenarai antara 10 kanser paling prevalen di Malaysia.	11
2.6	Gambar memaparkan mekanisme tindak balas siRNA di dalam sistem sel.	40
2.7	Gambar menunjukkan aliran ujian perbezaan pengekspresan gen antara dua jenis sampel berlainan mula dari proses pembuatan DNA mikroatur, penyediaan sampel eksperimen, penghibridasi sampel kajian pada cip DNA mikroatur hingga ke proses terakhir iaitu proses penganalisan cip DNA mikroatur.	44
2.8	Gambar menunjukkan proses penyediaan, pemprosesan dan penganalisan mikroatur tisu.	47
3.1	Illustrasi kaedah penyediaan cRNA menggunakan Illumina RNA Amplification Kit (Ambion).	61
3.2	Gambaran percampuran reagen DCCR dan reagen transfeksi di dalam plat bertelaga 96.	68

3.3	Corak pencairan bersiri 3 kali yang dilakukan bermula dari baris ke-12 jalur E hingga H pada plat hingga ke baris ke-8 jalur E hingga H pada plat. Setiap kali pemindahan, sebanyak 170 μ L campuran reagen dipindahkan.	68
3.4	Corak pemindahan reagen hidrasi dari lajur D baris ke-8 ke baris ke-12 hingga lajur A baris ke-8 ke baris ke-12. Setiap pemindahan adalah 170 μ L reagen hidrasi.	69
3.5	Corak hidrasi plat siGENOME RTF Optimization kit dengan reagen hidrasi yang disediakan.	70
3.6	Lima belas ekor tikus nude mice dibiarkan sesuaikan keadaan persekitaran selama seminggu sebelum melakukan xenograft transplan titisan sel A549. Xenograft transplan titisan sel A549 dilakukan secara sub-cutaneous di bawah kulit bahagian dorsal dengan 2 X 10 ⁷ sel dalam 200 μ L larutan PBS. Tikus nude mice dibahagikan kepada empat kumpulan secara rawak dan dibiarkan tumor bertumbuh sehingga saiz 0.8cm ³ sebelum memulakan rawatan.	72
4.1	“Heat-map” hasil saringan senarai gen yang disenarai pendek.	78
4.2	Analisis Pathway Studio 7.0 yang memaparkan gambaran keseluruhan interaksi gen-gen terpilih dalam bentuk tapak jalan biologi molekul.	80
4.3	Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan Angiogenesis.	81
4.4	Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam aktiviti telomerase.	82
4.5	Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan anti-apoptosis.	83
4.6	Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme metastatik.	84
4.7	Reka bentuk kajian pengoptimuman transfeksi siRNA pada plat siGENOME RTF Optimization kit.	88
4.8	Keputusan kajian pengoptimuman transfeksi siRNA yang diuji dengan reagen transfeksi DF1 yang berlainan kepekatan (a, DF1 = 0.025 μ L; b, DF1 = 0.075 μ L; c, DF1 = 0.225 μ L dan d, DF1 = 2.025 μ L) serta kuantiti sel A549 yang berlainan. Kawalan yang digunakan adalah siGAPDH (kawalan positif) dan siRNA tanpa sasaran (kawalan negatif).	89

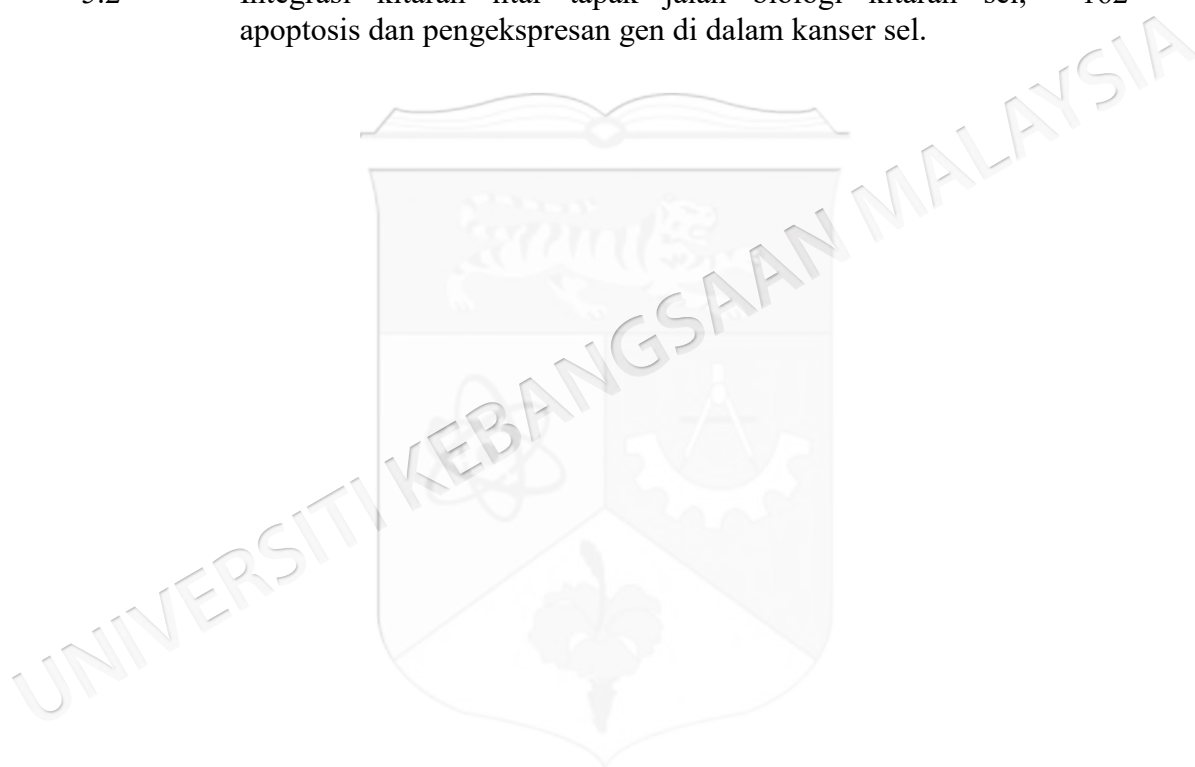
4.9	Graf a – j merupakan keputusan HTS siRNA dengan setiap plat mempunyai 10,000 sel A549, siRNA berkepekatan 50 nM dan 0.225 μ L reagen transfeksi DF1.	93
4.10	Rumusan keputusan penskrinan siRNA yang menyebabkan pengurangan viabiliti sel. (a) Senarai gen yang memberikan keputusan positif pada ujian siRNA. (b) Carta pai taburan fungsi biologi yang memberikan keputusan positif pada ujian siRNA.	94
4.11	Graf dos titik reaksi sel A549 terhadap rawatan cisplatin. (a) merupakan pendedahan sel A549 kepada cisplatin selama 24 jam pada kepekatan yang berlainan. (b) merupakan pendedahan sel A549 kepada cisplatin selama 48 jam.	96
4.12	Keputusan HTS siRNA-cisplatin (a – j) dengan setiap plat mempunyai 10,000 sel A549 dirawat dengan 0.225 μ L reagen transfeksi DF1 dan 50 nm siRNA selama 24 jam diikuti dengan rawatan cisplatin 3 μ M selama 24 jam.	101
4.13	Rumusan keputusan penskrinan kehilangan fungsi gen meningkatkan sensitiviti sel A549 terhadap cisplatin. Rajah merupakan perbandingan antara peratusan survival titisan sel A549 yang dirawat dengan siRNA dan titisan sel yang dirawat dengan siRNA dan cisplatin.	102
4.14	Keputusan mengenalpastian domain SON dengan menggunakan laman sesawang SBASE.	107
4.15	Hasil analisis motif domain gen SON yang dapat mengenalpasti dua motif domain DND1-DSRM dan G-patch dengan nilai e adalah $1.6e^{-20}$ dan $5.0e^{-15}$ masing-masing.	109
4.16	Hasil analisis filogenetik bagi motif domain gen SON yang dikenalpasti. Dedahan filogenetik merupakan pengiraan kebarangkalian kesamaan maksimum antara protein. Filogenetik (a) merupakan hasil saringan motif domain DND1-DSRM. Filogenetik (b) merupakan hasil saringan motif domain G-patch.	111
4.17	Kesan perencatan gen SON ke atas apoptosis titisan sel yang diukur dengan menggunakan asai apoptosis Caspase-Glo 3/7.	112
4.18	Keputusan pengujian fungsi gen SON dengan menggunakan asai migrasi ($p = 0.0041$).	114
4.19	Elektroferogram dan imej gel populasi RNA daripada RNAi SON dan populasi RNA kawalan.	115

- 4.20 Plot serakan mikroatur. Plot serakan bagi dua keadaan titisan sel A549 yang berlainan (sel yang dirawat dengan siRNA SON dan sel yang tidak dirawat). Rajah merupakan plot sampel RNA sel A549 yang dihibridisasikan ke atas cip mikroatur. Panel A merupakan plot serakan sampel kawalan titisan sel A549 tanpa rawatan siRNA. Panel B merupakan plot serakan sampel sel A549 yang dirawat dengan siRNA SON. Majoriti isyarat membentuk paksi 45° yang menunjukkan hibridisasi yang baik. 116
- 4.21 Plot pengawalan kualiti hasil pencerapan ujikaji pengekspresan gen. Plot A merupakan *BoxWhisker Plot* yang diperolehi dengan analisis *Filter by present and marginal*. Plot B merupakan plot komponen analisis (PCA) yang menunjukkan taburan pengekspresan gen yang berlainan dan dikelompokkan kepada kelompok yang berlainan. 118
- 4.22 Keputusan analisis ujian-t tidak berparameter bersama-sama dengan ujian *Benjamini Hochberg* dengan pelbagai nilai p dan bilangan kali ganda perubahan pengekspresan gen (FC) bagi bandingan antara sampel yang dirawat dengan siRNA SON dan sampel kawalan. 119
- 4.23 Analisis pengklusteran hieraki mengelompokkan gen-gen yang mempunyai perbezaan pengekspresan gen antara sampel kajian dan sampel kawalan. Warna hijau bernaksud penurunan pengekspresan gen. Warna merah bermaksud peningkatan pengekspresan gen. Kotak berwarna merah merupakan sampel kawalan. Kotak berwarna biru merupakan sampel rawatan. 120
- 4.24 Tiga gambar rajah Venn dengan setiap satu mewakili set gen berlainan yang diperolehi daripada analisis GSEA. Gen-gen daripada tiga set gen ini digabungkan dan didapati tidak mempunyai kesamaan gen antara ketiga-tiga set gen. 124
- 4.25 Ringkasan keputusan analisis tapak jalan pengisyaratan *Adriane* hasil daripada saringan 336 gen ke atas pangkalan data *Adriane - Pathway Studio 7*. Keputusan ini merupakan sepuluh tapak jalan biologi teratas dari jumlah keputusan hasil saringan. Kesemua tapak jalan biologi ini didapati terlibat dalam pengawalan kitaran sel. 126
- 4.26 Ringkasan keputusan analisis hasil daripada saringan 336 gen ke proses biologi dengan menggunakan pangkalan data *Adriane* melalui perisian *Pathway Studio 7*. Keputusan ini merupakan sepuluh proses biologi teratas dari jumlah keputusan hasil saringan. Kesemua proses biologi ini didapati terlibat dalam tapak jalan kitaran sel. 127

4.27	Perbandingan perubahan pengekspresan antara qPCR dan mikroatur.	128
4.28	Taburan jenis kanser paru-paru pada slaid TMA.	130
4.29	Peratusan taburan tahap-tahap kanser paru-paru pada slaid TMA.	131
4.30	Penskoran slaid TMA mengikut intensiti pewarnaan protein pengikat DNA SON di mana gambar a (skor 0), gambar b berskor pengekspresan lemah (skor 1), gambar c dan d berskor pengekspresan sederhana (skor 2) dan gambar e berskor pengekspresan kuat (skor 3).	134
4.31	Graf taburan penskoran pengekspresan SON pada slaid TMA mengikut a) gred tumor dan b) tahap tumor.	138
4.32	Pengoptimuman transfeksi jujukan siRNA secara In-vitro dengan menggunakan empat jujukan siRNA gen SON yang berlainan. Paksi Y merupakan peratusan sel A549 yang hidup selepas transfeksi siSON dilakukan. Paksi X merupakan kepekatan siSON yang digunakan untuk transfeksi dengan 1 adalah 50nM, 2 adalah 100nM, 3 adalah 150nM, 4 adalah 200nM, 5 adalah 250nM dan 6 adalah 300nM. Setiap satu siRNA yang digunakan adalah dikulturkan dengan 1×10^5 selama 48 jam. Ujian transfeksi siRNA ini dilakukan sebanyak tiga kali. Nilai p bagi replikasi adalah <0.023 .	141
4.33	Pengekspresan gen SON yang ditindas dengan siSON4 yang dicerap dengan menggunakan teknik <i>Western blot</i> .	142
4.34	Dos reaksi tindak balas bagi siSON4 menggunakan tujuh jenis kepekatan 50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM dan 350nM. Setiap satu kepekatan siSON4 diulangi sebanyak tiga kali dan dikulturkan bersama-sama dengan 1×10^5 ribu sel. Nilai p bagi replikasi adalah < 0.036 .	143
4.35	Keputusan rawatan siSON pada tumor A549 yang telah ditransplan secara subkutin pada tikus <i>nude</i> . Gambar a merupakan tikus <i>nude</i> yang membawa tumor A549 sebelum rawatan dimulakan. Gambar b merupakan gambar selepas rawatan siSON. Gambar c merupakan pemerhatian bawah kulit tikus <i>nude</i> yang telah dirawat dengan siSON.	144
4.36	Keputusan rawatan kawalan, siRNA tanpa sasaran pada tumor A549 yang telah ditransplan secara subkutin pada tikus <i>nude</i> . Gambar a merupakan tikus <i>nude</i> yang membawa tumor A549 sebelum rawatan dimulakan. Gambar b merupakan gambar selepas rawatan siRNA tanpa sasaran.	145

Gambar c merupakan pemerhatian bawah kulit tikus *nude* yang telah dirawat dengan siRNA tanpa sasaran.

- | | | |
|------|--|-----|
| 4.37 | Pertumbuhan kinetik tumor antara empat jenis kumpulan tikus <i>nude</i> yang menerima rawatan yang berlainan. Perbandingan statistik antara kumpulan rawatan siSON4 dan Atelogen adalah ketara dengan nilai $p < 0.0016$. | 146 |
| 5.1 | Rumusan integrasi kitaran litar di dalam sel yang diperlukan oleh kanser sel melakukan proliferasi sel. Kitaran litar ini hampir sama dengan kitaran litar sel normal yang aktif membahagi kecuali senarai gen-gen yang berwarna merah yang telah dibukti fungsinya telah berubah. | 161 |
| 5.2 | Integrasi kitaran litar tapak jalan biologi kitaran sel, apoptosis dan pengekspresan gen di dalam kanser sel. | 162 |



SENARAI SINGKATAN

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CaCl ₂	Kalsium Klorida
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cRNA	<i>Complementary RNA</i>
CuCl ₂	Kuprum Klorida
CTR1	Pengangkut Kuprum
DCCR	Reagen Kultur Sel Dharmafect
DRC	DNA repair capacity
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FNAC	Teknik aspirasi jarum halus
gDNA	<i>Genomic DNA</i>
GOI	<i>Gene Of Interest</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
H&E	Hematoxylene dan Eosin
IHC	Imunohistokimia
KCl	Kalium Klorida
miRNA	MikroRNA
NaCl	Natrium Klorida
NSCLC	Kanser paru-paru bukan sel kecil
OC	Kanser ovari
PCR	Tindakbalas Rantaian Polimerase
qRT-PCR	Kuantitatif (<i>Reverse transcriptase</i>) PCR
RNAi	Inteferens RNA
SCLC	Kanser paru-paru sel kecil
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TMA	Mikroatur tisú
TMA-IHC	Imunohistokimia-mikroatur tisú
TNM	<i>Tumor, Nodes and Metastasis</i>
TSG	gen penindas tumor
LOH	Kehilangan Heterozigositi
SCCHN	Kanser leher dan kepala

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Kebelakangan ini kanser paru-paru telah dikenalpasti sebagai pembunuh utama antara kebanyakan penyakit kanser yang lazim didapati di Malaysia (Zainal & Nor Saleha 2007). Kanser paru-paru secara purata telah menyebabkan seramai 785 000 manusia terkorban setiap tahun di seluruh dunia dengan kaum lelaki mencatat peratusan kematian yang tertinggi berbanding dengan kaum wanita. Kes kanser paru-paru biasanya dikesan lewat pada tahap lanjut dimana rawatan yang diberikan tidak mampu lagi memberikan kesan ke atas penyakit ini dan secara tidak langsung menyumbang kepada angka mortaliti yang tinggi pada kes kanser paru-paru. Dengan itu adalah mustahak jika teknik diagnosis awal yang sensitif dapat dibangunkan agar kadar kematian pesakit kanser paru-paru dapat dikurangkan.

Pemahaman mengenai pembentukan kanser paru-paru memerlukan kajian terperinci ke atas maklumat asas biologi molekul serta tapak jalan patologi molekul tentang bagaimana dan kenapa kanser mula terjadi sehingga berkembang menjadi penyakit yang kronik. Berasaskan pemahaman terkini yang dikaji pada jenis kanser yang lain, adalah dipercayai bahawa pembentukan kanser paru-paru juga bermula dari tahap sel. Pada tahap biologi sel proses pemusnahan dan pembinaan semula sel-sel baru merupakan sebahagian daripada proses kawalan sel yang normal untuk menggantikan sel-sel yang tua, rosak dan tidak dapat diperbaiki lagi. Daripada proses pengawalan sel yang rumit ini, akan terdapat sel-sel normal yang mengalami mutasi akibat daripada pengaruh mutagen. Sel-sel yang termutasi ini boleh menyebabkan ia terkeluar daripada kawalan sistem penyeliaan proliferasi sel, proses baik pulih sel serta sistem imunisasi sel yang seterusnya mengakibatkan

sel yang rosak terus hidup dan membiak tanpa terkawal. Kejadian pertumbuhan sel yang luar kawalan sehingga membentuk tisu yang dipanggil kanser (Albertella et al. 2005).

Secara keseluruhan terdapat empat faktor yang dikenalpasti menyumbang kepada risiko mendapat kanser paru-paru pada mana-mana individu – usia, jantina, genetik dan persekitaran. Sistem imunisasi badan dan sistem imunisasi sel menjadi lemah apabila usia meningkat. Peningkatan usia akan mengurangkan keupayaan sistem imunisasi badan dan sistem imunisasi sel untuk mengenalpasti, menyerang dan mencerna sel-sel yang rosak (Rosell et al. 2002). Sel-sel yang rosak ini akan terkeluar daripada kawalan normal, seterusnya membiak dan menjadi kanser. Faktor jantina dikatakan memainkan peranan dalam risiko mendapat penyakit kanser paru-paru kerana mengikut kajian, tahap kemantapan fizikal kaum wanita adalah lebih alah kepada agen-agen karsinogen berbanding kaum lelaki (American Cancer Society 2014; Siegel et al. 2014). Selain faktor-faktor tersebut, faktor genetik keturunan juga memainkan peranan, di mana kebarangkalian risiko mendapat kanser akan meningkat berikutan daripada terdapatnya profil sejarah penyakit kanser di kalangan ahli keluarga (Lee et al. 2004; Falconer & Mittelstrass et al 2008). Agen karsinogen daripada persekitaran merupakan sebab utama kejadian kanser paru-paru. Asap rokok, asbestos dan gas radon antara contoh karsinogen yang telah dibuktikan penyebab utama pada kanser paru-paru (Ezzati et al. 2005).

Kanser paru-paru terdiri dari dua jenis – kanser paru-paru sel kecil (*small cell lung cancer*, SCLC) dan kanser paru-paru bukan sel kecil (*non-small cell lung cancer*, NSCLC). Bermula dari sel hormonal paru-paru, SCLC mewakili antara 15% hingga 20% jumlah kes kanser paru-paru. SCLC lazimnya tumbuh lebih pantas dan agresif berbanding NSCLC (Jemal et al. 2011). Pengelasan (*staging*) SCLC adalah terdiri dari peringkat terhad atau ekstensif. SCLC terhad bermaksud kanser tersebut hanya wujud pada rongga paru-paru dengan tiada tanda-tanda merebak pada organ lain dalam tubuh. SCLC ekstensif pula merujuk kepada kanser yang telah merebak keluar dari kaviti paru-paru.

Kanser paru-paru bukan sel kecil (NSCLC) pula mewakili antara 75 hingga 80% daripada jumlah kes kanser paru-paru. Pengkelasan kes NSCLC terdiri daripada tiga sub-jenis: adenokarsinoma, karsinoma sel skuamus dan karsinoma sel besar. Adenokarsinoma merupakan jenis NSCLC yang paling lazim didapati. Ia merangkumi kira-kira 40% daripada jumlah kes NSCLC. Apabila adenokarsinoma terjadi pada alveoli, ia dikenali sebagai adenokarsinoma bronkoalveolar. Karsinoma sel skuamus pula merupakan jenis kedua yang paling lazim didapati pada kes NSCLC iaitu kira-kira 30% hingga 35% (Yin et al. 2012; Siegal et al. 2014). Terdapat kaitan rapat antara kanser jenis ini dengan tabiat merokok. Karsinoma sel skuamus bermula pada tiub pernafasan, bronkus. Sub-jenis ketiga adalah karsinoma sel besar dimana secara amnya ia bermula pada struktur cabang tiub paru-paru yang dipanggil bronkiol dan kebarangkaliannya ia akan merebak ke struktur belakang tulang dada yang dipanggil mediastinum (Ezzati et al. 2005; Samet et al. 2009).

Pengkelasan kanser lazimnya mengikut pengkelasan TNM. TNM bermaksud *Tumour*, *Node* dan *Metastasis*. Pemeriksaan sampel tisu dilakukan untuk mengenalpasti jenis tumor dan bukti keterlibatan sel kanser pada nodus limfa. Ciri-ciri sel yang hampir menyerupai sel normal dikelaskan sebagai terbeza sempurna (*well-differentiated*, G1). Sebaliknya, sel kanser yang tidak terbeza (*undifferentiated*, G4) akan menunjukkan saiz dan bentuk yang berbeza. Tumor jenis agresif lazimnya menunjukkan tahap sel G4 yang tinggi (Lung Cancer NICE guideline 2011).

Gabungan maklumat patologi dan data klinikal yang diperolehi dari kajian darah, imbasan tomogram berkomputer (*CT scan*), bronkoskopi dan imbasan tulang (*bone scan*) membantu pengkelasan klinikal tahap kanser. Ini penting untuk menentukan jenis rawatan yang bakal diberikan dan untuk menentukan prognosis pesakit kanser. Kanser tahap I bermakna kanser peringkat awal manakala tahap IIb dan IV merupakan kanser tahap lanjut. Tahap kanser yang berlainan memerlukan kaedah rawatan yang berbeza. Rawatan yang diberikan lazimnya melibatkan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi ataupun kombinasi dua atau ketiga-tiganya (Lung cancer NICE guideline. 2011). Walaupun pesakit kanser

paru-paru tahap I boleh dirawat dengan kaedah pembedahan, namun kadar kemandirian melebihi 5 tahun hanyalah 17% (Wakalee et al. 2007). Perkara ini berlaku berkemungkinan besar akibat terdapatnya metastasis mikro ketika diagnosis dilakukan. Ini menunjukkan bahawa pengkelasan klinikal yang digunakan pada masa kini adalah kurang tepat untuk menentukan tahap kanser. Kajian-kajian terkini banyak tertumpu pada usaha mencari penanda molekul bagi membantu proses diagnosis, pengkelasan dan jangkaan prognosis yang lebih tepat.

Walaupun telah banyak laporan saintifik yang diterbitkan di dalam bidang ini namun pakar-pakar sains biologi mengakui bahawa masih terdapat gen-gen lain yang terlibat di dalam proses karsinogenesis yang masih belum ditemui serta terdapat juga gen-gen yang telah dikenalpasti tetapi masih belum diketahui secara terperinci bagaimana ia dikaitkan secara langsung di dalam karsinogenesis kanser paru-paru. Kemajuan teknologi di dalam bidang biologi molekul telah membolehkan sebilangan besar daripada fungsi gen-gen dieksploitasi. Maklumat tentang struktur dan fungsi gen-gen ini akan dapat membantu merangka strategi pengesanan awal kanser paru-paru mahupun sebagai sasaran rawatan baru yang lebih berkesan.

1.2 OBJEKTIF PENYELIDIKAN

1. Mengenalpasti gen-gen yang terlibat di dalam patologi kanser paru-paru dengan menggunakan perisian komputer Oncomine dan Pathway Studio 7.0.
2. Menentukan fungsi gen-gen yang telah dikenalpasti terlibat dalam karsinogenesis kanser paru-paru dengan menggunakan teknik gangguan RNA (RNAi).
3. Mengenalpasti gen-gen yang akan meningkatkan sensitiviti kanser sel adenokarsinoma, A549, terhadap cisplatin.
4. Menentukan tahap pengekspresan gen terpilih dalam sampel klinikal adenokarsinoma paru-paru dengan menggunakan kaedah mikroatur tisu.
5. Menentukan fungsi dan tapak jalan molekul gen terpilih dengan menggunakan teknik RNAi dan analisis mikroatur.

6. Mengkaji kesan perencatan gen terpilih ke atas pertumbuhan kanser dalam model xenograf.

1.3 HIPOTESIS KAJIAN

1. Terdapat gen-gen yang masih belum ditemui terlibat di dalam mekanisme patologi molekul kanser paru-paru.
2. Terdapat gen-gen yang masih belum dicirikan sebagai peningkat sensitiviti kanser paru-paru terhadap cisplatin.



BAB II

KAJIAN PERPUSTAKAAN

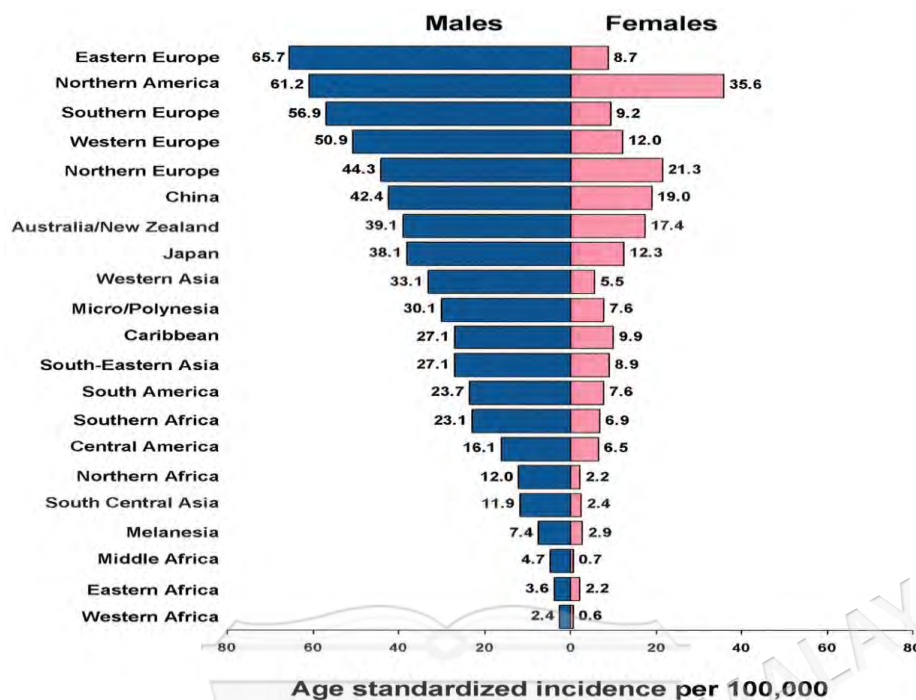
2.1 PENGENALAN

Pada permulaan abad ke-20 kanser paru-paru merupakan sejenis penyakit yang jarang ditemui, namun menjelang lewat abad ke-20, kadar kes kanser paru-paru telah meningkat secara mendadak sehingga menjadi penyakit epidemik. Kini kanser paru-paru menjadi penyebab kematian utama antara kes-kes kanser yang dilaporkan. Dari segi statistik, kadar kematian kes kanser paru-paru adalah berkadar terus dengan jumlah kes yang dilaporkan. Bagi kaum lelaki, kanser paru-paru merupakan pembunuh utama manakala bagi kaum wanita kanser payudara dan kanser serviks menduduki tangga teratas. Di seluruh dunia lebih dari 11 juta manusia didiagnosis menghidap kanser paru-paru setiap tahun. Dijangkakan angka ini akan menjelang ke angka 16 juta kes setahun menjelang tahun 2020 (American Cancer Society, 2014).

Kes kanser paru-paru yang pertama dikenalpasti pada tahun 1985 (American Cancer Society, 2014) dan pada tahun 2012, terdapat 1.35 juta kes baru kanser paru-paru dilaporkan di benua Amerika, angka ini merupakan kira-kira 12.4% daripada jumlah kes kanser yang dilaporkan di negara tersebut. Jumlah kematian akibat kanser paru-paru di seluruh dunia adalah sekitar 1.18 juta orang setiap tahun iaitu 17.6% daripada jumlah kematian yang diakibatkan oleh penyakit kanser. Diketahui bahawa hampir separuh (49.9%) daripada kes kanser paru-paru yang dilaporkan berlaku di negara-negara membangun. Kadar insiden kes kanser paru-paru yang tertinggi di dunia adalah di Amerika Utara dan Eropah Timur diikuti oleh Australia, New Zealand, China dan Jepun. Dari segi jantina, kadar insiden kes kanser paru-paru pada wanita adalah lebih rendah iaitu 12.1 kes per 100 000 wanita berbanding 35.5 kes per 100 000 lelaki (American Cancer Society, 2014; Siegel et al. 2014).

Sungguh pun pelbagai kemajuan telah dicapai dalam bidang teknologi perubatan dan rawatan kanser, namun kadar pemulihan masih tidak banyak berubah berbanding dengan 20 tahun yang lepas. Mengikut kajian statistik yang dibuat oleh program SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) pada kadar peratusan kelangsungan jangka hayat selama 5 tahun bagi pesakit kanser paru-paru mendapati bahawa di USA peratusan pesakit yang hidup lebih daripada 5 tahun adalah 15%, manakala di Eropah adalah 10% dan negara-negara membangun adalah sekitar 8.9% (Siegel et al. 2014; Yin et al. 2012).

Walaupun corak geografi dan insiden kanser paru-paru didapati tidak berkadar terus, kadar mortaliti kanser paru-paru banyak dipengaruhi oleh pendedahan kepada asap rokok (Ezzati et al. 2005). Berdasarkan beberapa kajian kohort yang dilakukan, insiden kanser paru-paru merupakan kaitan langsung akibat penggunaan tembakau secara berpanjangan yang mana ia dianggarkan dengan cara membandingkan kadar kejadian kanser paru-paru akibat merokok dengan kadar insiden kejadian yang dijangkakan pada bukan perokok (Samet et al. 2009; Wakelee et al. 2007) adalah berkadar secara terus. Pada tahun 2020, dianggarkan 85% kes kanser paru-paru pada kaum lelaki dan 47% kes kanser paru-paru pada kaum wanita adalah disebabkan oleh aktiviti merokok. Anggaran bilangan insiden kanser paru-paru melonjak sebanyak 51% sejak 1985. Epidemik kanser paru-paru di Amerika Syarikat didapati telah mencapai tahap tertinggi dan kadar insiden kanser lain pula mula menurun (Jemal et al. 2011) dan begitu juga di negara-negara Eropah barat dan utara (Bray et al. 2004). Walau bagaimanapun, fenomena sebaliknya berlaku pada populasi Eropah timur dan selatan (Tyczynski et al. 2004).

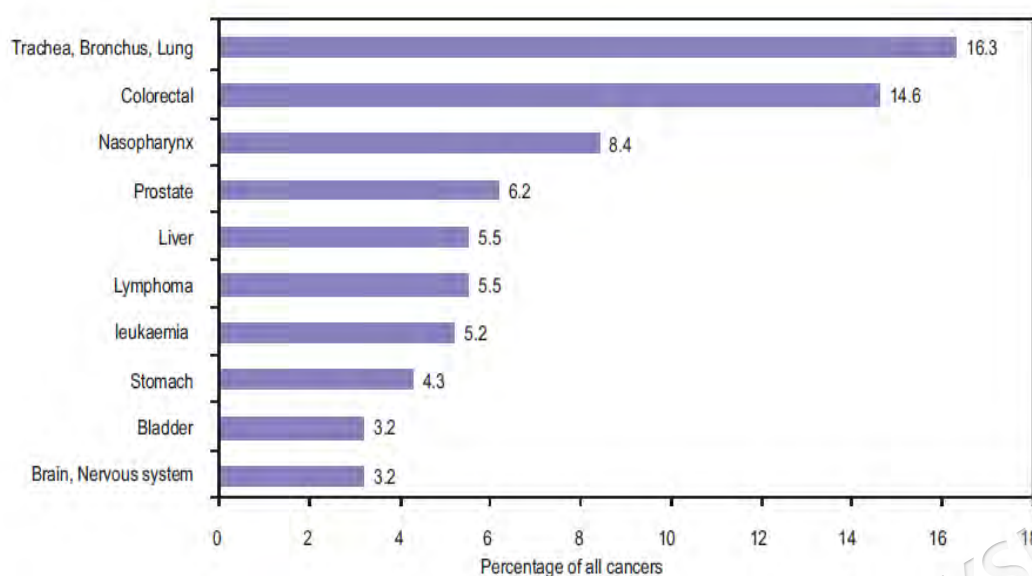


Rajah 2.1 Plot insiden kanser paru-paru berdasarkan usia mengikut kedudukan geografi. Data ditunjukkan per 100 000 orang mengikut jantina.

Sumber: American Cancer Society (2014)

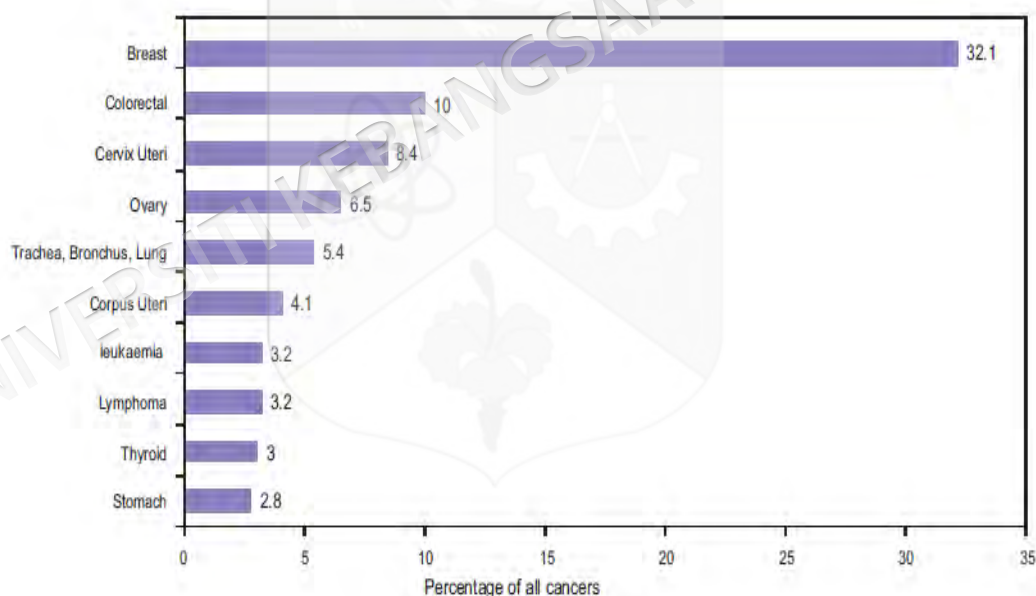
2.2 KANSER PARU-PARU DI MALAYSIA

Dalam konteks Malaysia, laporan Nasional Pendaftar Kanser Malaysia yang diumumkan pada penghujung tahun 2007 (Zainal & Nor Saleha 2007). Daripada sejumlah 21 464 kes kanser yang dilaporkan (9400 lelaki dan 12 064 wanita), 1758 kes adalah kanser paru-paru (13.8% lelaki dan 3.8% wanita). Sejalan dengan trend kes kanser dikebanyakan negara lain di dunia ini, kanser paru-paru pada lelaki adalah tertinggi kadar peratusannya berbanding dengan jenis kanser yang lain (Rajah 2.2). Bagi kaum wanita pula kanser paru-paru jarang berlaku (Rajah 2.3). Dari segi kumpulan etnik pula juga menunjukkan trend yang sama bagi kaum lelaki kecuali kaum etnik India di mana kadar kejadian kanser perut adalah lebih tinggi (Rajah 2.3) manakala bagi kaum wanita, prevalen kanser payudara adalah yang tertinggi dalam semua kumpulan etnik (Rajah 2.4).



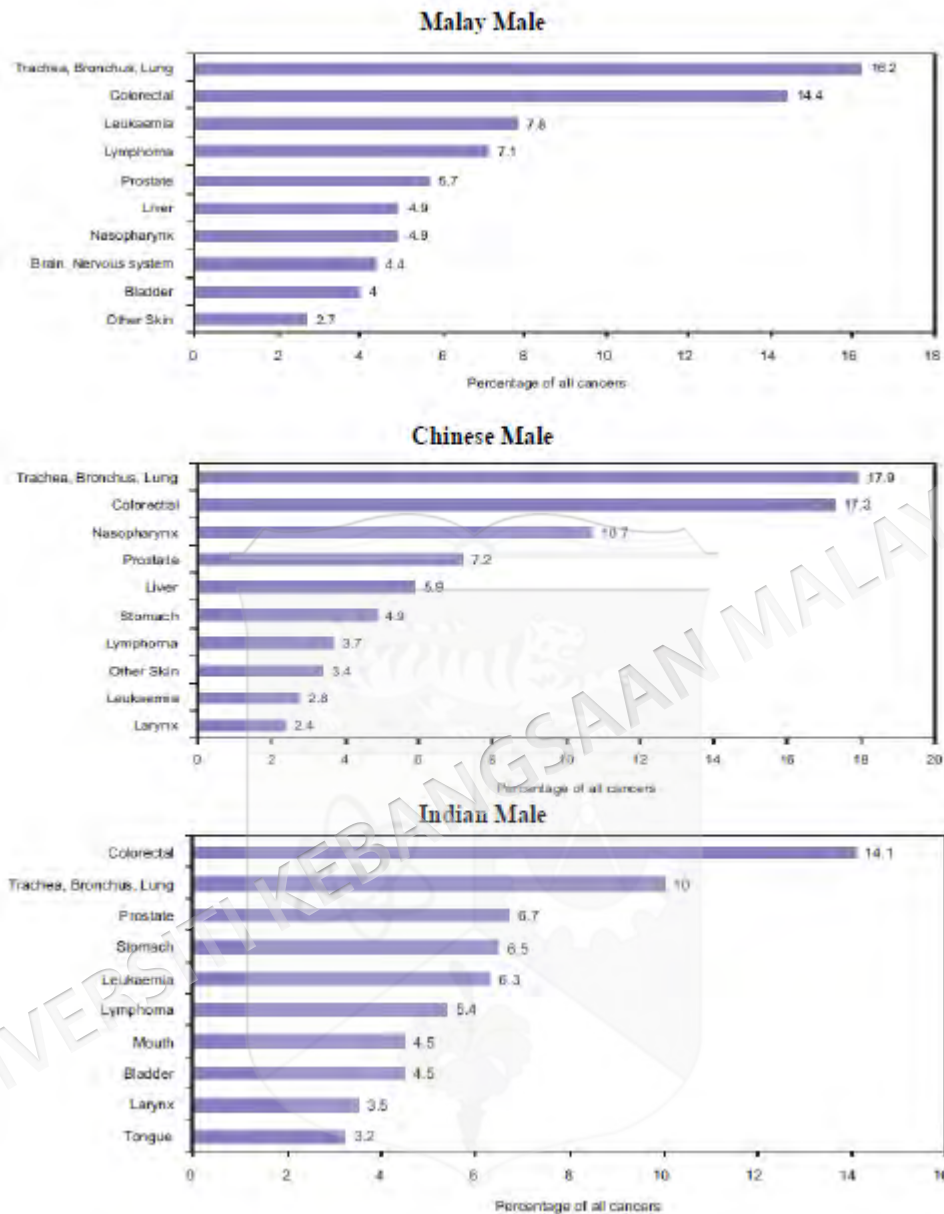
Rajah 2.2 Carta 10 kanser paling prevalen bagi lelaki di Malaysia. Kanser paru-paru menduduki tempat teratas sebanyak 16.3% diikuti lain-lain jenis kanser.

Sumber: Zainal & Nor Saleha (2007)



Rajah 2.3 Bagi wanita di Malaysia, kanser paru-paru berada pada kedudukan ke-5 paling ramai jumlah pengidap iaitu 5.4% berbanding kanser payudara yang menduduki tempat paling atas.

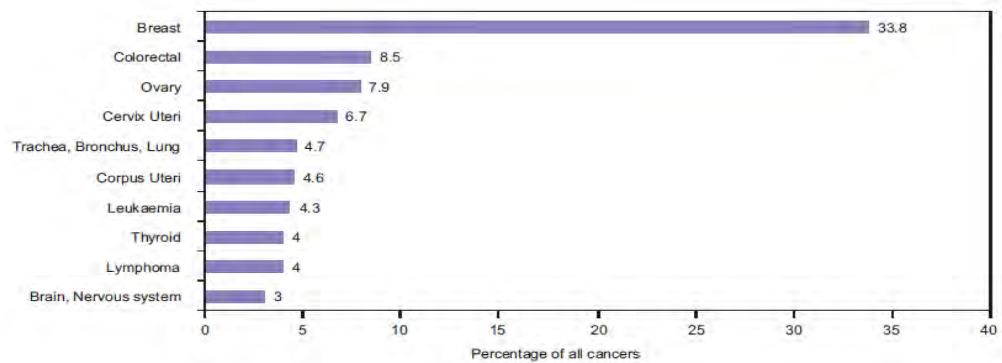
Sumber: Zainal & Nor Saleha (2007)



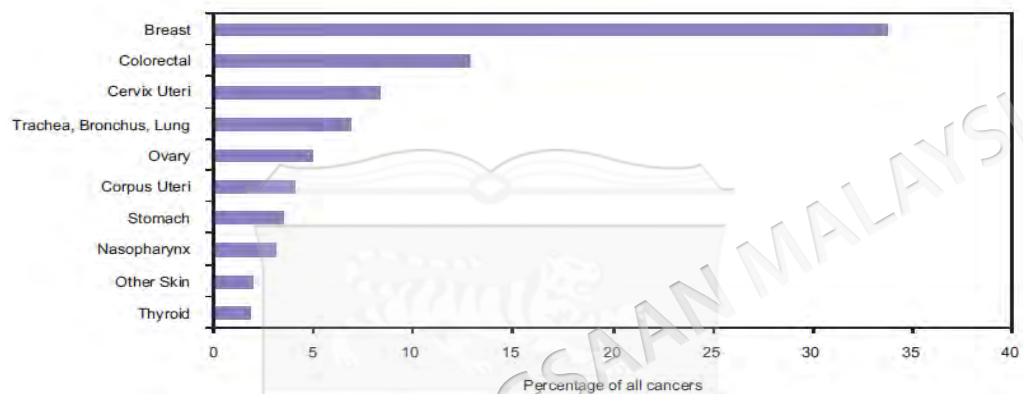
Rajah 2.4 Prevalen kanser berdasarkan jantina lelaki mengikut etnik. Bagi kaum Melayu dan Cina, kanser paru-paru paling kerap terjadi manakala bagi etnik India, kanser paru-paru adalah kanser jenis ke-2 paling kerap terjadi.

Sumber: Zainal & Nor Saleha (2007)

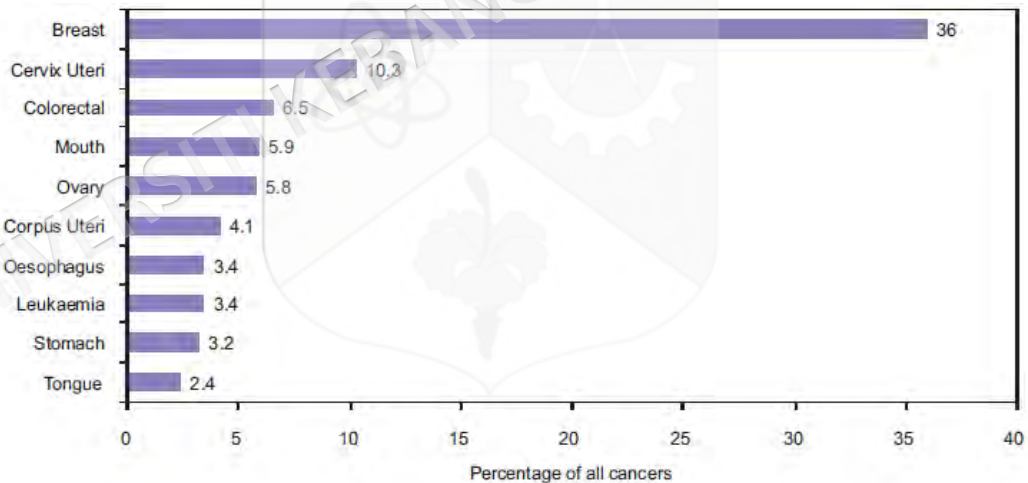
Malay Female



Chinese Female



Indian Female



Rajah 2.5 Kekerapan kanser bagi wanita mengikut pecahan etnik di Malaysia. Bagi kaum Melayu dan Cina kanser paru-paru berada pada kedudukan ke-5 dan ke-4 antara 10 jenis kanser paling kerap berlaku. Bagi etnik wanita India pula, kanser paru-paru tidak tersenarai antara 10 kanser paling prevalen di Malaysia.

Sumber: Zainal & Nor Saleha (2007)

2.3 CIRI KLINIKAL DAN PATOLOGI KANSER PARU-PARU

Perawatan kanser paru-paru merupakan suatu rawatan yang sukar dan mencabar walaupun bagi pengamal perubatan yang berkemahiran. Lebih daripada 90% daripada orang dewasa yang didiagnosis kanser paru-paru mempunyai simptom penyakit yang tidak ketara. Menurut Van Cleave dan Cooley (2004), minoriti pesakit kanser paru-paru mempunyai simptom yang berkaitan dengan pertumbuhan tumor, manakala majoriti kes tidak mempunyai simptom yang sistemik atau mempunyai simptom metastatic kanser. Batuk merupakan simptom utama kanser paru-paru. Simptom ini wujud dalam 65% - 75% pesakit kanser paru-paru. Malahan lebih daripada 25% pesakit mempunyai batuk yang memanjang. Kebanyakan kanser paru-paru berlaku pada pusat saluran udara dan ini boleh menyebabkan radang paru-paru berlaku serta pembesaran limfa nodus selepas salarun udara tersekat (Miller et al. 2005; Travis et al. 2005).

Kesukaran bernafas atau dyspnea, berlaku pada kira-kira 60% daripada pesakit semasa peringkat awal penyakit, manakala kira-kira 65% daripada pesakit akan mengalami simptom ini semasa penyakit berlaku. Punca-punca kesukaran pernafasan pada pesakit kanser paru-paru adalah disebabkan oleh penyekatan saluran pernafasan oleh tumor atau paru-paru parenchyma, lelehan pleural, pneumonia serta komplikasi rawatan kemoterapi atau rawatan radiasi terapi iaitu pneumonitis (Travis et al, 2011; Thunnissen et al. 2012). Selain daripada itu, rasa tidak selesa pada dada atau dinding dada sakit adalah perkara biasa yang berlaku pada pesakit kanser paru-paru dengan kadar kebarangkalian kira-kira 50% daripada pesakit. Ketidakselesaian ini sering tidak jelas, sakit, dan berlaku secara berturut-turut (Travis et al. 2011).

Kanser paru-paru secara amnya terbahagi kepada dua kategori: kanser paru-paru bukan sel kecil (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) dan kanser paru-paru sel kecil (*Small-Cell Lung Cancer*, SCLC). Klasifikasi ini bergantung kepada perbezaan histologi, klinikal dan ciri-ciri perbezaan neuroendokrin. Ciri-ciri perbezaan neuroendokrin biasanya ditemui pada kes SCLC. Peratusan insiden NSCLC adalah lebih tinggi iaitu antara 70% hingga 80% dalam semua kes kanser

paru-paru manakala yang lainnya adalah SCLC (Jadual 2.1). Walaubagaimanapun, ada juga jenis kes kanser paru-paru yang mempunyai kedua-dua ciri.

Seperti yang dinyatakan sebelum ini, kanser paru-paru dibahagikan kepada dua kategori utama NSCLC dan SCLC. Malahan antara kategori tersebut, kanser paru-paru dibahagikan lagi kepada jenis dan tahap. Dalam pemilihan jenis rawatan yang harus digunakan ke atas pesakit kanser paru-paru, ia amat bergantung kepada jenis dan tahap kanser. Maka pembahagian jenis dan tahap kanser paru-paru amat penting bagi keberkesanan rawatan serta meningkatkan keupayaan pesakit untuk bertolak ansur dengan rawatan (Miller et al. 2005; Meijera et al. 2001).

Secara amnya, pengelasan tahap NSCLC dilakukan dengan menggunakan sistem piawaian antarabangsa Tumor, Nodus, Metastasis (TNM), Jadual 2.2. Manakala bagi kes SCLC, sistem yang digunakan merupakan sistem yang dibangunkan oleh Veterans Administration Lung Cancer Study Group. Namun terdapat sesetengah hospital telah mula menggunakan sistem TNM untuk mengkelaskan tahap kanser SCLC. Kanser SCLC dibahagikan kepada dua jenis tahap iaitu tahap terhad dan tahap meluas. Pada pesakit yang ada pada tahap terhad, pertumbuhan kanser adalah terhad pada thorax hemi lateral. Tahap meluas SCLC pula merupakan pertumbuhan kanser sel yang telah melalui proses metastasis (Thunnisen et al. 2012; Lim et al 2008).

Jadual 2.1 Ciri-ciri SCLC dan NSCLC

	SCLC	NSCLC
Frekuensi	25%	75%
Histologi	Sitoplasma sedikit, nukleus hipokromatik yang kecil, kromatin yang halus, nukleoli tak jelas, tumor dalam bentuk kepingan	Sitoplasma banyak, nukleus pleomorfik, nukleoli kromatin kasar, nukleoli jelas

bersambung...

...sambungan

Fenotip neuroendokrin	100%	NSCLC sel besar dan karsinoid
Perembesan peptid	ACTH, AVP, kalsitonin, ANF	PTH
Sensitiviti pada radiasi	Pengecutan 80 – 90%	Pengecutan 30 – 50%
Kemosensitiviti	Tinggi	Rendah
Mutasi <i>c-ras</i>	< 1%	15 – 20%
Amplifikasi/ Ekspresi lampau <i>c-myc</i>	15 – 30%	5 – 10%
Ekspresi lampau <i>c-erbB2</i>	< 10%	30%
Ekspresi <i>bcl2</i>	75 – 95%	10 – 35%
Aberasi ekspresi <i>CD44</i>	Tiada	Ada
Kitaran autokrin putatif	GRP/reseptor GRP, SCF/KIT	HGF/met, neuregulin/erbB
Kehilangan alel 3p	> 90%	50 – 80%
Mutasi p53	75 – 100%	50%
17p LOH	80 – 90%	70%
Ekspresi p53 abnormal	40 – 70%	40 – 60%
Kehilangan ekspresi <i>Rb1</i>	90%	15 – 30%
13q LOH	75%	40 – 60%
Mutasi P16 ^{INK4A}	< 1%	10 – 40%
9p LOH	20 – 50%	50 – 75%
Kehilangan ekspresi P16 ^{INK4A}	0 – 10%	30 – 70%
Ekspresi telomerase	100%	80 – 85%

Sumber: Ubahsuaian daripada Austin et al. (2013)

Jadual 2.2 Sistem TNM yang digunakan untuk menentukan tahap kanser paru-paru.

Jenis Tumor	
Tumor utama (Primary tumor)	
TX	Tumor utama tidak dapat ditaksir atau tumor ditentukan dengan menilai kehadiran sel malignan pada kahak atau pada cecair pencucian bronkus tetapi tidak dapat diperhatikan pada imej bronkoskopi.
T0	Tiada bukti kehadiran tumor utama.
Tis	In situ karsinoma
T1	Dimensi tumor sebesar 3 cm atau kurang dikelilingi paru-paru tanpa bukti pencerobohan di bawah pemerhatian bronkoskopi.
T2	Tumor dengan ciri-ciri berikut: • Mempunyai dimensi lebih daripada 3cm. • Melibatkan bronkus utama dengan saiz 2cm atau lebih. • Pencerobohan ke pleura vesikel. • Berlaku pneumonitis yang merebak ke kawasan hilar tetapi tidak melibatkan keseluruhan paru-paru.
T3	Tumor bersaiz berlainan yang invasif ke bahagian: • Dinding paru-paru, diafgram, pleura mediastinal atau parietal pericardium. • Tumor berada pada bronkus utama dengan jarak kurang daripada 2cm dari carina tetapi tidak melibatkan carina atau pembentukan pneumonitis pada keseluruhan paru-paru.
T4	Tumor saiz berlainan yang invasive ke bahagian trakea, hati, carina, esophagus, vessels dan mediastinum.
Nodus limfa serantau	
NX	Nodus limfa serantau tidak dapat ditaksir.
N0	Tiada metastasis berlaku pada limfa nodus serantau.
N1	Metastasis berlaku pada bahagian tepi peribronkius atau bahagian hilar nodus limfa yang mengalami lanjutan perebakan tumor utama.

bersambung...

...sambungan

N2	Metastasis berlaku pada bahagian tepi mediastinal atau subcarinal nodus limfa.
N3	Metastasis pada kontralateral, mediastinal, kontralateral hilar atau nodus limfa tulang rusuk.

Metastasis jarak jauh

MX	Kehadiran metastasis jauh namun tidak dapat ditaksirkan.
M0	Tiada metastasis jarak jauh.
M1	Kehadiran metastasis jauh.

Sumber: Lung Cancer NICE guideline 2011.

2.4 BIOLOGI MOLEKUL KANSER PARU-PARU

Pemahaman patogenik kanser paru-paru telah bertambah maju ekoran daripada kemajuan teknologi biologi molekul. Kini daripada kajian-kajian klinikal dan biologi molekul yang telah dilakukan kita telah mengetahui bahawa kanser paru-paru berlaku hasil dari pelbagai jenis perubahan genetik yang kompleks sama ada dari segi perubahan epigenetik ataupun ketidakaktifan gen penindas tumor (TSGs) (Manda et al. 2009; Frohlich et al. 2008).

Kanser paru-paru terdiri daripada empat jenis histologi yang utama, iaitu paru-paru sel kanser kecil (SCLC) dan tiga jenis paru-paru bukan sel kanser kecil (NSCLC): karsinoma sel skuamas, adenokarsinoma dan karsinoma sel besar. Perbezaan molekul di antara jenis kanser paru-paru telah dikenalpasti dan telah digunakan untuk membangunkan sasaran terapi yang lebih berkesan. Selain itu, kajian mengenalpastian perubahan genetik pada sel epithelia dan kajian perubahan genetik pada saluran pernafasan akibat daripada aktiviti merokok juga telah dijalankan secara menyeluruh. Kemajuan aplikasi klinikal yang dicapai pada masa kini bagi penilaian risiko mendapat kanser paru-paru, pencegahan, diagnosis awal dan rawatan adalah hasil daripada integrasi kajian molekul dan penyelidikan klinikal (Zochbauer dan Minna 2000; Zochbauer et al. 2001; Sekido et al. 1998; Fong et al. 2001)

2.4.1 Epidemiologi Molekul Kanser Paru-Paru

Analisa statistik daripada beberapa kajian lepas menunjukkan antara 80 hingga 90 peratus kes kanser paru-paru berlaku pada perokok. Seorang perokok mempunyai risiko mendapat kanser paru-paru antara 2 hingga 3 kali ganda lebih tinggi jika dibandingkan dengan bukan perokok. Terdapat juga perbezaan geografi, etnik dan jantina dalam insiden kes kanser paru-paru. Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa wanita mempunyai risiko tinggi pada kes kanser paru-paru akibat daripada pendedahan asap rokok yang karsinogenik berbanding dengan kaum lelaki (Garber et al. 2001; Bhattacharjee et al. 2001; Hecht 1999). Walaupun berhenti merokok dapat menurunkan risiko mendapat kes kanser paru-paru, namun kadar penurunan risiko mendapat kanser paru-paru tidak pernah mencapai nilai sifar kerana sekitar 50% daripada kes kanser paru-paru di Amerika Syarikat terjadi pada bekas perokok (Barriger et al. 2010; Pope et al. 2011; Wistuba et al. 1999; Park et al. 1999; Mao et al. 1997).

Tembakau mengandungi lebih daripada 20 jenis bahan kimia karsinogenik yang dikenali khusus sebagai penyebab kanser paru-paru. Asap tembakau yang membawa agen karsinogenik akan mengarahkan perubahan genetik pada sel dan berkemungkinan menyebabkan kegagalan proses perbaikan DNA pada sel (Hecht 1999). Epidemiologi molekul telah menunjukkan terdapatnya perbezaan risiko kanser paru-paru dengan aktiviti merokok berdasarkan interaksi antara agen karsinogenik yang ada pada asap tembakau. Perbezaan risiko ini ditentukan oleh kepelbagaian genetik yang diaktifkan untuk membuang ketoksikan agen karsinogenik dan kecekapan sel pada proses pemantauan dan pembaikan DNA yang dirosakkan oleh agen karsinogenik (Garber et al. 2001; Bhattacharjee et al. 2001). Hasil kajian-kajian lepas ke atas kepelbagaian genetik menunjukkan bahawa risiko mendapat kanser paru-paru meningkat 2.5 kali ganda bagi mereka yang mempunyai sejarah ahli keluarga menghidap kanser paru-paru. Ini menunjukkan bahawa kewujudan gen dominan pada kes kanser paru-paru yang boleh diwarisi (Turner et al. 2011; Vineis et al. 2006).

Sebuah kajian kanser paru-paru yang mengukur keupayaan pembaikan DNA (*DNA Repair Capacity*, DRC) di dalam limfosit periferi menunjukkan wujud hubung kait antara peningkatan risiko kes NSCLC dan DRC. Berikutan daripada kajian ini, kajian-kajian terkini telah memberikan bukti yang lebih kukuh bahawa kecacatan keupayaan pembaikan DNA di dalam sel membawa kegagalan pra-pemeriksaan kitaran sel dan seterusnya meningkatkan risiko kanser paru-paru (Bhattacharjee et al. 2001). Pengetahuan epidemiologi molekul amat diperlukan untuk memahami patogenesis kanser paru-paru serta memajukan lagi teknik diagnosis dan teknik penilaian status kanser paru-paru. Kajian intensif dan menyeluruh pada molekul epidemiologi masih diperlukan agar percanggahan yang timbul dalam hasil kajian dapat diselesaikan.

2.4.2 Penanda Piawaian Kanser Paru-Paru

Perubahan genetik dan molekul yang terlibat dalam proses karsinogenik kanser epitelium, termasuk kanser paru-paru, telah diketahui berpunca daripada pelbagai proses biologi molekul yang kompleks. Namun ia masih boleh diperbahagikan secara sistematik dengan menggunakan penanda piawaian kanser yang dinyatakan oleh Hanahan dan Weinberg (2000). Antara penanda piawaian yang dinyatakan adalah seperti berikut:

1. Keupayaan membekalkan isyarat pertumbuhan sel
2. Ketidakpekaan pada isyarat anti pertumbuhan
3. Kemampuan untuk mengelakkan apoptosis
4. Replikasi sel yang tak terbatas
5. Kemampuan untuk melakukan angiogenesis
6. Kemampuan melakukan proses metastasis

Histologi kanser paru-paru, SCLC dan tiga jenis kanser NSCLC yang lain mempunyai banyak persamaan dengan prinsip yang dinyatakan oleh Hanahan dan Weinberg (2000). Namun kanser paru-paru juga boleh dibezakan kelainannya dengan kanser yang lain dari segi genetik dan biologi molekul.

a. Pembekalan Isyarat Pertumbuhan: Proto-onkogen

Di dalam sel kanser terdapat banyak faktor pertumbuhan dan reseptor sel yang berkenaan dengan pertumbuhan sel diekspreskan oleh kanser sel serta sel stroma bersebelahan dengannya yang menghasilkan suatu rangkaian gelung pertumbuhan autokrin dan parakrin yang tidak terputus (Zochbauer et al. 2000; Ding et al. 2008; Fong et al. 2001; Govindan et al. 2012; Liu et al. 2012; Yip et al. 2013). Beberapa faktor dan reseptor yang dirangsang oleh proto-onkogen menjadi aktif menyumbang kepada pelbagai mekanisme perkembangan kanser paru-paru. Protein reseptor pertumbuhan epidermal (ERBB) merupakan sekumpulan famili reseptor transmembran tirosin kinase yang mana apabila bersama-sama dengan ligan akan membentuk gelung perangsang pertumbuhan di dalam kes NSCLC. Dua famili protein reseptor ERBB yang berperanan penting dalam perkembangan kanser paru-paru adalah reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR, ERBB1) dan HER2/neu (ERBB2), yang diekspreskan secara sendiri di dalam sel-sel NSCLC (Prenzel et al. 2001; Yarden & Sliwkowski 2001; Shigematsu et al. 2005). Dalam mekanisme pengikatan reseptor-ligan, reseptor ERBB akan menjadi homodimer ataupun heterodimer dan seterusnya merangsangkan aktiviti kinase lalu mencetuskan sejumlah isyarat transduksi intra-sel termasuk aktiviti MAP kinases. EGFR mengawal pertumbuhan dan pembezaan sel-sel epitelium dan ia berkemungkinan meningkatkan pengekspresannya di dalam kanser paru-paru. Selain daripada itu sel kanser paru-paru juga mengekspreskan ligan-ligan yang berhubung kait dengan EGFR, contohnya faktor pertumbuhan epidermal (EGF) dan faktor transformasi pertumbuhan α (TGF α), yang berkemungkinan menghasilkan gelung pertumbuhan autokrin di dalam sel kanser (Hsieh et al. 2000; Ji et al. 2006; Linardou et al. 2008). Pada konteks kajian-kajian lepas, sesetengah penyelidik telah membuktikan hubungan kait pengekspresan EGFR dengan jangka bertahan hidup pesakit kanser paru-paru (O'Byrne et al. 2001; Ohsaki et al. 2000; D'Amico et al. 2000; Cox et al. 2001; Brabender et al. 2001). HER/neu yang merupakan salah satu ahli famili protein ERBB mempunyai tahap pengekspresan yang meningkat dalam 30% kes NSCLC terutamanya kes adenokarsinoma (Ohsaki et al. 2000.; D'Amico et al. 2000; Cox et al. 2001; Brabender et al. 2001; Baselga et al. 2000; Stephens et al. 2004). Pengekspresan protein HER2/neu yang tinggi juga telah dikaitkan sebagai ciri

fenotip kerintangan pada rawatan kemoterapi serta peningkatan kebarangkalian metastasis berlaku (Engelman et al. 2007; Tomizawa et al. 2011).

Famili proto-onkogen *RAS* (*KRAS*, *HRAS* dan *NRAS*) yang mengekodkan 21kD protein membran plasma merupakan komponen utama dalam isyarat transduksi tapak jalan biologi molekul. Ahli-ahli famili protein ini terutamanya *KRAS* teraktif oleh mutasi titik pada sesetengah kes kanser paru-paru yang seterusnya membawa kesan kehilangan kawalan isyarat pertumbuhan sel. Gen *KRAS* sering kali termutasi pada kodon 12, kodon 13 dan juga pada kodon 61. Mutasi *KRAS* didapati pada 15% hingga 20% kes NSCLC terutamanya pada kes adenokarsinoma (Karnoub & Weinberg 2008; Jin et al. 2010). Mutasi *KRAS* adalah berkorelasi dengan aktiviti merokok, yang selalunya menyebabkan transversi genetik bes G ke bes T akibat daripada bertindak balas dengan bahan kimia nitrosamines dan hidrokarbon polisiklik (Riely et al. 2008; Jin et al. 2010; Mao et al. 2010).

Proto-onkogen famili *MYC* mengekodkan produk-produk nuklear yang mensasarkan isyarat transduksi RAS. Protein c-MYC merupakan famili protein yang paling kerap dijumpai mempunyai pengekspresan yang tinggi pada kes SCLC dan NSCLC. Manakala n-MYC dan l-MYC secara amnya hanya diaktifkan pada kes SCLC. Pengaktifan protein famili *MYC* adalah akibat daripada peningkatan pengekspresan protein dan kehilangan kawalan transkripsi gen (Bernasconi et al. 2000). Secara puratanya 18% hingga 31% kes SCLC mempunyai salah satu protein famili *MYC* teramplifikasi dengan lebih banyak berbanding dengan hanya 8% hingga 20% kes NSCLC. Amplifikasi *MYC* didapati berlaku lebih kerap pada kes pesakit yang dirawat dengan kemoterapi serta pada kes variasi sub-jenis SCLC yang berkorelasi dengan jangka bertahan hidup pesakit. Kajian terkini telah mencadangkan bahawa tahap amplifikasi *MYC* yang rendah berlaku dalam kes NSCLC yang berkadar terus dengan jangka bertahan hidup pesakit manakala kombinasi peningkatan pengekspresan gen *MYC* dengan kehilangan pengekspresan gen *CASPASE-3* akan menyebabkan penyingkatan jangka bertahan hidup (Volm dan Koomagi 2000; Kubokura et al. 2001; Ding et al. 2008). Maka dengan ini *MYC* berpotensi sebagai terapi sasaran yang boleh dibangunkan. Sebagai contohnya,

perencanaan pertumbuhan titisan sel SCLC oleh asid retinoik didapati adalah berkaitan dengan peningkatan pengekspresan L-MYC dan penurunan pengekspresan MYC. Tambahan pula, terapi anti-sense yang menyebabkan penurunan pengekspresan MYC memperolehi keputusan yang sangat memberangsangkan di dalam kajian sistem kultur sel (Raso et al. 2007; Subramanian & Govindan 2008; Larsen & Minna 2011).

b. Ketidakpekaan Terhadap Isyarat Anti-pertumbuhan: Gen Penindasan Tumor

Dalam pertumbuhan sel normal, gen penindasan tumor (*TSG*) memainkan peranan yang penting untuk mengawal pertumbuhan sel. *TSG* berfungsi sebagai jaring keselamatan sel yang kedua dimana mereka tidak hanya menghalang pertumbuhan barah secara umumnya, tetapi mereka juga bertindak balas ke atas kerosakan DNA dengan memperbaiki kerosakan yang wujud. Menurut hipotesis Knudson, kehilangan fungsi *TSG* memerlukan alel yang baik dilemahkan. Kemungkinan penyahaktifan alel boleh berpunca dari mutasi gen, pemetilan gen (epigenetik) atau perubahan biologi molekul lain yang menasaskan *TSG* individu. Alel lain yang pada kebiasaannya tidak aktif pada sel normal boleh diaktifkan dalam sel kanser akibat kehilangan genetik yang disebabkan oleh proses delesi, translokasi tidak timbal balik atau rekombinasi genetik pada kawasan kromosom semasa proses mitosis. Hal ini disebut sebagai "kerugian alel" atau "kehilangan heterozigositi" (LOH) (Girard et al. 2000; Wistuba et al. 2000).

Kajian LOH sebagai penanda biologi yang menandakan penyahaktifan *TSG* telah menunjukkan bahawa terdapat beberapa kawasan kromosom yang hilang di dalam sel kanser paru-paru. Antara kawasan-kawasan kromosom yang terlibat adalah 1q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 9p (lokus P16), 9q, 10p, 10q, 11p, 13q (retinoblastoma, RB lokus), 14q, 17p (lokus TP53), 18q dan 22q. Sebagai contohnya, pencarian populasi LOH pada genom kanser paru-paru yang dilakukan oleh Girard (2000) dengan menggunakan 36 titisan sel kanser paru-paru mendapati adanya kawasan kromosom homozigot yang dihapuskan, iaitu kawasan kromosom 2q33, 5p13-14, 8 dan X / Y pada kanser paru-paru. Ini membuktikan bahawa kawasan-kawasan kromosom yang terhapus merupakan tempat letaknya gen-gen

TSG yang dikenalpasti dan belum dikenalpasti. Setakat ini 17 hingga 22 kawasan utama pada kromosom-kromosom yang dinyatakan telah dikenalpasti hilang dalam sel kanser paru-paru melalui analisis LOH seluruh genom (Girard et al. 2000; Jin et al. 2010; Mogi & Kuwano 2011).

Kehilangan alel sering berlaku pada kromosom 3p di kedua-dua SCLC (> 90%) dan NSCLC (> 80%). Ini memberikan bukti kuat bahawa adanya wujud satu atau lebih *TSG* pada lengan kromosom 3p. Beberapa kawasan kromosom 3p yang mempunyai kepelbagaian genetik yang berbeza telah dikenalpasti dengan kaedah penjenisan alel densiti tinggi. Kawasan-kawasan kromosom tersebut adalah kromosom 3p25-26, 3p24, 3p21.3-22, 3p14.2 (gen *FHIT*) dan 3p12 (gen *U2020*). Perbezaan kepelbagaian genetik pada kawasan kromosom ini menunjukkan bahawa terdapatnya gen-gen *TSG* yang berbeza terletak pada kromosom 3p (Larsen & Minna 2011; Ding et al. 2008). Kawasan kromosom 3p21.3 telah diteliti secara terperinci untuk mengenalpasti gen-gen *TSG* yang novel. Beberapa calon *TSG* yang novel telah dikenalpasti dan salah satunya adalah gen *FHIT* yang terletak pada kawasan kromosom 3p14.2 yang meliputi sekitar 1M bes nukleotida DNA (Raso et al. 2007; Ding et al. 2008). *FHIT* adalah gen *TSG* untuk kanser paru-paru yang sering kehilangan alel pada kanser paru-paru (100% kehilangan alel pada SCLC dan 88% kehilangan alel pada NSCLC). Walaupun hampir semua sel kanser paru-paru mempunyai transkripsi gen *FHIT* yang rendah, namun hanya 40% hingga 80% transkripsi mRNA *FHIT* yang tidak normal (Raso et al. 2007). Sel kanser paru-paru sering mengekspresikan transkrip mRNA *FHIT* yang tidak normal. Metilasi pada kawasan promotor gen *FHIT* sering berlaku dan ia terjadi pada 64% daripada sel NSCLC dan 37% daripada SCLC. Namun pada kajian imunohistokimia, pengekspresan *FHIT* dalam kanser paru-paru adalah sangat rendah. Kajian-kajian lepas ke atas mencit telah menunjukkan bahawa tumorigenesis xenograf sel kanser paru-paru dapat dikawal dengan merangsang pengekspresan gen *FHIT* (Ji et al. 1999; Lerman et al. 2000; Raso et al. 2007).

Pada kawasan kromosom 3p21 terdapat gen *SEMA3B*, *FUS1*, *RASSF1A* dan *DUTT1/ROBO1* yang juga dianggapkan sebagai *TSG* mempunyai jujukan nukleotida 50 kb (Lerman et al. 2000; Kondo et al. 2001; Raso et al. 2007). Kajian

in vitro dan in vivo menunjukkan aktiviti penindasan tumor untuk gen-gen yang disebutkan (Kondo et al. 2001). Kehilangan alel dan metilasi pada kawasan promoter adalah mekanisme penting untuk penyahaktifan gen *SEMA3B* dalam *NSCLC*. Satu kajian terkini menunjukkan bahawa mekanisme protein *myristoylation*, diperlukan untuk mengaktifkan fungsi gen *FUS1* untuk merencat perkembangan tumor pada kanser paru-paru serta mengubahsuai aktiviti translasi gen-gen TSG yang lain (Tomizawa et al. 2001; Xian et al. 2001). Modifikasi protein *N-myristoylation* adalah proses dimana karbon kumpulan-14 myristoyl ditambahkan secara kovalen ke terminal residu glisin NH₂ pada polipeptida baru. Pada kawasan kromosom 3p21, gen *RASSF1A*, gen yang isoform dengan gen *RASSF1* merupakan gen yang telah dikenalpasti apabila kehilangan alel gen tersebut akan menyebabkan pengulangan kanser paru-paru (Dammann et al. 2001; Burbee et al. 2001). Metilasi pada kawasan promoter ini didapati berlaku pada 60% kes *NSCLC* dan 90% kes *SCLC*. Penyelidik telah menunjukkan bahawa penyahmetilasi sel kanser paru-paru dengan mengembalikan deoxycytidine 5-aza-2 dapat menghalang pertumbuhan sel kanser paru-paru (Dammann et al. 2001). Kajian lepas juga menunjukkan bahawa pengaktifan gen *RASSF1A* boleh menurunkan pengekspresan gen cyclin D1 pada peringkat post-transkripsi serta menghalang sintesis DNA (Lerman et al. 2000; Dammann et al. 2001; Burbee et al. 2001).

Seperti kanser yang lain TSG yang terkenal pada kanser paru-paru adalah *TP53* (17p13), *RB* (13q12), *P16* (9p21) dan *PTEN* (10q22) dimana ia ditemui pada kawasan kromosom kanser paru-paru yang ditandai dengan alel resesif (Larsen & Minna 2011). Kehilangan fungsi p53 membolehkan sel yang mengalami kerosakan genetik terus bercambah dan seterusnya kandungan genetik mengalami evolusi serta diwarisi ke progeni sel yang seterusnya. Mutan protein p53 yang terkumpul ke tahap yang tinggi akibat daripada translasi mutasi transvers *TP53* akan memanjangkan jangka hayat setengah protein, ini adalah mudah dikesan dengan menggunakan kaedah imunohistokimia (Mitsudomi et al. 2000; Larsen & Minna 2011; Ding et al. 2008). Beberapa kajian telah menunjukkan pengekspresan protein p53 yang tidak normal yang dikesan oleh imunohistokimia pada kanser paru-paru dalam lingkungan 40% hingga 70%. Kelainan pengekspresan protein p53 memainkan peranan penting dalam patogenesis kanser paru-paru (Mitsudomi et al. 2000). Urutan susunan

kandungan genetik pada kromosom 17p13 sekitar kawasan lokus *TP53*, sering kali didapati kehilangan heterozigositi pada SCLC (90%) dan NSCLC (65%), dan inaktivasi mutasi alel terjadi pada 50% hingga 70% kes neoplasma. Mutasi *TP53* pada tumor paru-paru adalah banyak berkaitan dengan aktiviti merokok dan sebahagian besar transversi bes nukleotida G ke T dirangsangkan oleh karsinogen asap rokok, terutama pada perokok wanita (Mogi & Kuwano 2011). Manakala hubungan antara pengekspresan gen *TP53* dan patogenesis adenokarsinoma serta karsinoma sel skuamosa adalah tidak berkaitan (Mitsudomi et al. 2000; Jin et al. 2010).

Selain itu, terdapat juga mutasi lain yang berlaku pada kanser paru-paru seperti mutasi pada pusat kawalan kitaran sel cyclin D1-P16-CDK4-RB, iaitu pusat kawalan yang mengawal peralihan fasa kitaran sel G1 ke S (Sriram et al. 2011). Dalam kes SCLC pusat kawalan kitaran sel paling kerap terganggu adalah penyahaktifan gen *RB*, sementara mutasi cyclin D1 (*CCND1*), *CDK4*, dan *P16* jarang berlaku pada kes SCLC tetapi ia adalah kerap berlaku pada NSCLC (terutamanya mutasi *P16*) (Ohtsuka et al. 2007; Mok et al. 2009). Protein P16 diekspreskan dalam 30% hingga 50% kes NSCLC pada peringkat awal (Ohtsuka et al. 2007; Sriram et al. 2011). Mutasi pada gen *P16* menyebabkan protein P16 tidak berupaya menghalang aktiviti kinase *CDK4* dan *CDK6* dan seterusnya menyebabkan homozigot berlaku dan kitaran sel terus teraktif tanpa sebarang kawalan (Trimarchi et al. 2002; Zochbauer et al. 2001; Sriram et al. 2011; Imielinski 2012).

Gen *PTEN* telah dikenalpasti dan dicamkan lokasinya pada kawasan kromosom 10q23.3 (Forgacs et al. 1998). Analisis alel telah menunjukkan bahawa perubahan pada penanda mikrosatelit yang berhampiran dengan gen *PTEN* adalah berkaitan dengan kadar insiden kehilangan heterozigositi (LOH) kanser paru-paru dengan 91% LOH berlaku pada kes SCLC dan 41% berlaku pada kes NSCLC. Namun mutasi *PTEN* dikesan hanya 11% pada kes kanser paru-paru termasuk tumor SCLC dan NSCLC (Soria et al. 2002; Belinsky 2004). Walaupun perubahan genetik pada gen *PTEN* jarang berlaku pada kes NSCLC, kehilangan pengekspresan protein *PTEN* tidaklah merupakan peristiwa yang kerap ditemui pada peringkat awal

NSCLC (berlaku pada 24% kes NSCLC). Kekurangan pengekspresan gen *PTEN* mungkin boleh dijelaskan oleh aktiviti metilasi yang berlaku pada promotor yang berlaku dalam 35% kes NSCLC (Soria et al. 2002; Belinsky 2004; Esteller et al. 2001; Herman 2004).

Kajian-kajian lepas telah jelas menunjukkan bahawa proses metilasi merupakan punca sebab penting kehilangan fungsi TSG. Proses metilasi yang berlaku pada kawasan kepulauan CPG biasanya terletak pada kawasan promotor gen TSG dimana penyahaktifan transkripsi gen TSG berlaku pada kanser manusia (Toyooka et al. 2003; Herman 2004). Jumlah gen yang menunjukkan kejadian metilasi gen secara tidak normal pada kanser paru-paru semakin meningkat. Semua penemuan baru ini menunjukkan bahawa metilasi gen yang berlainan sering didapati pada kanser paru-paru dan ia berkemungkinan boleh diaplikasi untuk penilaian risiko mendapat kanser paru-paru, diagnosis kanser paru-paru dan membangunkan pendekatan terapi baru bagi kanser paru-paru. Mekanisme yang mendasari proses metilasi gen harus dikenalpasti dengan lebih lanjut kerana ia merupakan faktor utama yang menentukan kejayaan terapi ke atas kanser paru-paru (Zochbauer et al. 2001; Belinsky et al. 2004; Herman 2004; Sriram et al. 2011).

c. Kemampuan Untuk Menghindari Apoptosis

Sel tumor sering tidak sensitif pada reaksi fisiologi sel yang normal (kematian sel atau apoptosis) ketika berlakunya kerosakan DNA pada sel. Gen utama yang memainkan peranan dalam kematian sel adalah gen *TP53* dan protoonkogen *BCL2*. Protein *BCL2* melindungi sel daripada apoptosis dan ia adalah dikawal oleh gen *TP53*. Kajian imunohistokimia telah menunjukkan bahawa peningkatan pengekspresan protein *BCL2* sering didapati pada kes SCLC (75% hingga 95%) manakala pada NSCLC pengekspresan *BCL2* adalah lebih tinggi pada karsinoma sel skuamosa berbanding adenokarsinoma. Sungguhpun pengekspresan *BCL2* dikaitkan dengan patogenesis kanser paru-paru, namun terdapat beberapa kajian menunjukkan keputusan yang bercanggah, di mana pada pesakit yang menunjukkan pengekspresan *BCL2* yang tinggi mempunyai jangka hayat yang lebih panjang berbanding dengan pesakit yang tidak mengekspreskan *BCL2* (Wistuba et al. 2001;

Marquez & Xu 2012). BAX adalah protein yang berhubung kait dengan protein BCL2 dimana ia berfungsi untuk merangsang apoptosis dan mensasar transkripsi gen *TP53*. Pengekspresan BAX dan BCL2 agak terbalik pada kanser paru-paru neuroendokrin dimana pengekspresan BCL2 adalah tinggi dan pengekspresan BAX adalah rendah pada kebanyakan SCLC yang pada kebiasaanya protein p53 kurang diekspreskan (Bandala et al. 2001; Ettinger et al. 2010; Marquez & Xu 2012).

d. Potensi Tak Terbatas Replikatif

Pada hujung kromosom manusia, telomer mengandungi jujukan hexamer berulang TTAGGG. Semasa pembahagian sel yang normal, tidak berlakunya pemendekan telomer maka kematian sel tidak berlaku (Albanell et al. 1997; Arinaga et al. 2000; Perkins 2012). Majoriti kes SCLC, sekitar 80%, dan kes NSCLC menunjukkan aktiviti telomerase yang tinggi. Mekanisme pengawalan aktiviti telomer dan RNA telomerase pada sel kanser masih tidak diketahui dengan lengkap (Xinarianos et al. 2000; Hara et al. 2001; White et al. 2001; Boopathy & Kathiresan 2010).

e. Kemampuan Untuk Mempertahankan Angiogenesis

Angiogenesis adalah penting dalam perkembangan neoplasma, pertumbuhan tumor serta penyebaran sel tumor atau metastasis. Secara umumnya, tumor tidak dapat tumbuh melampaui 2mm diameter tanpa meningkatkan rangkaian saluran darah. Dalam mekanisme angiogenesis, terdapat sejumlah faktor yang menentukan proses ini termasuk faktor perangsang dan faktor penghalang yang menentukan proliferasi dan penghijrahan sel pada kanser paru-paru (Pastorino et al. 1997; Offersen et al. 2001; Boopathy & Kathiresan 2010; Perkins 2012). Proses angiogenesis mempengaruhi proses pembentukan saluran darah yang membekalkan nutrien bagi membolehkan pertumbuhan tumor serta menyediakan jaluran bagi penghijrahan sel tumor secara sistemik. Faktor pertumbuhan endothelial vaskular (VEGF) adalah mitogen yang paling penting mempengaruhi proliferasi sel endotelium. Ia juga bertindak sebagai faktor kemandirian sel endotelium dan prekursor mobilisasi sel endotelium melalui saluran darah (Yuan et al. 2001; O'Byrne et al. 2000). Ada beberapa isoform VEGFR termasuk VEGF121, VEGFR165, VEGF198 dan VEGFR206. Antara isoform tersebut, isoform VEGF189 didapati mempunyai

hubungan yang paling kuat dengan angiogenesis tumor. Dalam NSCLC, majoriti kajian menyokong hubungan antara pengekspresan VEGF dengan kepadatan salur darah mikro (MVD) dan ketidakjelasan prognosis (Pao & Girard 2011; Dutt et al. 2011). Pada peringkat awal NSCLC, MVD didapati adalah lebih padat pada paru-paru normal, distal tumor dan kawasan dalaman tumor. Selain itu, ditunjukkan bahawa jumlah salur darah mikro boleh dijadikan sebagai alat ramalan signifikan jangka bertahan hidup pesakit NSCLC (Niklinska et al. 2001; Tamura et al. 2001; Turner & Grose 2010).

2.5 KERINTANGAN PLATINUM

Platinum mempunyai aktiviti antitumor yang luas, tetapi ketoksikannya hanya pada sesetengah sel dan tisu sahaja iaitu sel enterokromafin gastrousus, tubul buah pinggang, sel rambut koklea, akar ganglia dorsal dan megakaryosit (Kuo et al. 2007), yang mana ia berkemungkinan adalah disebabkan oleh pengaruh epigenetik pada ketoksikannya. Sel-sel normal mempunyai beberapa mekanisme perlindungan daripada persekitaran merbahaya yang juga boleh menyumbang kepada kerintangan pada kemoterapi kanser (Soti & Csermely 2006; Rabik & Dolan Presteria 2007; van der Straaten et al. 2011).

Bagi kanser kolon dan buah pinggang, rintangan intrinsik menghadkan keberkesanan rawatan platinum. Bagi kes-kes kanser yang lain, sesetengah pesakit yang pada mulanya memberikan reaksi tindak balas pada rawatan platinum, kerintangan berlaku apabila rawatan diteruskan. Walaupun kerintangan pada rawatan platinum banyak dikaitkan dengan mutasi gen (Rosell et al. 2002), namun melalui pelbagai pemerhatian klinikal (Stewart et al. 2004) dan penyiasatan makmal (Kartalou & Essigmann 2001) serta pemerhatian perangsangan kerintangan terhadap platinum dengan menggunakan ubat perangsang secara *in vitro* (Furuta et al. 2002; Di Nicolantonio 2005; Akita et al. 2006) telah menyimpulkan bahawa perubahan epigenetik berkemungkinan besar menjadi faktor penyumbang yang penting pada mekanisme kerintangan platinum (Rosell et al. 2003).

Cisplatin telah digunakan sebagai ubat utama untuk merawat peringkat lewat NSCLC dengan dipimpin beberapa ubat kemoterapi yang lain. Walau bagaimanapun, hasil terapeutik adalah berbeza antara pesakit, namun kebanyakan pesakit membawa sifat kerintangan pada rawatan Cisplatin di peringkat akhir rawatan kemoterapi. Sungguhpun usaha-usaha telah dilakukan untuk meningkatkan keberkesanan kemoterapi, namun kadar kelangsungan hidup selama 5 tahun untuk pesakit NSCLC bagi semua peringkat kanser adalah sangat rendah, iaitu dalam lingkungan 17% daripada kes keseluruhan (Maimon et al. 2014; Yin et al. 2012).

Kerintangan boleh dikelaskan sebagai kerintangan aktif apabila terdapat faktor kerintangan yang berlebihan, dimana wujudnya pembentukan bahu pada keluk dos respons (DRC) jika dibandingkan dengan graf ketepuan pasif. Manakala kerintangan pasif adalah akibat daripada kekurangan faktor yang menyebabkan penurunan kecerunan keluk DRC yang disebabkan oleh perubahan faktor lalu memberikan penurunan cerun DRC pada graf jika dibandingkan dengan graf ketepuan pasif (Rosell et al. 2004). Contoh faktor-faktor kerintangan aktif adalah termasuk pam pengeluaran, sistem pembaikan DNA, faktor anti-apoptotik dan sebagainya. Contoh faktor-faktor yang mempengaruhi kerintangan pasif adalah seperti faktor sistem pengaktifan pengambilan ubat, penghalang sasaran terapi seperti penghalang topoisomerase II untuk enzim topoisomerase II, faktor proapoptotik atau faktor yang merupakan sebahagian daripada kaskade apoptotik atau sel-sel yang berada dalam fasa sensitif pada kitaran sel (Rosell et al. 2004; Furuta et al. 2002; Akita et al. 2006). DRC bagi kanser paru-paru bukan sel kecil (NSCLC) bagi kombinasi rawatan cisplatin mencapai nilai sifar pada dos yang lebih tinggi. Ini menunjukkan keberkesanan rawatan adalah dihadkan oleh rintangan kemampatan pasif yang melibatkan faktor-faktor tertentu yang telah dinyahaktifkan (Stewart et al. 2007).

2.5.1 Mekanisme Kerintangan Cisplatin

Kerintangan pada cisplatin telah dikaji secara mendalam. Walau bagaimanapun, dalam mengkaji semula mekanisme kerintangan terhadap agen platinum, keseluruhan data yang ada mencadangkan bahawa mekanisme kerintangannya

adalah hampir sama dengan mekanisme kerintangan cisplatin (Kuo et al. 2007; Rabik et al. 2007).

a. Aliran Darah Dan Pengangkutan Ubat

Pengangkutan kemoterapi adalah berbeza dengan pengangkutan oksigen di dalam sistem aliran darah. Hipoksia akan mengurangkan keberkesanan kebanyakan ubat, tetapi mempunyai kesan yang sedikit pada kesan rawatan cisplatin (Yin et al. 2012). Dari segi mekanisme pengangkutan ubat, kepekatan ubat pada tisu mematuhi prinsip model aliran terhad (berubah mengikut aliran darah) atau pun model keterhadan membran (tidak berkadaran aliran) (Furata 2002; Kuo et al. 2007; Stewart et al. 2007). Cisplatin merupakan ubat yang bertentangan dengan model aliran terhad. Kepekatan cisplatin pada tisu kanser adalah setinggi pada tisu nekrotik dan kepekatan cisplatin di dalam tisu pembedahan adalah tidak berkorelasi dengan model pengaliran darah ke organ. Kepekatan cisplatin pada kanser manusia adalah berbeza-beza mengikut denyutan nadi dan tekanan darah manusia, tapak metastasis dan jenis kanser (Cobo et al. 2007; Chen et al. 2012).

Oleh kerana pengawalan automatik sistem pengaliran darah di dalam tubuh pesakit kanser telah kehilangan kawalan, kadar penurunan dan kenaikan tekanan darah mempunyai impak yang lebih besar pada aliran darah ke tisu kanser berbanding dengan tisu normal, dan ubat-ubat yang mengubah tekanan darah akan mengubah aliran darah ke tisu kanser yang secara tidak terus akan mengganggu penghantaran ubat (Wei et al. 2011; Stewart 2012; Yu et al. 2012). Penurunan pembentukan sel darah merah, kepekatan fibrinogen yang tinggi, dan faktor-faktor lain boleh mengurangkan pengaliran darah ke kanser dengan meningkatkan kelikatan darah, manakala ubat-ubat yang mengurangkan kelikatan darah (contohnya pentoxifylline, mannitol atau agen fibrinolisis) berkemungkinan meningkatkan aliran darah kanser dan meningkatkan pengangkutan ubat (Kartalou & Essigmann 2001; von Tempeholf et al. 2003; Wu et al. 2008; Wei et al. 2012; Stewart 2012). Walaupun kedua-dua aliran darah dan ubat disebarkan melalui pembuluh darah interstitium ke sel kanser boleh dihalang dengan tekanan di dalam tisu kanser yang luar biasa tinggi, namun tekanan bendalir celahan yang lebih tinggi adalah

berhubung kait dengan peningkatan keberkesanan rawatan cisplatin dan memanjangkan jangka hayat pesakit (Yuan et al. 2001; Wachters et al. 2005; Nathan et al. 2005). Secara keseluruhan, sehingga kini masih tidak diketahui setakat mana tekanan tisu dan aliran darah di kanser menjejaskan aktiviti cisplatin secara klinikal.

b. Persekitaran Luar Sel

Rangsangan cisplatin terhadap mekanisme apoptosis dikurangkan dengan kehadiran protein fibronectin matriks ekstrasel, jenis kolagen IV dan laminin yang mengikat sel-sel kanser. Gamma-glutamyltransferase (GGT) di luar sel boleh menceraikan glutathion untuk menghasilkan kumpulan thiol yang mengikat dan menyahaktifkan cisplatin dan lain-lain ubat elektrofilik (Berube et al. 2005; Pompella et al. 2006). Kesan daripada faktor-faktor yang disebutkan di atas pada rawatan klinikal masih tidak diketahui.

Tidak seperti pH pada intra-selular (yang neutral kepada alkali), pH extra-selular kanser adalah sering kali bersifat asidik (Raghunand & Gillies 2000; Prescott et al. 2000). Suatu ujian ke atas penurunan pH ekstrasel dengan nilai pH kurang daripada nilai pH intrasel yang normal mendapati bahawa terdapatnya peningkatan yang ketara proses pengambilan asid lemah dan pengambilan cisplatin ke dalam sel (Raghunand & Gillies 2000; Laurencot & Kennedy 1995). Dengan itu, adalah dipercayai bahawa tabiat pemakanan berpotensi memberi kesan kepada rawatan cisplatin, kerana pH ekstrasel kanser adalah ditingkatkan oleh bikarbonat dan diturunkan oleh penggunaan glukosa di dalam sel (Kozin et al. 2001; Sweeney et al 2003; Lu et al. 2006).

Agen lain juga berpotensi meningkatkan rawatan cisplatin. Sebagai contoh, mannitol dan NaCl kedua-duanya digunakan untuk mengurangkan nefrotoksisiti cisplatin, dengan mengurangkan pengambilan cisplatin dan mengurangkan in-vitro sito-toksisiti, seperti juga KCl, CaCl₂ dan CuCl₂ yang boleh digunakan untuk meningkatkan pengumpulan cisplatin dan sito-toksisiti pada sel (Samimi et al. 2003; Wachters et al. 2005).

Pengikatan ubat pada protein di dalam plasma atau interstitium juga boleh menyumbang kepada kerintangan pada cisplatin. Protein-terikat cisplatin adalah kurang sitotoksik berbanding dengan cisplatin bebas, dan ia akan mengurangkan pengambilan cisplatin ke dalam sel dan tisu (Sweeney et al. 2003; Lu et al. 2006). Cisplatin membentuk ikatan tidak berbalik dengan protein plasma, serta mempunyai jangka separuh hayat kira-kira 2 jam (Samimi et al. 2003; Wachters et al. 2005; Berube et al. 2005).

c. Pengambilan Ubat

Kebanyakan titisan sel yang rintang cisplatin berupaya mengurangkan pengumpulan cisplatin (Siddik 2003; Safaei et al. 2004; Samimi et al. 2004). Pengambilan cisplatin ke dalam sel adalah tidak terpezu dengan peningkatan dos cisplatin (tidak berkadar terus dengan dos cisplatin), tetapi ia berubah apabila terdapat perubahan pada penghalang metabolik yang memberi kesan kepada sistem efluks sel (Mandic et al. 2005; Manda et al. 2009). Beberapa kajian mendapati bahawa sifat pengaliran kandungan pada membran sel (yang berpotensi mengubah sama ada resapan pasif ubat-ubatan atau aktiviti sistem pengangkutan pada membran sel) tidak ada kaitan dengan kadar pengambilan cisplatin ke dalam sel, namun kajian lain mencadangkan bahawa kerintangan cisplatin pada titisan sel adalah berkaitan dengan ketegaran dan ketegangan membran sel yang mana kandungan sphingomyelin dan kolestrol yang tinggi akan menjadi penghalang pengambilan cisplatin, dan telah dibuktikan bahawa pengubahan kandungan laluan sphingolipid dan pengurangan kolestrol berupaya meningkatkan keberkesanan rawatan cisplatin dan meningkatkan keberkesanan rawatan cisplatin (Wahl et al. 2002; Trenz et al. 2003; Min et al. 2004; Stewart et al. 2004; Upadhyay et al. 2006).

Protein CTR1, protein pengangkut kuprum menyumbang kepada pengambilan cisplatin ke dalam sel dan sel yang kekurangan protein CTR1 adalah rintang terhadap cisplatin (Safaei & Howell 2005; Ishida et al. 2002). Pengangkut kuprum pada membran sel akan mengalami internalisasi sitoplasmik dengan pantas selepas terdedah pada cisplatin, dan seterusnya mengurangkan pengekspresan

transporter pada permukaan sel yang akan mengurangkan pengambilan cisplatin (Safaci et al. 2004; Lin et al. 2002; Holzer et al. 2004).

d. Pengeluar Ubat

Kerintangan juga boleh dikaitkan dengan peningkatan pengeluaran cisplatin dari sel atau dari nukleus ke dalam sitoplasma (Trenz et al. 2003; Wang et al. 2004). Pengangkut tembaga jenis-P adenosina trifosfat, ATP7A dan ATP7B telah dikaitkan dengan pengeluaran cisplatin dari sel dan kerintangan sel pada cisplatin (Nakayama et al. 2001; Katano et al. 2003; Higashimoto et al. 2003; Miyashita et al. 2003; Samimi et al. 2004). Kuprum bersaing dengan cisplatin untuk diangkut masuk ke dalam sel, tetapi ia juga mengurangkan pengeluaran cisplatin atau kuprum daripada sel dan meningkatkan jumlah pengumpulan cisplatin atau kuprum pada sel (Stewart et al. 2007). Peningkatan pengekspresan ATP7B dikaitkan dengan kekurangan kesan rawatan cisplatin pada pesakit kanser esofagus dan kanser sel skuamus kepala dan leher (SCCHN). Ada kemungkinan pengurangan pengekspresan gen ATP7B berpotensi menyumbang kepada pengurangan rintangan cisplatin dalam kes klinikal (Higashimoto et al. 2003; Miyashita et al. 2003).

Motor pam sel lain yang juga memainkan peranan dalam rintangan cisplatin (pengurangan atau peningkatan pengeluaran cisplatin) adalah termasuk MRP2 (protein multi-rintang 2), cMOAT (pengangkut anion organik multi-spesifik kanalikular), pam glutathion-konjugat-X, MRP1 (protein multi-rintang 1), p-glikoprotein, dan protein-protein utama paru-paru yang berkaitan dengan rintangan cisplatin (MVP/lrp) (Berger et al. 2000; Kobayashi et al. 2004; Nakamura et al. 2005; Materna et al. 2005; Yeh et al. 2005; Peklak-Scott et al. 2008; Hildebrandt et al. 2009). Pada sel kanser ovari, penurunan pengekspresan gen *LRP* menukar kerintangan cisplatin pada sel dengan meningkatkan pengumpulan cisplatin dalam sitoplasma dan nukleus, dan menurun pengeluaran cisplatin dari nukleus (Wang et al. 2004).

e. Detoksifikasi Ubat

Peningkatan glutathion (GSH) boleh menyebabkan kerintangan cispatin dengan mengikat atau menyahaktifkan cisplatin, meningkatkan proses pembaikan DNA dan mengurangkan tekanan oksidatif pada sel yang disebabkan oleh cisplatin (Fokkema et al. 2002; Bose et al. 2005; Moyer et al. 2010; Sun et al. 2010). Glutation-S-transferase (GST) terutamanya GST-pi boleh menambahkan kerintangan apabila pemangkin katalik mengikat pada ikatan GSH-dadah (Cabelguenne et al. 2001; Medeiros et al. 2003; Cullen et al. 2003; Byun et al. 2005; Peklak-Scott et al. 2008; Moyer et al. 2010; Sun et al. 2010).

Metallothionein (protein bergandungan sulfur yang terlibat dalam homeostasis zink) telah dikaitkan dengan kerintangan cisplatin dalam beberapa kajian lepas dimana kajian klinikal menunjukkan pengikatan metallothionein dan cisplatin berkait rapat dengan rintangan cisplatin pada kes karsinoma hepatoselular dan NSCLC (Surowiak et al. 2005; Endo et al. 2004; Huang et al. 2004; Moyer et al. 2010; Sun et al. 2010). Manakala satu kajian in vitro telah menunjukkan peningkatan ion zink yang akan meningkatkan pengekspresan metallothionein dan seterusnya mengurangkan keberkesanan rawatan cisplatin ke atas sel (Smith et al. 2006).

f. Pengikatan Ubat

Di dalam sel, ikatan cisplatin klorida digantikan oleh hidroksi neutral atau kumpulan aqua hidroksi reaktif yang bercas positif (Song et al. 2004). Kumpulan ikatan aqua cisplatin-klorida kebanyakannya adalah pengikat DNA (Davies et al. 2000). Intra-bebenang dan inter-bebenang DNA bersilang hubung bertanggungjawab untuk membunuh sel (Lin et al. 2002). Tahap pemendekan DNA dalam limfosit berkaitan dengan pengekspresan gen pada tumor dan keberkesanan rawatan cisplatin (Ishida et al. 2002; Song et al. 2004; Hall et al. 2008; Huang et al. 2014). Pengikatan cisplatin-DNA didapati berlaku dengan kerap terutamanya dalam lokus kromatin nukleus yang berkepadatan tinggi dan di dalam mitokondria dengan tahap pengikatan yang tertinggi adalah di dalam sel yang aktif membahagi. Sitotoksiti ikatan cisplatin-

DNA adalah tertinggi apabila terdedah dengan sel yang berada pada fasa G1 dan terendah semasa sel pada fasa G2 / M (Meijera et al. 2001).

Penurunan pembentukan ikatan DNA dan rintangan cisplatin mungkin berlaku walaupun kepekatan sel adalah tinggi. Cisplatin paling berkesan pada pH yang rendah sama ada pada kedudukan intrasel atau pun ekstrasel (Song et al. 2004). Nilai pH yang meningkat secara ketara di dalam sel menyebabkan rintangan cisplatin berlaku dimana pembentukan ikatan cisplatin dan DNA dalam sel akan dikurangkan (Murakami et al. 2001). Pengikatan DNA-cisplatin meningkat secara ketara dalam keadaan asidik. Di dalam konteks kitaran sel, nilai pH intrasel adalah terendah semasa fasa G1 dan adalah tertinggi semasa fasa G2 / M, maka selaras dengan fasa kitaran sel fasa tertentu akan mempunyai ikatan DNA-cisplatin yang tinggi dan secara relatif meningkatkan sitotoksik sel (Abbosh et al. 2006; Murakami et al. 2001).

Penentu utama pH intrasel adalah ion H^+ yang berkaitan dengan pengangkutan mono-karboksilat di dalam sel melanoma berbanding dengan penukar ion Na^+ / H^+ di dalam tisu normal. Ini mencadangkan bahawa perencat pengangkut mono-karboksilat berkemungkinan mensensitifkan rawatan terapi kimia pada barah (Wah et al. 2002). Dalam sistem lain, ion laktat atau ion H^+ simporter merupakan penukar yang paling aktif dalam mengawal selia pH sel barah di dalam keadaan aerobik manakala dalam keadaan hipoksia, kepekatan laktat adalah dikurangkan. Satu faktor utama dalam mengekalkan pH sitosolik yang normal walaupun persekitaran ekstrasel adalah berasidik adalah dengan meningkatkan pemencilan proton ke dalam vesikel sel yang berasidik. Nilai pH sel barah boleh juga berkaitan dengan kandungan nukleosida trifosfat atau nisbah fosfat tak organik di dalam sel (Webb et al. 1999; Lin et al. 2002).

Glikolisis anaerobik dan lain-lain proses biologi memandu penghasilan asid dalam tumor. Merendahkan pH ekstrasel akan meningkatkan pengambilan cisplatin dan serta merendahkan pH intrasel secara ketara (Song et al. 2004). Di dalam kajian in vivo, pengawalan kandungan glukosa intravena akan merendahkan pH ekstrasel tumor, manakala pengambilan bikarbonat melalui minuman akan meningkatkan nilai

pH (Kozin et al. 2001; Safaei & Howell 2005; Holzer et al. 2006). Walaupun nilai pH yang rendah meningkatkan pengambilan cisplatin, meningkatkan pengikatan cisplatin-DNA dan mengurangi pengeluaran cisplatin ke luar sel, namun penggunaan glukosa dan penghasilan laktat yang meningkat secara sendiri sentiasa berlaku di dalam titisan sel yang rintang terhadap terapi kimia (Larson et al. 2010; Kalayda et al. 2012). Tambahan pula, pengekspresan HIF-1 pada tumor mengawal isoenzim lactate dehydrogenase (LDH)-5 (isoenzim LDH adalah enzim paling penting dalam glikolisis anaerobik dan penukaran piruvat-laktat) memberikan prognosis buruk, manakala isoenzim LDH yang paling berkesan dalam penukaran laktat ke piruvat di bawah keadaan aerobik adalah dikaitkan dengan peningkatan sensitiviti cisplatin di dalam sel kanser (Koukourakis et al. 2003; Zisowsky et al. 2007; Larson et al. 2009). Secara ringkasnya, terdapat bukti-bukti teguh pada pra-klinikal yang menunjukkan bahawa pengurangan nilai pH ekstrasel dan intrasel adalah dikaitkan dengan pengambilan cisplatin dan meningkatkan sitotoksik, namun kepentingannya pada klinikal belum lagi dinilai dengan secukupnya, dan pengekspresan gen *LDH* yang tinggi (dijangkakan berkaitan dengan pengurangan nilai pH pada tumor) sering dikaitkan dengan hasil rawatan yang tidak berkesan apabila pesakit dirawat dengan dengan cisplatin.

g. Pembaikan DNA

Cisplatin adalah berkesan ke atas karsinoma testis, yang mempunyai kapasiti rendah untuk membaiki kerosakan DNA yang disebabkan oleh cisplatin. Cisplatin paling cekap dikeluarkan adalah pada kawasan transkripsi DNA dan kecekapan pembaikan gen spesifik yang tersilang hubung adalah dikaitkan dengan rintangan pada cisplatin (Lord et al. 2002; Takenaka et al. 2007; Wang et al. 2008). Kerosakan yang disebabkan oleh cisplatin dibaiki oleh sistem pembaikan pemotongan nukleotida (NER) yang terdiri daripada ERCC1 dan ERCC1/XPF serta gen-gen yang berkaitan seperti *XPA* dan *BRCA1* (Cobo et al 2007; Wang et al. 2008). Peningkatan pengekspresan gen *ERCC1* adalah dikaitkan dengan pengurangan keberkesanan terapi cisplatin dalam kedua-dua kanser oral (OC) dan NSCLC dan tindak balas atau kepanjangan jangka hayat berubah mengikut polimorfisme genotip ERCC1 (Yu et al. 2000; Rosell et al. 2003; Kang et al. 2006; Olaussen et al. 2006).

Polimorfisme *XPD* (gen yang terlibat dalam transkripsi NER di dalam tapak jalan pembaikan DNA), yang memberikan kapasiti pembaikan DNA, apabila terhilang adalah dikaitkan dengan peningkatan sensitiviti terapi cisplatin (Rosell et al. 2004). Dalam kes OC, rintangan pada cisplatin dikaitkan dengan peningkatan pengespresan XPA dan Anemia Fanconi atau tapak jalan biologi BRCA (D'Andrea 2003; Olopade & Wei 2003). Mutasi pada BRCA1 menambahkan lagi sensitiviti limfosit kepada cisplatin, dan dalam kes NSCLC pesakit yang dirawat dengan kombinasi cisplatin dan gemcitabine, tahap mRNA BRCA1 yang rendah pada tumor memberikan kepanjangan jangka hayat yang lebih pada pesakit (Trenz et al. 2003).

Topoisomerase-II juga boleh meningkatkan pembaikan semula kerosakan DNA yang disebabkan oleh cisplatin (Albertella et al. 2005; Xu et al. 2005; Booton et al. 2007). Rintangan cisplatin juga telah dikaitkan dengan peningkatan pengespresan protein pengesan kerosakan DNA, HMG1 (yang bertindak mengesan kerosakan dan melindungi ikatan DNA dengan proses pembaikan DNA) dan Protein-2 pengikat DNA rosak (DDB2) (yang terlibat dalam pembaikan kerosakan DNA yang disebabkan oleh sinaran UV) (Nagatani et al. 2001; Sun et al. 2005; Friboulet et al. 2013).

Secara keseluruhan, terdapat data klinikal yang menyokong peranan komponen tapak jalan biologi NER yang terlibat dalam rintangan terapi cisplatin. Walaupun terdapat banyak bukti pra-klinikal mengenai peranan untuk pelbagai DNA polimerase, topoisomerase II dan protein-protein homolog penggabungan semula pembaikan DNA terlibat dalam mekanisme rintangan cisplatin, namun masih tidak ada maklumat klinikal yang menunjukkan peranan sistem pembaikan DNA terlibat dalam proses rintangan cisplatin (Friboulet et al. 2013).

h. Pengurangan Tidak Balas Apoptosis

Beberapa gen yang mengawal kerosakan DNA, apoptosis dan isyarat kepanjangan jangka hayat sel didapati menyumbang kepada rintangan cisplatin (Richardson & Kaye 2005). Cisplatin boleh mendorong apoptosis melalui kompleks FAS dan

isyarat ligan FAS (dengan mengaktifkan kaspase 8 dan seterusnya kaspase 3) atau melalui pembebasan sitokrom-c di dalam mitokondria (Gonzalez et al. 2001). Dengan kehadiran ATP dan sitokrom-c, faktor pengaktifan peptidase apoptotik 1 (APAF1) akan mengaktifkan kaspase 9 dan diikuti dengan pengaktifan kaspase 3. Cisplatin juga boleh membunuh sel secara penglibatan terus pada tapak jalan apoptosis kaspase-3 (Gonzalez et al. 2001).

Kecacatan proses apoptosis menyumbang kepada penentangan terhadap kedua-dua mekanisme sitotoksik cisplatin dan tindak balas p53 (Minagawa et al. 1999). Penurunan pengekspresan p53 berkemungkinan memberikan kesan rintangan cisplatin dengan peningkatan pengekspresan pengawal negatif MDM2 diikuti dengan penurunan atau ketiadaan pengekspresan protein p14ARF. Rintangan cisplatin juga telah dikaitkan dengan pengurangan pengekspresan protein-2-pengikat p53 (Mori et al. 2000). Sel-sel yang mempunyai delesi atau mutasi p53 pada kebiasaannya adalah rintang terhadap cisplatin (Asada et al. 1999; Kigawa et al. 2001). Rintangan terhadap cisplatin yang dikaitkan dengan mutasi p53 telah dibuktikan secara *in vitro* pada titisan sel INOC dan SCCHN serta secara klinikal pada tumor sel germa dan SCCHNs (Volm & Koomagi 2000; Ando et al. 2004; Mandic et al. 2005; Glaysher et al. 2009).

Kaspase 3, 8, dan 9 adalah penting dalam proses apoptosis yang dirangsangkan oleh cisplatin. Secara amnya, titisan sel yang rintang terhadap cisplatin mempunyai ciri-ciri penurunan pengekspresan kaspase dan BAX, tetapi terdapat peningkatan pengekspresan BCL-2 (Achanzar et al. 2002; Chanvorachote et al. 2006). Kehilangan tapak jalan biologi kaspase 8 dikaitkan dengan rintangan cisplatin di dalam titisan sel SCCHN (Toyozumi et al. 2004). Penurunan pengekspresan CD95 (FAS) atau pengaktifan tapak jalan biologi selepas pendedahan cisplatin boleh membawa kepada perencatan pengaktifan kaspase 3 dan 8, dan dikaitkan dengan rintangan cisplatin dalam tumor sel germa dan sel OC (Spierings et al. 2003). Penurunan jumlah protein kaspase 9 selepas pendedahan cisplatin telah ditunjukkan berlaku di dalam sel yang melepaskan sitokrom-c dari mitokondria dan pengekspresan BCL-2 dan BCL-XL (Kuwahara et al. 2002; Marquez & Xu 2012).

Secara keseluruhan, terdapat bukti pra-klinikal mengenai kaitan antara rintangan cisplatin dengan ketidaknormalan pelbagai faktor apoptosis, tetapi setakat ini hanya protein p53 sahaja didokumentasikan terdapatnya perubahan yang tidak normal pada kajian klinikal (Isonishi et al. 2001). Kajian selanjutnya untuk gen-gen serta faktor apoptosis yang lain masih diperlukan bagi mengetahui mekanisme kerintangan cisplatin berlaku.

i. Penghalang Apoptosis

Apoptosis boleh terhalang oleh peningkatan pengekspresan XIAP (protein perencat apoptosis berhubung-X) dan interaksinya dengan tapak jalan biologi PI3-K/AKT yang akan merencatkan apoptosis berlaku (Cheng et al. 2002). Peningkatan pengekspresan XIAP dan IAP-2 adalah berkorelasi dengan rintangan cisplatin pada beberapa jenis titisan sel. Penurunan pengekspresan XIAP meningkatkan sensitiviti terhadap cisplatin, meningkatkan aktiviti kaspase-3 dan aktiviti apoptosis di dalam titisan sel ovari yang rintang terhadap cisplatin (Nomura et al. 2005; Yang et al. 2005). Titisan sel yang mempunyai peningkatan pengekspresan survivin juga berkorelasi dengan rintangan cisplatin. Dengan menggunakan teknik oligonukleotida antisense, perencatan survivin berjaya menambahkan aktiviti apoptosis yang dirangsangkan oleh cisplatin (Sharma et al. 2005; Bandala et al. 2006).

Peningkatan pengekspresan protein BCL-2 atau BCL-XL sering kali dikaitkan dengan rintangan cisplatin, dan berkaitan dengan penurunan kesan rawatan dan kependekkan jangka hayat pesakit pesakit OC (Beale et al. 2000; Yu & Wang 2004; Dong & Wang et al. 2004; Williams et al. 2005). Hipoksia akan menaikkan pengekspresan BCL-XL dan seterusnya meningkatkan rintangan pada cisplatin (Dong & Wang et al. 2004). Spesis oksigen reaktif yang dihasilkan oleh cisplatin menyebabkan defosforilasi dan degradasi BCL-2, manakala nitrik oksida (NO) mendorong nitrosilasi sulfat dan meningkatkan pengekspresan BCL-2. Aktiviti sintesis dan penghasilan NO dikaitkan dengan rintangan cisplatin di dalam sel NSCLC (Chanvorachote et al. 2006). Secara keseluruhan kebanyakan gen perencat apoptosis telah dikaitkan dengan rintangan pada cisplatin dalam kajian pra-klinikal,

manakala bukti klinikal telah menunjukkan terdapat korelasi antara pengekspresan BCL-2 dan BCL-XL ke atas rintangan cisplatin.

2.6 INTERFERENS RNA

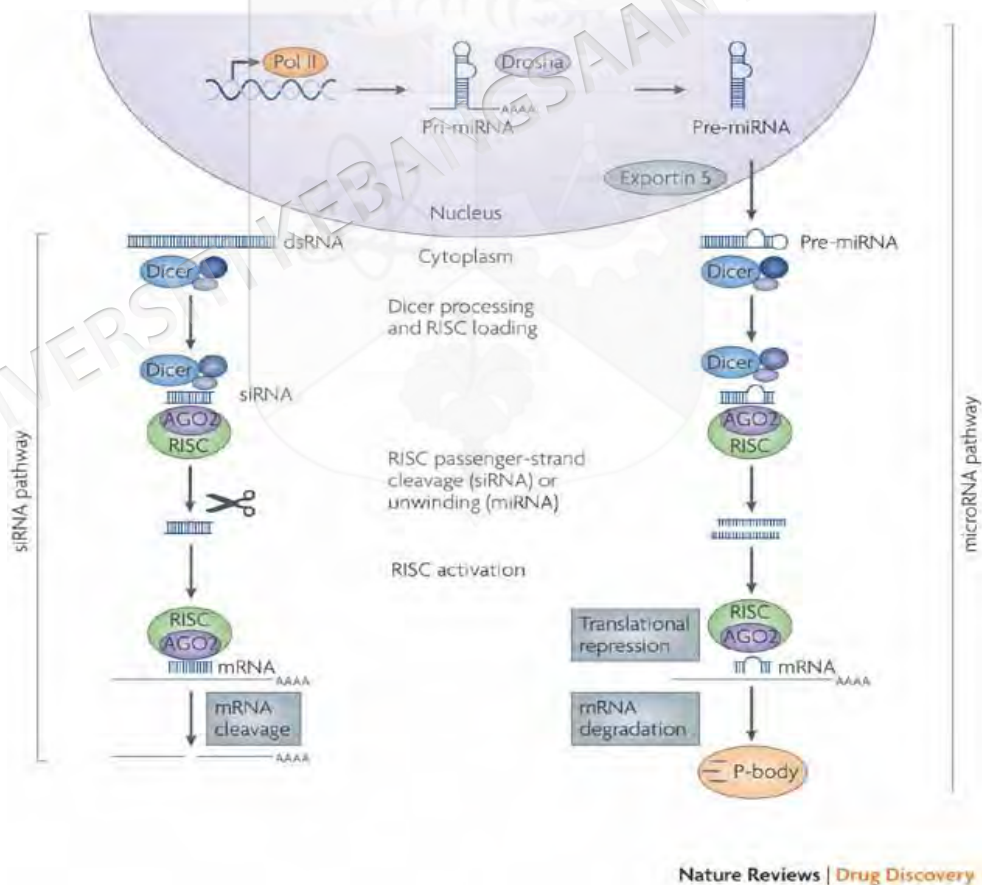
Gangguan RNA atau interferens RNA (RNAi) adalah sistem di dalam sel hidup yang mengambil bahagian dalam mengawal gen yang aktif dan keaktifan mereka. Sistem telah dimanipulasi pada beberapa tahun ini secara meluas untuk mengkaji patogenesis penyakit termasuk kajian sensitiviti kemoterapi kanser sel seperti yang dilakukan oleh Fuessel (2006) dan Ling (2015). Terdapat dua jenis molekul RNA kecil iaitu mikroRNA (miRNA) dan gangguan kecil RNA atau interferens kecil RNA (siRNA) yang memainkan peranan dalam sistem gangguan RNA (Baulcombe 2007; Macrae et al. 2006; Pak 2007; Siomi et al. 2009). Dari segi sejarah, gangguan RNA juga dikenali dengan nama lain iaitu penindasan bersama, penindasan gen pasca-transkripsi, dan *quelling* (Pillai et al. 2007). Hanya selepas proses dan fenomena RNA berjujukan pendek ini difahami maka ia diselaraskan penamaannya dengan nama RNAi (Fire et al. 1998). Pada tahun 2006, Andrew Bomba dan Craig C. Mello berkongsi Hadiah Nobel dalam bidang Fisiologi atau Perubatan bagi hasil kajian mereka pada fenomena gangguan RNA di dalam nematod cacing *C. elegans*, yang diterbitkan pada tahun 1998 (Ahlquist 2002; Fire et al. 1998).

2.6.1 Mekanisme Tindak Balas siRNA

Tapak jalan biologi RNAi dijumpai dalam kesemua eukariot termasuk juga haiwan dan ia adalah dirangsangkan oleh enzim Dicer yang berperanan memelah jujukan lingkaran berkembar RNA (dsRNA) kepada serpihan-serpihan jujukan singkat yang dipanggil siRNAs dengan lingkungan kepanjangan 20 nukleotida (Bernstein et al. 2001). Setiap siRNA diceraikan kepada dua jujukan RNA tunggal yang dipanggil jujukan penumpang dan jujukan panduan. Jujukan penumpang akan didegradasi, dan jujukan panduan akan dimasukkan ke dalam kompleks induksi penindas RNA (RISC) (Vermeulen et al. 2005; Zamore et al. 2000). Hasilan RNAi yang paling banyak dikaji adalah pasca-transkripsi penindasan pengekspresan gen, yang berlaku

apabila jujukan panduan terikat pada jujukan mRNA dan terdorong proses belahan oleh Argonaute yang merupakan komponen pemangkin kompleks RISC. Proses ini berkeupayaan disebarikan secara sistemik ke seluruh sistem organisma walaupun kepekatan siRNA yang terhad (Liu et al. 2003; Sijen et al. 2007).

Ciri-ciri mekanisme tindak balas RNAi yang bersifat khusus dan berulang merupakan suatu alat penyelidikan yang sangat berharga biarpun di dalam kultur sel ataupun organisma hidup. Ini adalah kerana sintetik RNA berjujukan dua apabila diperkenalkan ke dalam sel akan menyebabkan penindasan pengekspresan gen yang dikaji (Okamura et al. 2004). RNAi juga boleh digunakan untuk penskrinan besar-besaran secara sistematik bagi menyekat pengekspresan setiap gen di dalam sel, yang boleh membantu mengenalpasti komponen penting di dalam proses selular seperti proses pembahagian sel (Baulcombe 2007; Siomi et al. 2009).



Rajah 2.6 Gambar memaparkan mekanisme tindak balas siRNA di dalam sistem sel.

Sumber: (Petikan dari Nature Reviews, Sijen et al. 2007)

2.6.2 Fungsi Biologi RNAi

RNA merupakan produk hasil langsung daripada gen, dan RNAi yang kecil ini boleh mengikat kepada RNA khususnya mRNA dan akan meningkatkan atau mengurangkan aktiviti jujukan RNA yang terikat, contohnya dengan menghalang translasi mRNA kepada protein (Castanotto et al. 2009; Gregory et al. 2005; Parker et al. 2006; Qiu et al. 2005). Gangguan RNA memainkan peranan yang penting dalam mempertahankan sel-sel daripada gen-gen parasit seperti gen dari virus dan transposons. (Bagasra & Prilliman 2004)

a. Imuniti

Gangguan RNA adalah sebahagian daripada mekanisme penting tindak balas imuniti sel terhadap serangan virus dan lain-lain bahan genetik asing, terutama di dalam tumbuh-tumbuhan di mana ia juga boleh mencegah penyebaran transposons (Wong & Li 2007). Tumbuhan seperti *Arabidopsis thaliana* mengekspreskan pelbagai homolog dicer yang khususnya bertindak balas secara berbeza-beza apabila terdedah kepada pelbagai jenis virus yang berlainan (Ahlquist 2002; Wong & Li 2007). Walaupun sebelum tapak jalan biologi RNAi difahami sepenuhnya, ia telah diketahui bahawa penindasan gen di dalam tumbuh-tumbuhan boleh merebak ke seluruh tumbuhan secara sistemik, dan boleh dipindahkan melalui penpucukan tumbuh-tumbuhan dengan teknik cantuman (Zhao & Srivastava 2007). Fenomena ini telah terdahulu dikenali sebagai salah satu sistem penyesuaian imuniti tumbuhan yang digunakan untuk mempertahankan diri daripada serangan virus selepas pertahanan imuniti yang pertama dilepasi (Ahlquist 2002). Ekoran dari tindak balas fenomena RNAi tumbuhan, banyak virus tumbuhan telah berevolusi dan berjaya menyekat mekanisme RNAi daripada berlaku. Antara evolusi yang didapati pada virus tumbuhan adalah termasuk protein virus mengikat bebenang dua jujukan pendek RNA dengan penghujung jujukan tunggal yang tergantung, seperti yang dilakukan oleh tindakan balas dicer (Lee et al. 2004).

Walaupun haiwan secara amnya mengekspreskan pelbagai jenis enzim dicer yang kurang daripada tumbuh-tumbuhan, RNAi dalam sesetengah haiwan juga telah

terbukti mempunyai mekanisme tindak balas antiviral. Dalam kedua-dua juvana dan dewasa *Drosophila*, gangguan RNA adalah penting dalam sistem imuniti semula jadi bagi tindak balas antivirus dan adalah aktif terhadap patogen virus X *Drosophila*. Peranan yang sama juga dalam imuniti *C. elegans* dimana protein argonaute adalah didapati meningkat pengekspresannya apabila serangan virus dan cacing berlaku (Bagasra & Prilliman 2004; Lee et al. 2004).

Peranan RNA gangguan dalam imuniti semula jadi mamalia kurang difahami, dan secara relatif antara data kajian spesis yang lain hanya sedikit maklumat sahaja diperolehi. Walau bagaimanapun, kewujudan virus yang mampu mengekodkan gen untuk menyekat tindak balas RNAi dalam sel mamalia boleh menjadi keterangan bagi membuktikan wujudnya tindak balas imuniti semula jadi di dalam mamalia yang bergantung pada RNAi (Bagasra & Prilliman 2004). Fungsi lain RNAi dalam virus mamalia juga wujud selain berperanan menyekat tindak balas RNAi mamalia, contohnya adalah miRNAs yang diekspreskan oleh virus herpes yang berkebolehan bertindak sebagai pencetus pengorganisasian heterokromatin (Ahlquist 2002).

b. Penurunan Pengekspresan Gen

MikroRNA (miRNA) yang diekspreskan di dalam sel, termasuk intronik dan intergenik miRNA adalah yang terpenting dalam penindasan translasi dan pengawalan pertumbuhan, terutamanya dalam morfogenesis dan penyelenggaraan sel yang tidak mengalami pembezaan sel atau pembezaan sel yang tidak lengkap seperti sel stem (Ahlquist 2002). Peranan miRNA yang diekspreskan dalam sel tumbuhan dalam menurunkan pengekspresan gen pertama kali diterangkan pada *C. elegans* pada tahun 1993. Dalam tumbuhan, fungsi ini telah ditemui apabila "microRNA rahang" *Arabidopsis* telah ditunjukkan terlibat dalam pengawalan pengekspresan gen-gen yang terlibat dalam pengawalan bentuk tumbuhan (Wong & Li 2007). Majoriti gen yang dikawal oleh miRNA adalah faktor transkripsi dimana aktiviti miRNA adalah meluas dan mengawal seluruh rangkaian gen semasa pertumbuhan dengan mengawal pengekspresan gen pengawal utama, termasuk faktor-faktor transkripsi serta protein F-box (Ahlquist 2002; Wong & Li 2007).

Dalam kebanyakan organisme termasuk manusia, miRNAs juga telah dikaitkan dengan pembentukan kanser dan mencetuskan kehilangan kawalan kitaran sel. Dalam konteks kanser, miRNA boleh berfungsi sebagai kedua-dua onkogen dan penindas kanser (Bagasra & Prilliman 2004; Bernstein et al. 2001; Siomi et al. 2009).

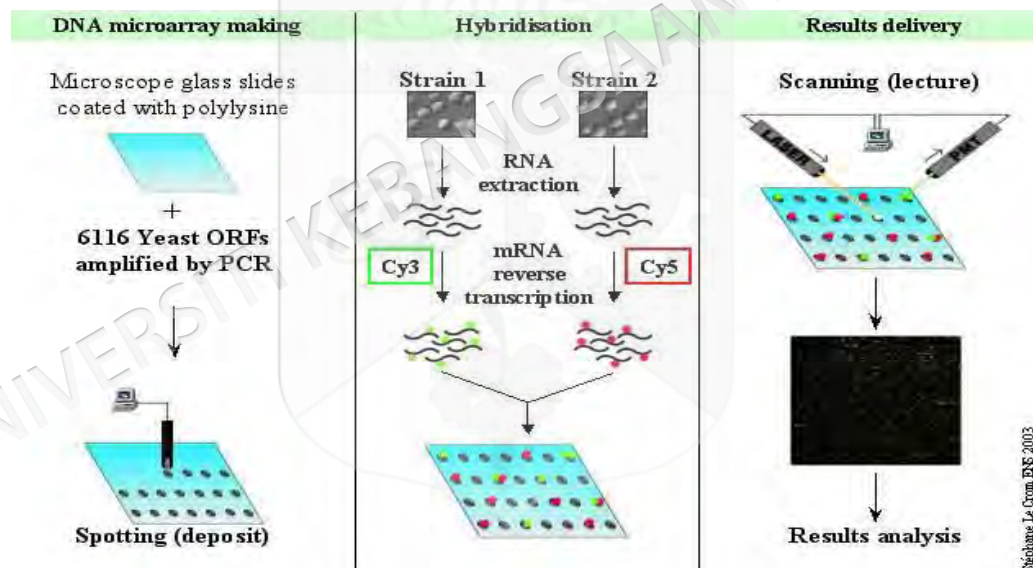
c. Peningkatan Pengekspresan Gen

Jujukan RNA (siRNA dan miRNA) yang berkomplimen dengan sebahagian promoter boleh meningkatkan transkripsi gen dan fenomena ini digelar pengaktifan RNA. Sebahagian daripada mekanisme bagaimana peningkatan pengekspresan RNA diketahui adalah dengan penggunaan enzim dicer argonaute bagi merangsangkan proses dimetilasi histone (Okamura et al. 2004). miRNA telah juga dihipotesiskan sebagai peningkat pengekspresan gen sasaran yang menyebabkan kitaran sel tidak terkawal (Bagasra & Prilliman 2004; Bernstein et al. 2001; Siomi et al. 2009).

2.7 MIKROATUR DNA

Mikroatur DNA atau juga dikenali sebagai gen cip, cip DNA, atau biochip adalah koleksi DNA mikroskopik yang dilampirkan pada permukaan pepejal. Para saintis menggunakan mikroatur DNA untuk mengukur tahap pengekspresan gen secara besar-besaran dan serentak atau pengukuran genotip pelbagai kawasan genom (Moran et al. 2004). Setiap spot DNA mengandungi pikomolar (10^{-12} molar) jujukan DNA yang spesifik, yang dikenali sebagai prob. Ini boleh merupakan sebahagian kecil gen yang pendek atau lain-lain unsur DNA yang digunakan untuk hibridisasi cDNA atau sampel cRNA (yang dikenali sebagai sasaran) di bawah keadaan ketepatan yang tinggi (Pease et al. 1994). Hibridisasi prob-sasaran biasanya dikesan dan diukur dengan pengesanan fluorofor, perak atau pendarcahaya kimia yang telah dilabel untuk menentukan jumlah kuantiti secara relatif jujukan asid nukleik di dalam sasaran. Oleh kerana cip mikroatur DNA boleh mengandungi berpuluh ribu prob, ujian mikroatur DNA membolehkan sejumlah ujian genetik dicapai secara serentak. Oleh itu mikroatur DNA telah secara dramatik mempercepatkan banyak jenis ujian DNA (Pollack et al. 1999; Schena et al. 1995).

Dalam mikroatur DNA piawai, prob yang disintesis dilekatkan melalui kejuruteraan permukaan ke permukaan pepejal oleh ikatan kovalen matriks kimia (melalui epoksi-silan, amino-silan, lisin poliakrilamida dan lain-lain) (Pease et al. 1994). Permukaan pepejal boleh merupakan kaca atau cip silikon, dimana mereka dikenali sebagai cip Affy apabila cip Affymetrix digunakan (Bammler et al. 2005). Pelantar mikroatur DNA yang lain seperti Illumina menggunakan manik-manik mikroskopik sebagai gantian sokongan pepejal besar. Secara alternatif, mikroatur DNA boleh dibina dengan sintesis langsung prob oligonukleotida pada permukaan pepejal (Moran et al. 2004). Mikroatur DNA adalah berbeza dari segi pengukuran DNA iaitu sama ada pengukurannya menggunakan keseluruhan DNA sebagai pengesan atau menggunakan sebahagian DNA/prob DNA sebagai pengesan (Bammler et al. 2005).



Rajah 2.7 Gambar menunjukkan aliran ujian perbezaan pengekspresan gen antara dua jenis sampel berlainan mula dari proses pembuatan DNA mikroatur, penyediaan sampel eksperimen, penghibridasi sampel kajian pada cip DNA mikroatur hingga ke proses terakhir iaitu proses penganalisan cip DNA mikroatur.

Sumber: (Petikan daripada Stephanie et al. 2003)

Mikroatur DNA boleh digunakan untuk mengukur perubahan tahap pengekspresan, mengesan polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs) atau genotip serta menunjuk balik jujukan genom mutan (Hacia et al. 1999). Mikroatur DNA juga

berbeza dari segi fabrikasi, cara operasi, ketepatan, kecekapan dan kos. Faktor-faktor tambahan perbezaan untuk ujian mikroatur DNA adalah reka bentuk kajian dan kaedah menganalisis data (Schen et al. 1995).

Teknologi mikroatur DNA adalah berkembang daripada teknik pemedapan Southern dimana fragmen DNA akan melekat pada membran substrat dan kemudian akan dikesan menggunakan prob gen (Maskos & Southern 1992). Penggunaan pertama yang dilaporkan adalah analisis 378 jujukan berlis koloni bakteria dengan setiap bakteria mempunyai jujukan yang berbeza untuk mengukur pengekspresan tisu normal dan tisu kanser (Pease et al. 1994). Penggunaannya telah diperluaskan kepada analisis lebih daripada 4000 jujukan gen manusia dengan bantuan komputer melalui pengimbasan dan pemprosesan imej untuk analisis kuantitatif jujukan dalam kanser kolon manusia dan tisu normal dan kemudian dibandingkan risiko genetik yang berbeza-beza dengan menggunakan tisu kolon (Pollack et al. 1999). Penggunaan koleksi mikroatur DNA yang berbeza digunakan untuk mengukur pengekspresan gen juga dilaporkan pada tahun 1987, dimana mikroatur DNA digunakan untuk mengenal pasti pengekspresan gen yang dikawal oleh interferon (Kulesh et al. 1987). Mikroatur DNA yang terawal adalah diperbuat dengan pengesanan cDNA di atas kertas penapis dengan menggunakan alat pengesan pin. Penggunaan mikroatur DNA kecil atau cip untuk mengukur profil pengekspresan gen pertama kali dilaporkan pada tahun 1995. Kajian tersebut berjaya melengkapkan pengekspresan genom eukariot (*Saccharomyces cerevisiae*) dan hasil kajian telah diterbitkan pada tahun 1997 (Lashkari et al. 1997).

Teras prinsip utama mikroatur DNA adalah penghibridasi dua bebenang DNA dimana bebenang kembar jujukan DNA ini terikat oleh ikatan hidrogen dari asid nukleik DNA. Semakin tinggi bilangan pasangan bes jujukan nukleik asid yang membentuk ikatan bermaksud semakin kuat ikatan bukan kovalen antara dua jujukan (Augenlicht & Kobrin 1982). Selepas pembasuhan jujukan ikatan tidak spesifik, hanya jujukan berpasangan yang berikatan kuat yang tertinggal. Jadi jujukan sasaran yang dilabelkan dengan fluoresen dan berikat dengan jujukan prob dan kekuatan isyarat adalah bergantung kepada jumlah ikatan jujukan berlabel dengan prob DNA. Kekuatan isyarat mikroatur adalah diukur dengan menggunakan

kaedah kuantifikasi relatif, iaitu perbandingan akan dilakukan antara dua sampel kajian yang mempunyai ciri-ciri yang sama tetapi keadaan ujian yang berlainan (Maskos & Southern 1992).

2.8 MIKROATUR TISU

Kebatasan utama dalam analisis tisu klinikal dari segi molekular adalah termasuk saiz sampel tisu yang kecil, prosedur yang membebankan, terhadapnya reagen diagnostik yang terhad dan mahal serta saiz sampel pesakit yang tidak mencukupi. Mikroatur tisu telah dibangunkan untuk menangani isu-isu tersebut di atas. Tisu multi-blok mula-mula diperkenalkan oleh H. Battifora pada tahun 1986 dan dipanggil multi-kanser (sosej) blok tisu dan diubahsuai pada tahun 1990 dengan penambahbaikan dan dipanggil papan pemeriksaan blok tisu (*checkboard tissue block*). Pada tahun 1998, J. Kononen dan rakan telah membangunkan teknik terkini yang menggunakan pendekatan persampelan novel untuk menghasilkan tisu yang mempunyai saiz dan bentuk yang dijadikan lebih padat dan tepat jujukannya.

Mikroatur tisu (*tissue microarray*, TMA) terdiri daripada blok parafin yang berisi sehingga 1000 teras spot tisu berasingan yang diblokkan ke atas slaid untuk membolehkan analisis multipleks histologi dilakukan. Dalam teknik mikroatur tisu, jarum yang berlubang digunakan untuk mengeluarkan tisu teras yang kecil lebih kurang 0.6 mm diameter dari kawasan terpilih pada tisu parafin seperti biopsi dan sampel tumor. Teras tisu ini kemudiannya dimasukkan ke dalam blok parafin penerima dengan jarak yang tertentu antara tisu dan disusun dengan rapi. Blok-blok ini kemudiannya akan dipotong dengan menggunakan mikrotom dan diletakkan di atas slaid mikroskop untuk analisis pewarnaan histologi dan patologi (Rajah 2.8). Setiap blok mikroatur tisu boleh menghasilkan 100 - 500 kepingan slaid, yang kemudiannya boleh digunakan untuk pelbagai jenis ujian. Ujian yang biasa digunakan dalam mikroatur tisu adalah termasuk imunohistokimia, dan in-situ hibridisasi fluoresen. Mikroatur tisu adalah amat berguna terutamanya dalam penganalisisan sampel kanser (Kononen et al. 1998; John et al. 2001).



Rajah 2.8 Gambar menunjukkan proses penyediaan, pemprosesan dan penganalisaan mikroatur tissue.

Sumber: (Petikan daripada John et al. 2001)

BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 BAHAN DAN REAGEN

3.1.1 Bahan Kimia dan Biokimia

Bahan kimia am gred bioteknologi diperolehi dari Sigma. TriReagent diperolehi daripada Molecular Research Center. Phase Lock Gel diperolehi daripada Eppendorf. Psoralen-Biotin diperolehi daripada Pierce. RNAi diperolehi daripada Dharmacon Co.

3.1.2 Enzim

Enzim Taq Polimerase dan Sensiscript *reverse transcriptase* diperolehi daripada Qiagen. Versi Taq yang digunakan adalah jenis *hotstart* automatik dimana ianya tidak aktif pada suhu bilik. Enzim Advantage 2 DNA Polymerase Mix dan *PowerScript reverse transcriptase* diperolehi daripada Clontech, Mountain View, US. Perencat ribonuklease RNasin Plus diperolehi daripada Promega. Enzim deoksiribonuklease I (DNase I) *TURBOfree* diperolehi daripada Ambion. Penanda DNA diperolehi daripada Fermentas.

3.1.3 Kit Reagen

Wizard Gel and PCR Purification System dan RNA Miniprep Kit diperolehi daripada Promega. BrightStar BioDetect Kit, ULTRAhyb hybridization buffer dan Illumina RNA Amplification Kit diperolehi daripada Ambion. SYBR Green Real-Time Mastermix diperolehi daripada BioRad. RNA Nano LabChip Reagent Kit

diperolehi daripada Agilent Technologies. Penimbal Litium-Borat (LB Medium) diperolehi daripada FasterBetterMedia.

3.1.4 Media Kultur Sel

Media RPMI 1640, Serum Fetal Lembu, antibiotik Penisilin-Streptomisin dan Phosphate-Buffered Saline diperolehi daripada Invitrogen. Flaks kultur sel diperolehi daripada BD Biosciences. Accutase diperolehi daripada Chemicon.

3.2 PROSEDUR AM

3.2.1 Pensterilan

Semua peralatan kaca dipanaskan di dalam oven pada 200°C selama sekurang-kurangnya 4 jam. Larutan untuk eksperimen diautoklaf pada 121°C selama 20 min. Bagi RNA, semua larutan (kecuali yang mengandungi Tris-HCl) dirawat dengan larutan dietilpirokarbonat 0.01% (DEPC) pada suhu bilik semalaman dan diautoklaf selama 45 min. Semua tiub yang digunakan diautoklaf sebelum digunakan.

3.2.2 Penentuan Kepekatan Asid Nukleik

Kepekatan asid nukleik ditentukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Dua jenis alat digunakan iaitu Biophotometer (Eppendorf) dan Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies). Biophotometer menggunakan kuvet tidak dikitar guna semula *Uvette* dan memerlukan minimum 50 µL larutan untuk dibaca. Nanodrop pula tidak memerlukan sebarang kuvet. Satu hingga dua µL larutan yang hendak dibaca dipipet terus ke atas permukaan khas dan prinsip tekanan permukaan digunakan untuk menentukan kepekatan asid nukleik.

3.2.3 Penentuan pH

Penentuan pH dilakukan menggunakan pH meter dimana elektrod pH dikalibrasi pada suhu bilik menggunakan standard pH 7.0 dan pH 4.0.

3.3 PENCARIAN PANGKALAN DATA ONCOMINE

Oncomine merupakan suatu pangkalan data mikroatur DNA yang boleh dicapai melalui laman sesawang <https://www.oncomine.org/resource/login.html>. Ia dibangunkan oleh sekumpulan penyelidik dari Universiti Michigan yang pada mulanya hanya mengumpul data mikroatur kumpulan kajian sendiri. Kini pangkalan data ini telah dimiliki oleh syarikat Thermo Fisher Scientific dan ia adalah semi-percuma bagi penyelidik institusi pengajian tinggi. Objektif utama pengasas pelantar pangkalan data Oncomine ini adalah untuk mempermudah penemuan pengekspresan gen novel yang menyumbang kepada karsinogenesis pelbagai jenis kanser dengan pengumpulan dan analisis data mikroatur. Sehingga November 2008, Oncomine mempunyai 450 data set pengekspresan gen yang merangkumi 58 juta pengukuran pengekspresan gen yang dihasilkan daripada 8300 kajian mikroatur.

Sebelum menggunakan pangkalan data Oncomine bagi analisis data mikroatur NSCLC, beberapa kriteria pemilihan set data mikroatur telah ditetapkan sebagai panduan pencarian. Kriteria-kriteria pemilihan adalah gen profil pengekspresan gen antara tisu paru-paru normal dan tisu-tisu NSCLC termasuk adenokarsinoma, karsinoma skuamas dan karsinoma papilari.

Setelah pemilihan set data mikroatur dilakukan, penganalisan dilakukan dengan menggunakan pendekatan yang dinyatakan di bawah:

- a. Menggunakan ciri analisis gen yang berada pada 5% teratas mengalami peningkatan pengekspresan merentangi kesemua set data mikroatur yang dipilih.
- b. Menggunakan ciri analisis gen yang terlibat dengan tapak jalan metastasis untuk 5% teratas yang mengalami peningkatan pengekspresan merentangi kesemua set data mikroatur yang dipilih.
- c. Memilih gen yang mempunyai nilai $p \leq 0.05$ muncul lebih daripada 4 kali di dalam analisa Box Plot bagi pendekatan penganalisan di atas.

3.4 PEMBINAAN TAPAK JALAN BIOLOGI MOLEKUL NSCLC

Gen-gen yang telah disenarai pendek dimasukkan ke dalam perisian komputer Pathway Studio 7.0 untuk analisis tapak jalan biologi molekul. Interaksi gen dikaji dan gen yang mempunyai interaksi yang kurang dijadikan sebagai subjek kajian. Gen yang mempunyai interaksi yang kurang juga bermakna bahawa fungsi gen itu masih tidak berapa diketahui.

3.5 PENENTUAN KUANTITI DAN KUALITI RNA

Kehadiran RNA boleh dikenalpasti melalui bacaan ketumpatan optik (OD, *optical density*) menggunakan spektrofotometer. Sejumlah 2 μL sampel RNA dimasukkan ke dalam 48 μL air tiada-nuklease menjadikan faktor pencairan sebanyak 25 kali dan campuran disebatikan sebelum dimasukkan ke dalam kuvet. Bacaan nisbah A_{260}/A_{280} menunjukkan kualiti RNA yang didapati berkualiti tinggi memberikan nilai nisbah antara 1.7 dan 2.1. Dua jenis spektrofotometer telah digunakan iaitu Biophotometer (Eppendorf) dan Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies). Nilai satu OD menunjukkan kepekatan RNA sebanyak 40 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.1 Penentuan Integriti RNA Menggunakan 2100 Bioanalyzer

Integriti RNA ditentukan dengan menggunakan alat 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Selain memungkinkan analisis RNA yang sedikit, ianya juga lebih pantas dan jitu kerana segalanya dilakukan secara automatik oleh perisian komputer. Metodologi yang digunakan adalah seperti yang disyorkan oleh pengeluar.

a. Penyediaan cip mikrofluidik

Cip mikrofluidik RNA (Caliper Technologies) dan kit RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies) digunakan untuk analisis ini. Pertamanya, gel RNA dicampur dengan pewarna yang tersedia bersama kit tersebut. Campuran tadi diempar pada 6000 g selama 20 min. Sembilan μL daripada campuran tadi dipipet ke dalam telaga cip RNA. Gel tersebut dimasukkan ke dalam terusan mikro cip tadi

melalui tekanan udara menggunakan picagari dan alat khas (stesen cip). Kemudian 5 μL penimbal dipipet ke dalam setiap 12 telaga sampel yang ada termasuk satu telaga penanda RNA. Sampel-sampel RNA yang hendak dianalisis didenaturasi dengan memanaskan tiub pada 70°C selama 2 min dan disejukkan dalam ais sehingga sedia untuk dipipet ke dalam cip. Sebanyak 1 μL sampel RNA dipipet ke dalam setiap telaga dan 1 μL (150 μg) penanda RNA (Ambion) dipipet ke dalam telaga penanda RNA di dalam cip tersebut. Sebanyak 12 sampel RNA boleh dianalisis dalam satu cip. Cip yang telah siap tadi kemudian divorteks pada 2400 rpm selama 1 min.

b. Elektroforesis cip

Cip yang telah divorteks dimasukkan ke dalam alat 2100 Bioanalyzer. Pilihan program Total RNA Nano Assay dipilih daripada senarai program yang ada dan analisis seterusnya dilakukan sepenuhnya oleh komputer. Analisis 12 sampel mengambil masa kira-kira 20 min. Perisian Bioanalyzer akan mengesan kehadiran RNA ribosomal 28S dan 18S. Nisbah luas di bawah graf kedua-dua isyarat 28S dan 18S dikira dan integriti RNA ditentukan melalui nisbah tersebut. Integriti juga boleh ditentukan dengan mata kasar dengan melihat ketajaman graf 28S dan 18S. Graf yang tidak rata menunjukkan degradasi RNA. Kehadiran puncak lebih menunjukkan kontaminasi DNA. Kuantiti RNA juga turut diberikan. Cip RNA Nano mampu mengesan kuantiti RNA dari julat 5 ng hingga 5 μg . Perisian Bioanalyzer memberikan dua output berbeza iaitu elektroferogram dan imej gel.

3.6 PENGKULTURAN TITISAN SEL

Titisan sel kanser paru-paru jenis adenokarsinoma A549 (ATCC®: CCL-185™) diperolehi daripada *American Type Culture Collection*. Titisan sel ini merupakan sel hipotriplod dengan bilangan 66 kromosom. Sel A549 mempunyai 6 penanda genetik iaitu der(6)t(1;6) (q11;q27), del(6) (p23), del(11) (q21), del(2) (q11), M4 dan M5 (Goodrum & Ornelles 1997). Titisan sel A549 dipisahkan dengan menggunakan enzim accutase (Chemicon) seperti yang disyorkan oleh pengeluar. Titisan sel diinkubasi dalam inkubator (Binder, Germany) pada 37°C dan 5% karbon

dioksida. Medium ditukar setiap tiga hari dan sel yang telah mencapai tahap 70% hingga 80% konfluen disubkultur ke dalam flas baru.

3.6.1 Pengiraan Sel

Slip penutup kaca diletakkan di atas alat Neubauer. Sebanyak 10 μL adunan rata sel dan media kultur dipipet ke tepi slip penutup. Jumlah sel di dalam keseluruhan 16 kotak segi empat dilihat dan dikira dibawah mikroskop. Jumlah keseluruhan sel (sel/mL) dikira menggunakan formula $S \times 16 \times 10^4$ (dimana S = jumlah keseluruhan sel yang dikira).

3.6.2 Penentuan Viabiliti Sel

Prinsip penggunaan pewarna tripan biru adalah sel yang hidup tidak akan terwarna oleh pewarna tripan biru (Gibco). Hanya sel-sel mati akan berwarna biru dibawah mikroskop cahaya. Penggunaan tripan biru adalah berdasarkan nisbah campuran 0.1 mL sel, 0.15 mL PBS dan 0.25 mL tripan biru. Campuran dibiarkan selama 2 min dan sel hidup yang tidak diwarnakan telah dikira.

3.6.3 Pengkulturan Sel A549

Titisan sel A549 dikultur di dalam flaks kultur 75 cm^2 yang mengandungi medium Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) daripada Gibco dengan 10% serum fetal lembu (Gibco) dan penisilin 100 unit - streptomisin 100 μg (Gibco) pada ketumpatan sel antara 2000 hingga 5000 sel per cm^2 .

3.7 PENGEKSTRAKAN ASID NUKLEIK

Pengekstrakan dan penulenan RNA serta produk PCR dilakukan dengan bantuan kit komersial dari Roche, Molecular Research Centre dan Qiagen.

3.7.1 Pengekstrakan RNA

Tiga kaedah pengekstrakan RNA digabungkan untuk mendapatkan RNA daripada sampel tisu, iaitu dengan menggunakan Phase Lock Gel (Eppendorf), TriReagent (Molecular Research Center) dan RNeasy Total RNA Miniprep Kit (Qiagen). Gabungan ketiga-tiga kaedah adalah bertujuan untuk mendapatkan hasil RNA yang lebih berkualiti. Pada peringkat pertama tisu-tisu dihomogenasi dengan 1 mL TriReagent dengan menggunakan kaca lesung. Kemudian 0.2 mL kloroform dicampurkan. Campuran dipipet berulang-ulang selama seminit dan dibiarkan pada suhu bilik selama 15 min. Tisu yang telah dihomogenasi dipindahkan ke dalam tiub pepejal Phase Lock Gel (PLG) Heavy. Tiub tersebut kemudiannya diemparkan pada kelajuan 13 000 rpm selama 10 min pada suhu 4°C. Fungsi pepejal PLG adalah untuk membentuk lapisan yang memisahkan lapisan akuas dan lapisan pertengahan campuran homogenasi. Lapisan akuas dipipet keluar dan dipindahkan ke dalam tiub 1.5 mL yang baru. Secara purata sebanyak 0.2 mL lapisan akuas diperolehi. Setelah itu etanol 70% dicampurkan pada nisbah 1:1 bersama-sama dengan lapisan akuas. Campuran dicampur secara perlahan-lahan dengan menggunakan pipet sebelum dipindahkan ke dalam tiub khas RNeasy dan diemparkan pada kelajuan 10 000 g selama 15 s. Supernatan yang diperolehi dibuang dan diikuti dengan penambahan 0.7 mL larutan penimbal RW1 ke dalam tiub khas RNeasy dan diemparkan pada kelajuan 10 000 g selama 15 s. Sekali lagi supernatan yang terhasil dibuang dan 0.5 mL larutan penimbal RPE ditambah ke dalam tiub khas RNeasy dan diemparkan pada kelajuan 10 000 g selama 15 s. Langkah penambahan larutan penimbal RPE diulang sekali lagi, tetapi kini, kelajuan emparan adalah 10 000 g dan selama 2 min. Akhir sekali RNA dikeluarkan dari tiub khas RNeasy dengan menggunakan 30 µL air suling steril dengan kelajuan emparan 10 000 g selama 1 min.

3.7.2 Isolasi Produk Amplifikasi PCR

Produk hasil amplifikasi PCR dituliskan dengan menggunakan kit *Wizard[®] SV Miniprep Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Protokol yang digunakan adalah sebagaimana yang dicadangkan pengeluar.

3.8 TINDAK BALAS RANTAI POLIMERASE MASA NYATA (RT-PCR)

Keberkesanan transfeksi siRNA dan kesahihan pengukuran pengekspresan mRNA gen pada DNA cip mikro-atur ditentukan dengan menggunakan tindak balas rantai polimerase masa nyata (RT-PCR, Real-time Polymerase Chain Reaction). Selepas pengekstrakan RNA dari titisan sel A549 dilakukan dengan menggunakan Trizol (Invitrogen), sintesis bebenang tunggal cDNA dari RNA terus dilakukan. Tindak balas PCR sebanyak 30 kitaran dilakukan dengan menggunakan Taq DNA Polimerase (Promega) berdasarkan protokol berikut: 95°C selama 40 s, 58°C selama 40 s dan 72°C selama 40 s.

Pengekspresan gen yang diukur menggunakan RT-PCR dikira dengan menggunakan formula pengiraan seperti yang dinyatakan di bawah:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct(\text{Sampel A} - \text{Sampel rawatan}) - Ct(\text{Sampel rujukan} - \text{Sampel rawatan}) \\ \Delta Ct &= Ct(\text{Sampel A} - \text{Sampel kawalan}) - Ct(\text{Sampel rujukan} - \text{Sampel kawalan}) \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct(\text{Sampel rawatan}) - Ct(\text{Sampel kawalan})\end{aligned}$$

3.9 ASAI FUNGSI SEL

Asai sel merupakan suatu kaedah analisis dalam kajian perubatan makmal, farmakologi, biologi peskitaran dan biologi molekul untuk menilai secara kualitatif atau kuantitatif kehadiran sesuatu aktiviti biologi. Sasaran sampel analisis berkemungkinan merupakan ubat, bahan biokimia atau sel dalam organisma. Asai sel pada kebiasaannya adalah bertujuan untuk mengukur kandungan dan pengekspresan protein ukuran di dalam sel dalam keadaan in vitro dengan peskitaran kajian yang dikawal.

3.9.1 Asai Proliferasi Sel

Asai proliferasi sel CellTiter-Glo dari promega merupakan suatu asai yang digunakan untuk mengukur viabiliti sel melalui kaedah pengkuantifikasian kandungan ATP pada kultur sel. Reagen CellTiter-Glo dibiarkan pada suhu bilik

selama 3 jam agar suhu reagen adalah selaras dengan suhu plat. Plat bertelaga 96 yang mengandungi kultur titisan sel A549 dikeluarkan dari inkubator dan dibiarkan suhu plat menurun ke suhu bilik. Ketidaksamaan suhu plat dan reagen akan menyebabkan keputusan yang diperolehi berubah dengan ketara antara replikasi kajian. Sebanyak 100 μ L reagen CellTiter-Glo ditambahkan ke dalam setiap telaga. Plat ditutup dan diletakkan pada pengembar orbital untuk percampuran reagen dengan medium kultur yang mempunyai sel selama 2 min pada kelajuan 400 rpm. Tujuan pengemparan tersebut adalah untuk melisis sel. Selepas itu, plat diletakkan pada suhu bilik selama 45 min sebelum diletakkan dalam mesin luminometer untuk dicerap pada gelombang cahaya 450 nm.

3.9.2 Asai Apoptosis

Caspase-Glo 3/7 (Promega) telah digunakan untuk kajian apoptosis sel. Reagen Caspase-Glo 3/7 dibiarkan pada suhu bilik selama 3 jam. Plat bertelaga 96 yang mengandungi kultur titisan sel A549 dikeluarkan daripada inkubator dan suhu plat dibiarkan menurun ke suhu bilik. Sebanyak 100 μ L reagent Caspase-Glo 3/7 ditambah ke dalam setiap telaga termasuk telaga kawalan positif dan negatif. Plat ditutup dan diletakkan pada pengembar orbital untuk mencampurkan campuran reagen dengan medium kultur yang mempunyai sel selama 45 min pada kelajuan 400 rpm. Selepas itu, plat diletakkan pada mesin luminometer untuk dicerap keputusan asai apoptosis pada gelombang cahaya 450 nm.

3.9.3 Asai Migrasi

Asai migrasi CHEMICON QCM™ (ECM551) dalam plat bertelaga 24 dan berasaskan kolagen telah digunakan untuk menguji tahap invasi titisan sel A549 selepas penindasan (*silencing*) gen dilakukan. Titisan sel A549 yang telah dikultur dan mencapai konfluen 80% dikeluarkan medium dan dimasukkan medium kultur yang tidak mempunyai serum dengan tujuan mewujudkan suatu keadaan sekeliling sel yang tertekan dan terdesak untuk keperluan serum bagi pertumbuhan sel. Sel yang hanya berbekalkan medium kultur tanpa serum dieramkan selama 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan CO₂ 5%. Selepas itu, medium dikeluarkan dan dicuci

sebanyak dua kali dengan menggunakan PBS sebelum penambahan tripsin bagi mengeluarkan sel daripada kultur flaks. Titisan sel A549 yang telah dikeluarkan diemparkan pada kelajuan 1500 RPM selama 5 min bagi pengasingan sel daripada larutan penimbal dan tripsin. Pelet sel dibancuhkan dengan pipet beberapa kali bersama-sama dengan medium kultur tanpa serum. Jumlah kandungan sel dikira dan diampai dalam 1.0×10^5 sel per mL. Plat dan reagen asai migrasi dikeluarkan dan dibiarkan seketika bagi menyelaraskan suhu bilik agar keputusan optimum diperolehi. Sebanyak 300 μ L media tanpa serum diletakkan dalam telaga selama 15 min bagi membolehkan kolagen di dalam telaga terhidrat semula. Selepas proses hidrasi, 250 μ L medium dikeluarkan dan digantikan dengan 250 μ L larutan medium yang mengandungi sel A549 sebelum ditambah dengan 500 μ L kultur media yang mengandungi serum di bahagian ruang bawah kolagen setiap telaga. Akhirnya plat ditutup dan dieram selama 72 jam pada suhu 37°C dan berbekalkan 5% CO₂. Selepas pengeraman 72 jam, bekas di atas telaga dikeluarkan dan dicelupkan di dalam telaga baru yang mempunyai pewarna sel selama 20 min. Kemudian bekas dikeluarkan dan dikeringkan bahagian dalamnya dengan kapas dan dibiarkan kering pada suhu bilik. Setelah dikeringkan, bekas dipindahkan ke telaga baru yang mengandungi 200 μ L larutan penimbal pengekstrakan untuk pengeraman selama 15 min pada suhu bilik. Akhir sekali, sebanyak 100 μ L larutan tersebut dipindahkan ke plat baru untuk bacaan kolometrik pada gelombang cahaya 560 nm.

3.9.4 Tindak Balas Dos Kemoterapi

Titisan sel A549 didedahkan kepada cisplatin, etoposide, vinorelbine dan siRNA dengan kepekataannya ditingkatkan secara berperingkat iaitu daripada 0.25 μ M ke 2 μ M. Viabiliti sel A549 diukur selepas tiga hari pendedahan dengan menggunakan asai CellTiter-Glo (Promega).

3.10 MIKROATUR DNA

RNA yang telah diekstrak digunakan untuk menyediakan RNA komplementari terlabel biotin dengan menggunakan kit *Illumina RNA Amplification System* (Nombor Katalog: I1755). Metodologi adalah seperti yang disyorkan oleh pengeluar

(Ambion). Eksperimen ini menggunakan cip *Whole Human BeadChip* daripada *Illumina* yang membolehkan keseluruhan 48000 gen manusia dianalisis bagi setiap sampel.

3.10.1 Transkripsi Berbalik

Untuk menyediakan kompleks RNA komplementari (*complementary RNA*, cRNA) bagi setiap sampel, kit *Illumina RNA Amplification Kit* telah digunakan [Nombor Katalog: 1755 (Ambion)].

a. Sintesis Bebenang DNA Komplementari

Proses ini adalah untuk menyediakan bebenang pertama cDNA dengan oligo-dT berekor yang membawa jujukan promotor T7 pada struktur 5'. Sebanyak 500 ng populasi RNA dicampur dengan air bebas nuklease sehingga 11 μL di dalam tiub mikro 0.5 mL steril. Campuran utama (*master mix*) transkripsi berbalik disediakan dengan pipet dan disebatikan komponen-komponen berikut bagi setiap sampel: 1.0 μL pencetus oligo-dT T7, 2.0 μL penimbal bebenang pertama 10X, 4.0 μL campuran dNTP, 1.0 μL perencatan RNase dan 1.0 μL enzim ArrayScript. Campuran dicampurkan secara perlahan-lahan dengan menggunakan vortex dan selepas itu diemparkan dengan seketika. Campuran kemudian dipipetkan ke dalam setiap sampel RNA untuk menjadikan isipadu akhir setiap tindak balas sebanyak 20 μL . Tiub kemudian dieram pada 42°C selama 2 jam di dalam inkubator. Selepas tindak balas selesai tiub diletakkan di dalam ais.

b. Sintesis Bebenang DNA Komplementari 2

Campuran utama bebenang kedua disediakan dengan pipet reagen berikut bagi setiap sampel: 63 μL air bebas-nuklease, 10 μL penimbal bebenang kedua (10X), 4 μL campuran dNTP, 2 μL DNA polimerase dan 1 μL RNase H. Campuran disebatikan dengan menggunakan vorteks pada kelajuan rendah. Selepas tiub diemparkan sementara untuk mengumpul campuran reagen, 80 μL dipipet ke dalam tiub campuran tindak balas bebenang pertama di atas, dipipet 2 – 3 kali dan diemparkan

seketika. Tiub diinkubasikan pada 16°C menggunakan blok mesin PCR selama 2 jam. Selepas tindak balas selesai, tiub diletakkan di dalam ais atau disimpan pada -20°C.

c. Penulenan cDNA

Setiap tiub tindak balas di atas dicampurkan dengan 250 µl penimbal perlekatan cDNA dan dipipet beberapa kali untuk mensebatikan campuran. Tiub diempar seketika dan keseluruhan campuran dipipet ke dalam kartrij penapis cDNA dan diempar pada 10 000 g selama 1 min. Kemudian 500 µl penimbal bilasan dipipet ke dalam kartrij dan diempar selama 1 min pada 10 000 g. Untuk mengeringkan membran, kartrij diempar lagi selama 2 min pada 10 000 g. Kemudian kartrij dipindahkan ke dalam tiub elusi cDNA. Sepuluh µl air bebas-nuklease yang telah dipanaskan pada 50-55°C dipipet di tengah membran di dalam kartrij dan dibiarkan pada suhu bilik selama 2 min sebelum tiub diempar pada 10 000 g selama 90 saat. Proses ini diulangi menggunakan 10 µl air bebas-nuklease lagi. Hasil elusi adalah kira-kira 16 µl dan molekul-molekul cDNA ini digunakan terus atau disimpan pada -20°C.

d. Sintesis cRNA Secara Transkripsi In Vitro

Bebenang DNA gandadua yang disintesiskan sebelumnya dikeringkan menggunakan pengering vakum SpeedVac (Termo Electron) menggunakan haba medium (~ 40 – 50°C) selama kira-kira 15 hingga 20 min. Tiub kemudian disimpan di dalam ais. Campuran utama tindak balas transkripsi in vitro disediakan dengan mencampur reagen berikut dimana setiap sampel mengandungi: 3.75 µl biotin-16-UTP (10 mM), 1 µl larutan T7 ATP (75 mM), 1 µl larutan T7 CTP (75 mM), 1 µl larutan T7 GTP (75 mM), 0.5 µl larutan T7 UTP (75 mM), 1 µl penimbal tindak balas (10X), 1 µl campuran enzim T7 dan 0.75 µl air bebas-nuklease. Campuran disebatikan dengan divorteks dan diempar. Sepuluh µl daripada campuran dipipet ke dalam setiap tiub cDNA dan dipipet perlahan-lahan untuk meresuspensikan cDNA yang dikeringkan tadi. Tiub diempar seketika untuk mengumpul tindak balas dan tiub diinkubasi pada 37°C selama 14 jam di dalam inkubator. Selepas inkubasi, 90 µl air bebas nuklease

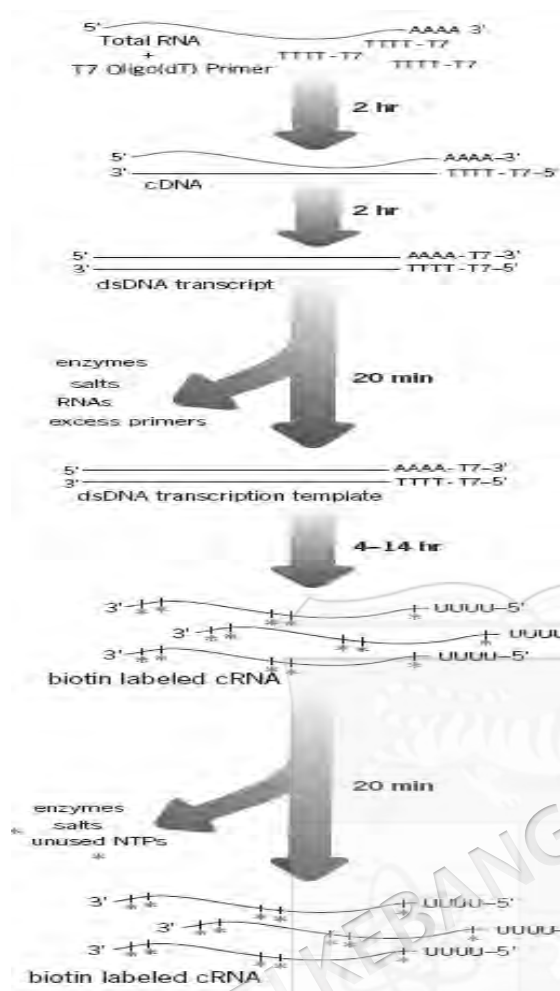
dipipet ke dalam setiap tiub dan disebatikan dengan memvorteks perlahan. Tiub terus digunakan untuk langkah seterusnya atau disimpan pada -20°C .

e. Penulenan RNA Komplementari

Sebanyak 350 μl penimbal perlekatan cRNA dicampurkan dengan setiap tindak balas di atas diikuti dengan 250 μl etanol (100%). Campuran disebatikan dengan mempipet perlahan-lahan beberapa kali. Serta-merta campuran dipindahkan dengan pipet ke dalam kartrij penapis cRNA. Tiub diempar pada 10 000 g selama 1 min. Kemudian 650 μl penimbal bilasan dipipet ke dalam setiap kartrij dan diempar pada 10 000 g selama 1 min. Membran dikeringkan dengan mengempar semula tiub pada kelajuan sama selama 1 min. Untuk elusi cRNA, 100 μl air bebas-nuklease yang telah dipanaskan pada $50 - 60^{\circ}\text{C}$ dipipet ditengah-tengah membran kartrij. Tiub dibiarkan selama 2 min pada suhu bilik dan kemudiannya diempar pada 10 000 g selama 90 s. RNA komplementari yang dielut keluar disimpan pada -80°C sehingga digunakan.

f. Penentuan Kuantiti Dan Kualiti cRNA

Kuantiti cRNA yang diperolehi ditentukan menggunakan Nanodrop ND-100. Taburan saiz cRNA bagi setiap sampel ditentukan menggunakan cip RNA Nano dan reagen yang sama. Untuk analisis, program mRNA *smear analysis* dipilih daripada senarai program-program Bioanalyzer.



Sintesis bebenang pertama cDNA melalui transkripsi berbalik menggunakan pencetus oligo-dT – T7

Sintesis bebenang kedua cDNA

Penulenan bebenang cDNA ganda dua menggunakan kolom emparan

Transkripsi in vitro untuk sintesis cRNA. Tindakbalas dimangkinkan oleh RNA polimerase T7. Biotin-16-UTP digunakan untuk melabel cRNA

cRNA ditulenan menggunakan kolom emparan

cRNA terlabel biotin yang sedia digunakan untuk hibridisasi pada cip.

Rajah 3.1 Illustrasi kaedah penyediaan cRNA menggunakan Illumina RNA Amplification Kit (Ambion).

Sumber: Ubahsuaian Daripada Ambion. (2005).

3.10.2 Mikroatur

Sebanyak 1.5 µg cRNA digunakan untuk hibridisasi dengan cip mikroatur Illumina *Whole Genome Human Array*. Setiap sampel cRNA dilarutkan dengan 20 µl air bebas nuklease. Campuran hibridisasi disediakan dengan mencampurkan 165 µl penimbal Hyb E1 dengan 99 µl formamida. Penimbal Hyb E1 dibekalkan oleh pengeluar bersama cip mikroatur. Campuran Hyb E1 dan formamida kini dikenali sebagai campuran hibridisasi. Empat puluh µl campuran hibridisasi kemudiannya dicampurkan dengan cRNA tadi untuk menjadikan keseluruhan campuran sebanyak

60 µl. Setiap sampel kemudian dipipet ke atas cip mikroatur menggunakan alat dan prosedur khas seperti yang disyorkan oleh pengeluar. Proses hibridisasi dilakukan pada 55°C selama 16 jam menggunakan oven hibridisasi (Illumina).

Selepas hibridisasi, cip diproses dengan diagitisikan dengan reagen khas untuk menyingkirkan cRNA yang tidak bertindak balas dan untuk mengurangkan latar belakang. Reagen basuhan disediakan dengan mencampurkan 2.25 ml larutan basuhan E1BC (dibekalkan oleh pengeluar) dengan 750 ml air bebas-nuklease. Cip mikroatur dibasuh dengan 250 ml larutan E1BC (Illumina) dengan merendam cip tersebut dan dikocak menggunakan penggoncang orbital selama 15 min. Cip kemudian dipindahkan ke dalam bekas yang mengandungi 250 ml 100% etanol dan diagitasi selama 10 min. Larutan baru E1BC disediakan dan cip dipindahkan serta dikocak semula di dalam larutan ini selama 2 min. Selepas dibasuh, cip akan dirawat dengan reagen pemblokkan (*blocking reagent*) untuk mengurangkan latar belakang. Sebanyak 4 ml penimbal pemblokkan E1 dipipet ke dalam bekas khas. Cip direndam di dalam larutan ini dan digoyangkan kiri dan kanan menggunakan pelantar goyang pada kelajuan sederhana selama 10 min. Kemudian proses pengesanan dengan streptavidin-Cy3 dilakukan dengan merendam dan menggoyangkan cip tersebut dengan campuran 2 ml larutan E1 dan 2 µg streptavidin-Cy3 selama 10 min. Cip kemudian dibilas semula dengan 250 ml larutan E1BC selama 5 min dengan digoncang perlahan menggunakan pengoncang orbital. Selepas itu, cip dikeringkan dengan mengempar menggunakan adapter pada kelajuan rendah 275 g selama 4 min. Cip yang telah kering disimpan di dalam gelap atau terus diimbas. Pengimbasan cip dilakukan menggunakan alat pengimbas laser BeadArray (Illumina). Keseluruhan proses imbasan dan pengekstrakan isyarat imej adalah automatik sepenuhnya.

3.10.3 Analisis Data

Peringkat pertama analisis data mikroatur dijalankan menggunakan perisian BeadStudio (Illumina). Perisian BeadStudio melakukan dua jenis analisis data:

- 1) Analisis Gen

- Menentukan tahap isyarat ekspresi gen dan menentukan samada ekspresi gen dapat dikesan
- 2) Analisis Perbezaan
 - Menentukan samada tahap ekspresi gen berubah antara dua kumpulan eksperimen secara signifikan

Perisian ini juga boleh melakukan penvisualan data secara:

- 1) Plot serakan
- 2) Diagram analisis gugusan (dendogram)
- 3) Laporan ringkasan kawalan

Perisian BeadStudio melaporkan prestasi eksperimen berdasarkan sistem kawalan dalaman. Terdapat tujuh kategori kawalan yang digunakan merangkumi spesimen biologi yang digunakan, perlabelan sampel, hibridisasi dan generasi isyarat. Analisis lanjutan dilakukan menggunakan perisian GeneSpring 12.0

3.11 ANALISIS EKSPRESI PROTEIN

Sintesis dan kawal selia protein bergantung kepada keperluan dan fungsi protein tersebut di dalam sel. Pelan induk untuk protein yang terdapat di dalam sel adalah disimpan di dalam DNA dan diterjemahkan oleh proses transkripsi untuk menghasilkan mRNA. Mesej yang dikodkan oleh mRNA kemudiannya diterjemahkan ke dalam protein. Transkripsi adalah pemindahan maklumat dari DNA untuk mRNA dan terjemahan adalah sintesis protein berdasarkan urutan yang ditetapkan oleh mRNA. Pengekspresan protein merujuk kepada cara di mana protein disintesis, diubah suai dan dikawal selia dalam organisma hidup. Di dalam kajian ini protein yang dihasilkan oleh sel dan tisu telah dikaji dengan menggunakan kaedah pemblotan western dan imunohistokimia.

3.11.1 Pemblotan Western

Ekstrakan protein dari titisan sel A549 untuk kegunaan pemblotan Western dilakukan berdasarkan protokol Abcam® tanpa sebarang perubahan. Susulan

daripada itu, kepekatan protein ditentukan dengan menggunakan *Quick Start Bradford Protein Assay* dari Biorad® berdasarkan protokol yang dinyatakan tanpa perubahan dilakukan. Kemudiannya pembloatan Western dimulakan dengan ekstrak protein titisan sel A549 diasingkan dengan menggunakan 10% SDS-PAGE dan kemudiannya dipindahkan ke membran nitroselulose. Membran ini seterusnya diblokkan dengan menggunakan 5% susu skim yang berada di dalam TBS-T (25 mM Tris, pH 7.6, 138mM NaCl dan 0.05% Tween-20) selama satu jam. Selepas itu membran ini dieram dengan antibodi primer (kepekatan 1: 1000). Ekoran daripada itu, pencucian bersiri dilakukan sebelum pendedahan antibodi sekunder (kepekatan 1:1000) dan rawatan horseradish peroxidase (HRP) dilakukan. Isyarat immuno-reaktif dikesan dengan menggunakan sistem ECL (enhanced chemiluminescent).

3.11.2 Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia dimulakan dengan pembuangan parafin pada slaid tis. Slaid tis direndam dalam 1X larutan penimbal sitrat (pH 6.0) dan dimasukkan ke dalam oven untuk dipanaskan pada suhu 125°C selama 4 min dan pada suhu 90°C selama 45 min sebelum dikeluarkan dan dibiarkan sejuk seketika pada suhu bilik. Kemudiannya Larutan 1X larutan penimbal sitrat (pH 6.0) dikeluarkan dan dimasukkan 1X larutan penimbal sitrat yang baru serta dieram dalam oven pada suhu 90°C selama 20 min sebelum dikeluarkan dan disejukkan untuk seketika. Langkah ini diulangi dengan menggantikan larutan penimbal sitrat kepada 1X larutan penimbal Tris/EDTA (pH 9.0). Seterusnya slaid dipindahkan ke dalam larutan HCl (2N pada pH 0.6 – 0.9) dan dieramkan selama 15 min pada suhu bilik. Slaid terus dipindahkan ke bekas yang berisi 0.1% tripsin setelah rawatan HCl dan diletakkan di atas alat penggoyang selama 25 min pada suhu bilik. Langkah kedua pewarnaan imunohistokimia adalah rawatan antibodi. Slaid direndamkan pada 3% H₂O₂ dan 1X larutan PBS pada suhu bilik selama 10 min dan dikeluarkan untuk dicucikan dengan air paip. Kemudiannya slaid direndam dalam larutan pemblokkan (Dako) selama 10 min sebelum dicuci dengan air paip. Antibodi primer yang telah dilarutkan pada nisbah 1:450 digunakan untuk mengeringkan slaid semalaman pada suhu 4°C dan pencucian 1X larutan PBS dilakukan selepas pengeringan. Seterusnya, antibodi

sekunder (Dako) dititiskan pada permukaan slaid yang mengandung tisu dan dieramkan selama 30 min pada suhu bilik dan dicuci dengan 1X larutan penimbil PBS. Langkah berikutnya adalah menitisikan substrat pada kawasan tisu dan dieramkan pada suhu bilik selama 6 min sebelum dicucikan dengan air paip. Akhir sekali, slaid diwarnakan dengan hematoxilin selama 1 min seterusnya dicucikan dengan menggunakan air paip dan dibiarkan terhidrat pada suhu bilik sebelum ditutupkan bahagian slaid bertisu dengan penutup kaca slaid.

3.12 INTERFEREN RNA SECARA IN VITRO DAN IN VIVO

Seperti dinyatakan pada bab kedua, teknik gangguan RNA adalah satu kaedah perencatan-gen pasca transkripsi dimana kehadiran bebenang RNA dupleks yang spesifik pada pencetus RNA di dalam sel akan menyebabkan degradasi pencetus RNA tersebut. Fenomena gangguan RNA pertama kali dilaporkan oleh Napoli dan Jorgensen pada tahun 1990, dimana fenomena ini pada mulanya diperhatikan berlaku pada bunga petunia (Nykanen et al. 2001; Schwarz et al. 2002).

Eksperimen RNAi adalah menggunakan RNA dupleks kecil bersaiz antara 12 hingga 21 pasangan bes untuk melakukan gangguan RNA. RNA dupleks kecil ini dipanggil RNA pengganggu kecil ataupun *small interfering RNA* (siRNA). Terdapat beberapa kaedah untuk menjana siRNA. Cara termudah ialah dengan menggunakan kaedah sintesis kimia untuk menghasilkan dua RNA komplementari dan hibridisasi menggunakan reagen yang sesuai (Elbashir et al. 2001; Schomber et al. 2004; Shen & Reske 2004). Kelemahan ketara kaedah ini ialah kos sintesis yang tinggi dan kepekatan siRNA yang tinggi diperlukan untuk mendapatkan kesan perencatan yang optimum. Kaedah kedua adalah melibatkan sintesis siRNA menggunakan teknik transkripsi in vitro. Cara ini lebih murah dan memerlukan jumlah siRNA yang lebih rendah untuk merencatkan aktiviti gen yang dikehendaki (Donze & Picard et al. 2002; Sohail et al. 2003; Sui et al. 2002). Kedua-dua kaedah yang disebutkan ini masih memerlukan 2 hingga 4 pasangan siRNA berlainan disintesis dan digunakan secara serentak untuk mendapatkan kesan perencatan maksimum. Kaedah ketiga melibatkan penghasilan koktail siRNA merangkumi kawasan sasaran yang lebih besar (Yang et al. 2002; Calegari et al. 2002). Ia melibatkan kombinasi PCR dan

transkripsi *in vitro* untuk menghasilkan bebenang RNA dupleks yang panjang (hingga beberapa ratus pasangan bes). Bebenang RNA ini kemudian dicernakan oleh enzim Ribonuklease III *E. coli* untuk menghasilkan siRNA bersaiz antara 12 hingga 14 pb.

3.12.1 Pembangunan Asai Penskrinan Dan Pengoptimuman Transfeksi siRNA Pada Sel A549

Pengoptimuman transfeksi siRNA adalah penting bagi memastikan kejayaan penindasan gen pada kajian seterusnya. Terdapat dua jenis kit pengoptimuman siRNA yang ditawarkan oleh Dharmacon, tetapi bagi kajian ini hanya siGENOME RTF Optimization kit 1 digunakan (Dharmacon™ - Reverse Transfection Optimization Plates protocol). Ini adalah kerana syarikat Dharmacon telah membuat kajian transfeksi ke atas titisan sel A549 menggunakan 4 jenis reagen transfeksi, DF1, DF2, DF3 dan DF4. Kajian yang dilakukan oleh Dharmacon telah menentukan reagen transfeksi DF1 memberi tindak balas penindasan gen yang paling optimum pada titisan sel A549. Berdasarkan keputusan kajian itu, reagen transfeksi DF1 digunakan untuk menentukan optimum transfeksi berbalik siRNA pada titisan sel A549.

Sebelum memulakan kajian pengoptimuman transfeksi siRNA, sejumlah 8×10^3 titisan sel A549 telah dikulturkan pada flaks kultur selama 4 hari dan melakukan penukaran medium kultur setiap 2 hari. Apabila sel yang dikultur telah mencapai hampir 80% memenuhi ruang kultur flaks, sel dikeluarkan dengan rawatan tripsin dan dikulturkan semula ke dalam plat siGENOME RTF Optimization kit 1 (Dharmacon) dengan jumlah titisan sel yang berlainan antara telaga berdasarkan rekaan kajian.

Setiap plat siGENOME RTF Optimization kit 1 mengandungi dua lajur telaga yang tidak mempunyai siRNA, lima lajur telaga yang mempunyai siRNA kawalan negatif (siRNA yang tidak mensasarkan gen) dan lima lajur telaga yang mempunyai siRNA kawalan positif (*GAPDH*). Langkah pertama, sebelum memulakan kajian plat siGENOME RTF Optimization kit 1 adalah DCCR dikeluarkan dan diletakkan di luar untuk memperimbangkan suhu plat dan reagen ke

suhu bilik. Sementara menunggu plat mencapai suhu bilik, plat baru yang bertelaga 96 dikeluarkan untuk kegunaan penyediaan reagen hidrasi semula siRNA yang berbentuk serbuk. Bermula dari sudut kanan bawah plat, pencairan induk dilakukan seperti mana kuantiti DCCR yang disebutkan di dalam buku protokol produk.

Jadual 3.1 Kuantiti reagen DCCR yang ditambahkan ke dalam telaga mengikut susunan

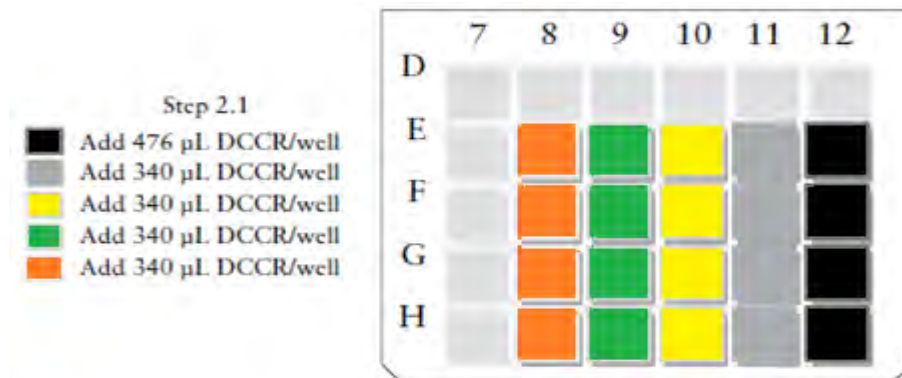
Telaga	Isipadu
E12 - H12	476
E11 - H11	340
E10 - H10	340
E9 - H9	340
E8 - H8	340

Selepas menambah reagen DCCR ke dalam telaga, sebanyak 42 μL reagen transfeksi DF1 ditambah ke dalam telaga-telaga yang berada pada baris ke-12 plat dan campuran reagen dicampurkan dengan pipet beberapa kali secara perlahan-lahan supaya gelembung udara tidak terbentuk.

Jadual 3.2 Kuantiti transfeksi reagen DF1 yang ditambahkan ke dalam telaga ke-12.

Telaga	DharmaFECT siRNA Reagen Transfeksi
E12	42 μL
F12	42 μL
G12	42 μL
H12	42 μL

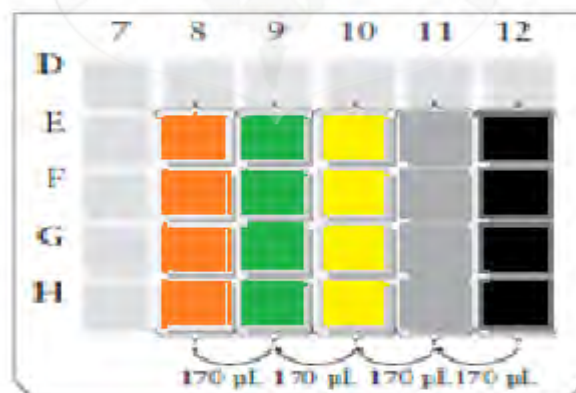
Secara amnya, langkah pertama dan langkah kedua adalah seperti pada rajah 3.2



Rajah 3.2 Gambaran percampuran reagen DCCR dan reagen transfeksi DF1 di dalam plat bertelaga 96.

Sumber: (Ubahsuaian Protokol Dharmacon siRNA, 2010)

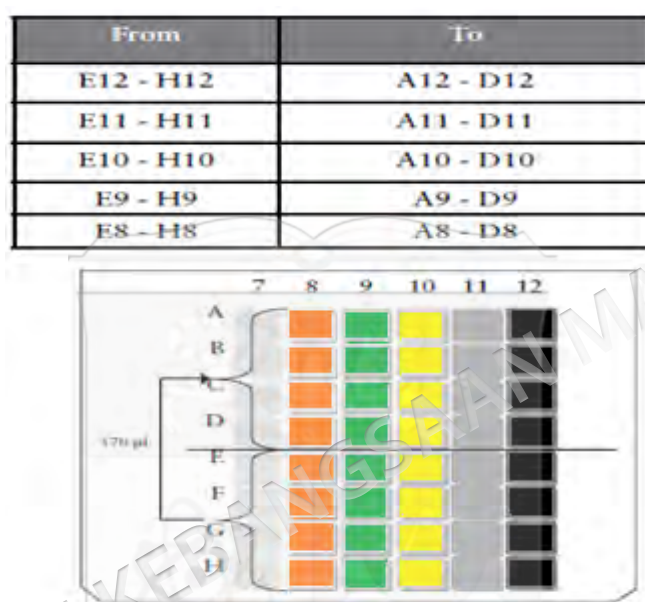
Pencarian tiga kali secara bersiri dilakukan selepas langkah 1 dan langkah 2 dengan memindahkan campuran reagen (DCCR dan DF1) sebanyak 170 μ L dari setiap telaga pada baris ke-12 ke telaga-telaga yang sepadan pada baris ke-11. Selepas itu campuran yang telah dipindahkan dicampurkan secara pipet perlahan-lahan untuk seketika. Seterusnya pencairan bersiri diteruskan dengan pemindahan 170 μ L campuran reagen dari telaga baris ke-11 lajur ke telaga-telaga yang sepadan pada baris ke-10 di dalam plat. Corak pemindahan campuran reagen diteruskan sehingga ke telaga baris ke-8 di sebelah kiri plat seperti yang ditunjukkan pada rajah 3.3.



Rajah 3.3 Corak pencairan bersiri 3 kali yang dilakukan bermula dari baris ke-12 lajur E hingga H pada plat hingga ke baris ke-8 lajur E hingga H pada plat. Setiap kali pemindahan, sebanyak 170 μ L campuran reagen dipindahkan.

Sumber: (Ubahsuaian Protokol Dharmacon siRNA, 2010)

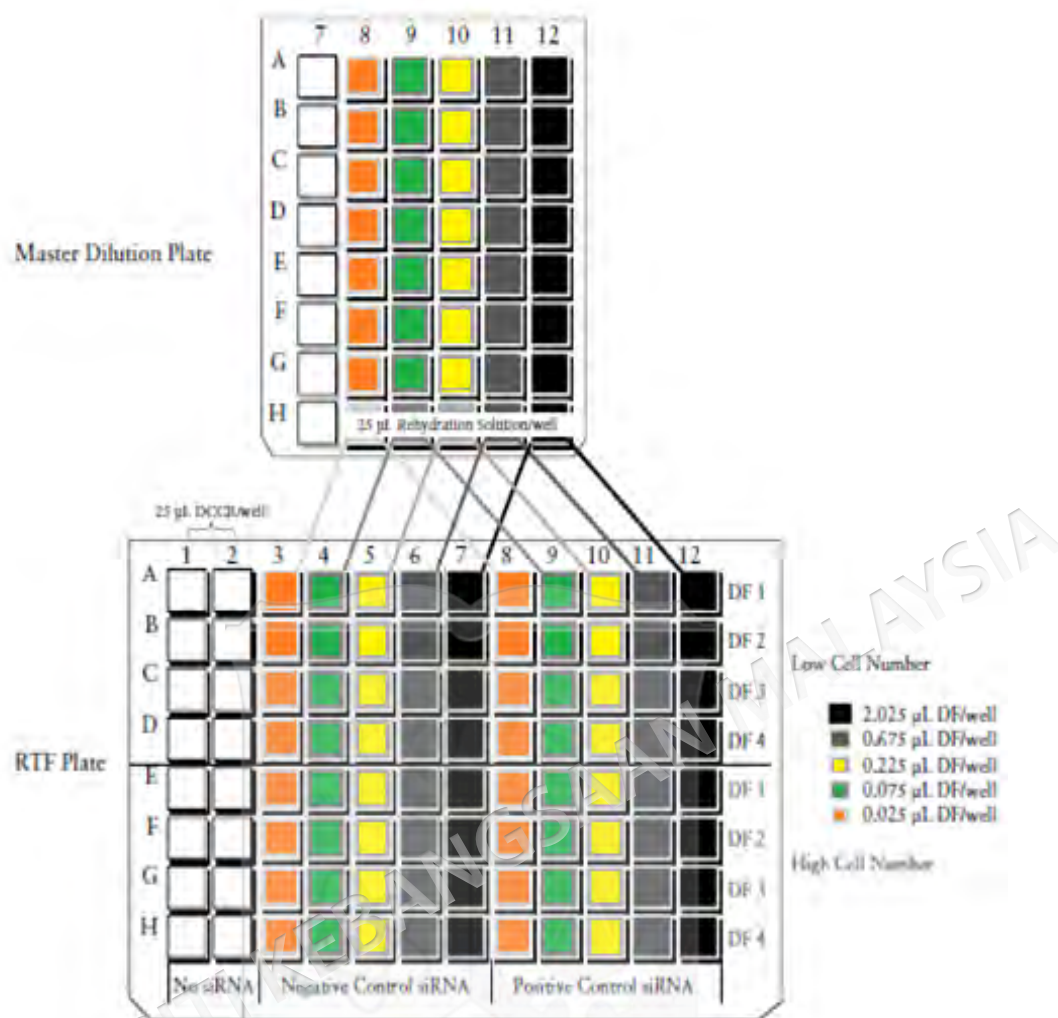
Selepas lengkapnya pemindahan reagen hidrasi dari telaga baris ke-12 hingga telaga baris ke-8 dari lajur E hingga H, kerja-kerja pemindahan reagen hidrasi diteruskan dengan pemindahan 170 μ L reagen hidrasi dari baris ke-8 hingga baris ke-12 lajur H ke lajur D baris ke-8 hingga baris ke-12. Corak pemindahan diteruskan sehingga lajur A baris ke-8 hingga baris ke-12 pada plat dipenuhi (Rajah 3.4).



Rajah 3.4 Corak pemindahan reagen hidrasi dari lajur D baris ke-8 ke baris ke-12 hingga lajur A baris ke-8 ke baris ke-12. Setiap pemindahan adalah 170 μ L reagen hidrasi.

Sumber: (Ubahsuaian Protokol Dharmacon siRNA, 2010)

Reagen hidrasi telah disediakan setelah selesai proses pemindahan ke telaga-telaga yang dinyatakan. Seterusnya, siRNA di dalam plat siGENOME RTF Optimization kit dihidratkan semula dengan menggunakan reagen hidrasi seperti yang dijelaskan di dalam rajah 3.5 di mana sebanyak 25 μ L reagent hidrasi dikeluarkan dan diletakkan ke dalam setiap telaga yang sepadan.



Rajah 3.5 Corak hidrasi plat siGENOME RTF Optimization kit dengan reagen hidrasi yang disediakan.

Sumber: (Ubahsuaian Protokol Dharmacon siRNA, 2010)

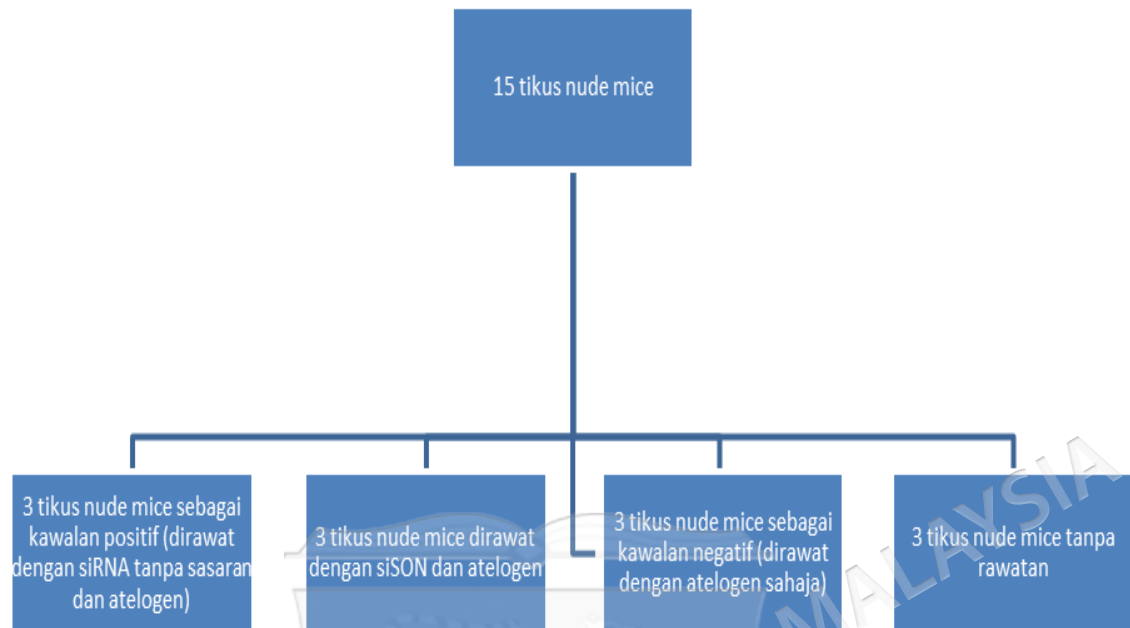
Plat siGENOME RTF Optimization kit dieram selama 20 minit pada suhu bilik untuk membenarkan reagen hidrasi berkompleks dengan siRNA. Kemudian titisan sel A549 ditambah ke dalam setiap telaga mengikut reka bentuk eksperimen. Jumlah akhir reagen (reagen hidrasi dan medium kultur) untuk setiap telaga adalah 125 μ L dan kepekatan siRNA dalam setiap telaga adalah 50 nM. Selepas itu plat siGENOME RTF Optimization kit dieram selama 48 jam di dalam pengeras pada suhu 37°C dan berbekalkan 5% CO₂. Kandungan isipadu medium kultur di dalam setiap telaga sentiasa diperiksa untuk memastikan sel mempunyai medium kultur yang mencukupi dan tidak berada dalam keadaan yang tertekan.

3.12.2 Haiwan

Tikus *nude* yang digunakan pada kajian ini diperolehi daripada syarikat BioLASCO Taiwan Co. Ltd. Taiwan. Sebanyak 15 ekor mencit telah digunakan dalam kajian in vivo. Tempat melakukan kajian in vivo ini adalah di International Islamic University Malaysia (IIUM), Kuliyah of Pharmacy, makmal asas sains perubatan. Kajian in vivo ini telah mendapat kelulusan etika daripada badan etika haiwan IIUM (IIUM/305/20/4/10).

3.12.3 Transplantasi Xenograf

Titisan sel A549 dikulturkan pada suhu 37°C dan 5% gas karbon dioksida dalam medium kultur selama 5 hari sehingga 80% ruang kultur flaks dipenuhi oleh sel kanser. Medium kultur titisan sel A549 adalah terdiri daripada 2mM L-Glutamine, 1000 U mL⁻¹ Penicilin, 10% serum fetus bovin dan medium RPMI. Sejumlah 12 ekor tikus *nude* jantan (umur purata 6 minggu, berat 22 – 24g) yang dibekalkan oleh BioLASCO Taiwan Co. Ltd. Taiwan diletakkan di dalam sangkar yang telah disteril. Tikus *nude* ini telah dipelihara dengan menggunakan makanan dan air yang telah disteril. Inokulasi tikus *nude* dengan menggunakan titisan sel A549 dimulakan dengan mengeluarkan sel A549 daripada kultur flaks, dicuci dan dibancuh semula titisan sel A549 dengan menggunakan larutan PBS 1X. Kesemua 12 mencit telah disuntik titisan sel A549 secara subkutin bersama-sama dengan 0.2 mL PBS 1X yang mengandungi 1×10^6 sel. Selepas inokulasi, tumor dibenarkan bertumbuh sehingga saiz 0.8 cm³ sebelum rawatan siRNA dimulakan.

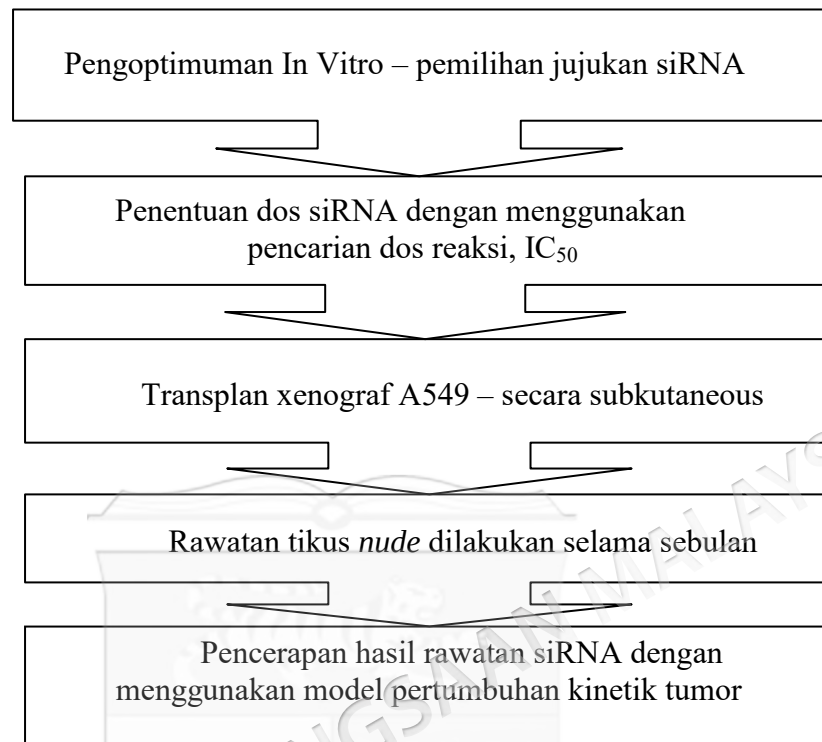


Rajah 3.6 Lima belas ekor tikus *nude* dibiarkan sesuaikan keadaan persekitaran selama seminggu sebelum melakukan transplan xenograf titisan sel A549. Transplan xenograf titisan sel A549 dilakukan secara subkutin di bawah kulit bahagian dorsal dengan 1×10^6 sel dalam $200\mu\text{L}$ larutan PBS. Tikus *nude* dibahagikan kepada empat kumpulan secara rawak dan dibiarkan tumor bertumbuh sehingga saiz 0.8cm^3 sebelum memulakan rawatan.

3.12.4 Gangguan RNA Dalam Model Tumor Xenograf

Jadual 3.3 merupakan carta aliran yang merumuskan metodologi kajian *in vivo* ini dimana langkah pertama adalah mengenalpasti jujukan siRNA yang memberikan keputusan penindasan gen yang paling optimum. Kedua adalah penentuan dos yang diperlukan untuk tujuan rawatan. Ketiga adalah proses transplan xenograf titisan sel A549. Seterusnya adalah proses rawatan tikus *nude* yang berlangsung selama sebulan dengan menggunakan siRNA yang dipilih dan dos yang telah ditentukan. Akhir sekali tikus *nude* akan dibunuh berdasarkan panduan yang diberikan oleh persatuan etik haiwan.

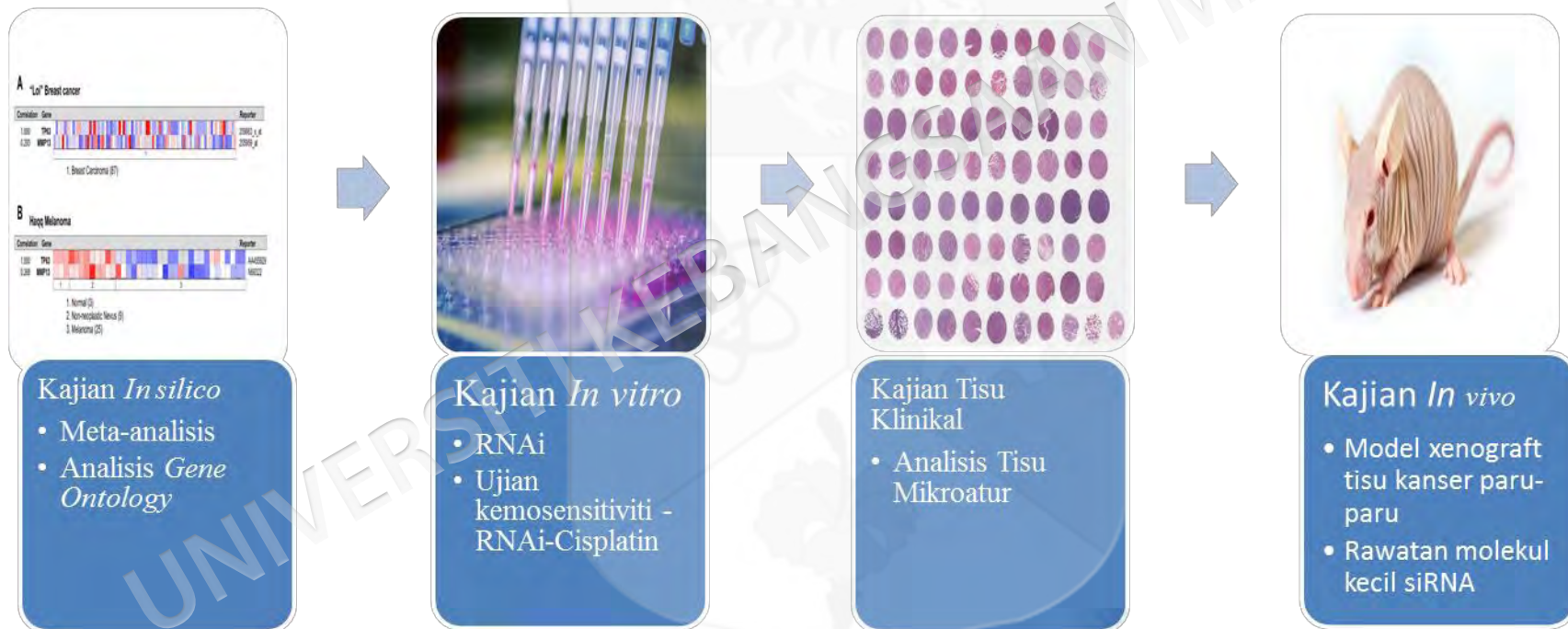
Jadual 3.3 Carta aliran metodologi kajian in vivo



3.13 Analisis Statistik

Kajian ini telah menggunakan beberapa analisis statistik seperti nilai purata dinyatakan sebagai nilai $\text{min} \pm \text{sisihan piawai}$ dan Analisis Student t-test telah digunakan untuk mengenalpasti perbezaan signifikan keputusan ujian dengan nilai $p < 0.05$ adalah dianggap sebagai signifikan. Perisian statistik yang digunakan merupakan SPSS 12.0.

Carta Aliran Projek Penyelidikan



BAB IV

KEPUTUSAN

4.1 CARIAN GEN SASARAN YANG BERPOTENSI UNTUK RAWATAN NSCLC

Secara amnya tiga pendekatan telah digunakan untuk carian gen sasaran novel bagi NSCLC – pencarian pangkalan data Oncomine, pencarian kajian perpustakaan dengan menggunakan pangkalan data NCBI dan *GeneCard* (<http://www.genecards.org/>). Ketiga-tiga pendekatan akan digabungkan dan komplementari antara satu sama lain bagi memperkayakan lagi informasi gen sasaran novel.

4.1.1 Carian Pangkalan Data Oncomine Untuk Identifikasi Gen Sasaran

Seperti yang dinyatakan dalam bab sebelum ini fungsi asas Oncomine adalah untuk mengenalpasti gen-gen novel, namun pangkalan data ini juga telah berkembang dengan mempunyai pelbagai jenis fungsi yang membolehkan analisis lanjutan dilakukan. Sebagai contohnya, set gen pada Oncomine boleh dihadkan penganalisaan kepada anotasi klinikal termasuk perembesan, kinase, membran dan sasaran pasangan gen-ubat yang telah diketahui untuk memudahkan penemuan penanda biologi yang novel dan sasaran terapeutik.

Sejumlah 56 kajian dari pangkalan data Oncomine telah dipilih untuk pencarian potensi gen sasaran terapi kanser paru-paru. Kumpulan kajian yang telah dipilih diteruskan dengan pelbagai jenis analisis lanjutan yang terdapat di dalam perisian Oncomine. Hasil analisis mendapati 235 gen dengan nilai $p \leq 0.05$ yang muncul lebih daripada empat kali. Senarai gen kemudiannya diimport ke dalam

suatu lagi perisian pangkalan data yang bernama GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) untuk analisis fungsi gen serta tapak jalan molekul gen tersebut.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) merupakan suatu perisian komputer yang boleh dicapai pada laman sesawang secara percuma. Tujuan utama penganalisan GSEA adalah untuk menyusun gen mengikut fungsi biologi dan mengenalpasti gen sasaran yang akan digunakan pada kajian seterusnya. Analisis data GSEA ditelitikan untuk mengenalpasti gen yang berekspresan tinggi. Gen-gen tersebut dimasukkan ke dalam pangkalan data GSEA untuk menyaring ke atas gen set proses biologi. Didapati, hasil saringan gen-gen, 10 gen set telah disaringkan iaitu gen set anti-apoptosis, gen set pengawalan negatif proses apoptosis, gen set pengawalan negatif program kematian sel, gen set pengawalan negatif proses pertumbuhan, gen set pengawalan proses pertumbuhan, gen set pengawalan apoptosis, gen set pengawalan program kematian sel, gen set pengawalan negatif proses selular, gen set pengawalan negatif proses biologi sel dan gen set pengawalan proses pertumbuhan (Jadual 4.1). Seterusnya, dua kriteria telah digunakan untuk memilih gen-gen yang telah disaringkan pada perisian GSEA. Antara dua kriteria tersebut adalah gen yang meningkat pengekspresan gen pada data set mikroatur dan gen yang boleh dijadikan sebagai sasaran ubat. Sebanyak 80 gen telah dikenalpasti dengan kaedah GSEA sebagai gen yang berpotensi sebagai sasaran terapi bagi NSCLC.

Jadual 4.1 Hasil saringan GSEA dengan menggunakan gen-gen yang telah disenarai pendek.

Name gen set	Penerangan	Gen yang saring dengan gen set	Nilai p	Nilai q
Anti-apoptosis	Gen-gen yang terlibat secara langsung dalam proses anti-apoptosis	20	2.39×10^{-37}	4.44×10^{-34}
Pengawalan negatif proses apoptosis	Gen-gen yang terlibat dalam mengurangkan kadar serta melambatkan proses apoptosis.	20	4.13×10^{-35}	2.94×10^{-32}
bersambung...				

...sambungan

Pengawalan negatif program kematian sel	Gen-gen yang terlibat dalam proses melambatkan, mengurangkan frekuensi program kematian sel susulan pengaktifan endogenous proses sel.	20	4.76 e^{-35}	2.94 e^{-32}
Pengawalan negatif proses pertumbuhan	Gen-gen yang terlibat dalam menghalang proses pertumbuhan bagi membolehkan spesifik proses biologi berlaku.	20	1.28 e^{-32}	5.95 e^{-30}
Pengawalan proses pertumbuhan	Gen-gen yang terlibat dalam mengawal proses pertumbuhan bagi membolehkan spesifik proses biologi berlaku.	22	5.48 e^{-29}	2.03 e^{-26}
Pertumbuhan sel	Gen-gen yang terlibat dalam mengawal proses pertumbuhan serta pembentukan struktur tisu.	23	4.59 e^{-28}	1.42 e^{-25}
Pengawalan proses apoptosis	Gen-gen yang terlibat dalam proses apoptosis sel	26	2.13 e^{-32}	5.51 e^{-29}
Pengawalan program kematian sel	Gen-gen yang terlibat dalam proses kematian sel sama ada tapak jalan intrinsik atau ekstrinsik	28	3.59 e^{-22}	2.31 e^{-28}
Pengawalan negatif proses sellular	Gen-gen yang terlibat dalam pengawalan isyarat sellular yang teraktif atau terangsang oleh proses fosforilasi yang berlaku di dalam sel.	21	1.62 e^{-28}	4.59 e^{-31}
Pengawalan negatif proses biologi sellular	Gen-gen yang terlibat dalam pengawalan proses biologi yang teraktif pengekspresan gen.	16	4.97 e^{-24}	3.44 e^{-37}

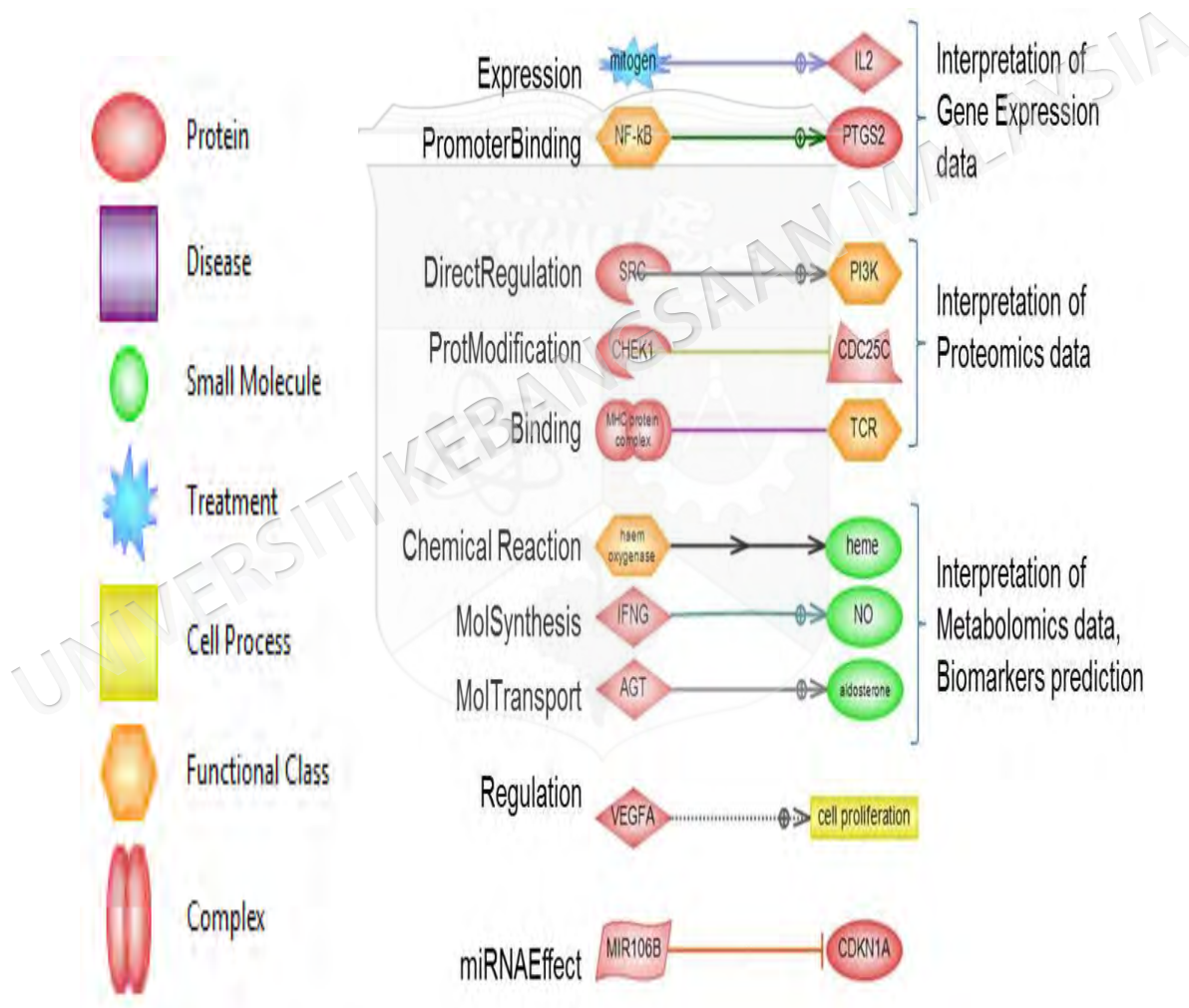
Entrez Gene Id	Gene Symbol	ANTL_APOPTOSIS	NEGATIVE_REGULATION_OF_APOPTOSIS	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	NEGATIVE_REGULATION_OF_PROGRAMMED_CELL_DEATH	Entrez Source	Gene Description
662	BNIP1									S	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
10553	HTATIP2									S	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa
332	BIRC5									S	baculoviral IAP repeat containing 5
2308	FOXO1									S	forkhead box O1
8837	CFLAR									S	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
3065	HDAC1									S	histone deacetylase 1
4170	MCL1									S	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
8539	API5									S	apoptosis inhibitor 5
8382	NME5									S	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)
6347	CCL2									S	chemokine (C-C motif) ligand 2
6422	SFRP1									S	secreted frizzled-related protein 1
9220	TIAF1									S	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1
4671	NAIP									S	NLR family, apoptosis inhibitory protein
6651	SON									S	SON DNA binding protein
9530	BAG4									S	BCL2-associated athanogene 4
8682	PEA15									S	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
8887	TAX1BP1									S	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1
8678	BECN1									S	beclin 1, autophagy related
9214	FAIM3									S	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
5055	SERPINF2									S	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
22871	NLGN1									S	neuroligin 1
55109	AGGF1									S	angiogenic factor with G patch and FHA domains 1
655	BMP7									S	bone morphogenetic protein 7

Rajah 4.1 “Heat-map” hasil saringan senarai gen yang disenarai pendek.

4.1.2 Pembinaan Tapak Jalan Biologi Molekul NSCLC

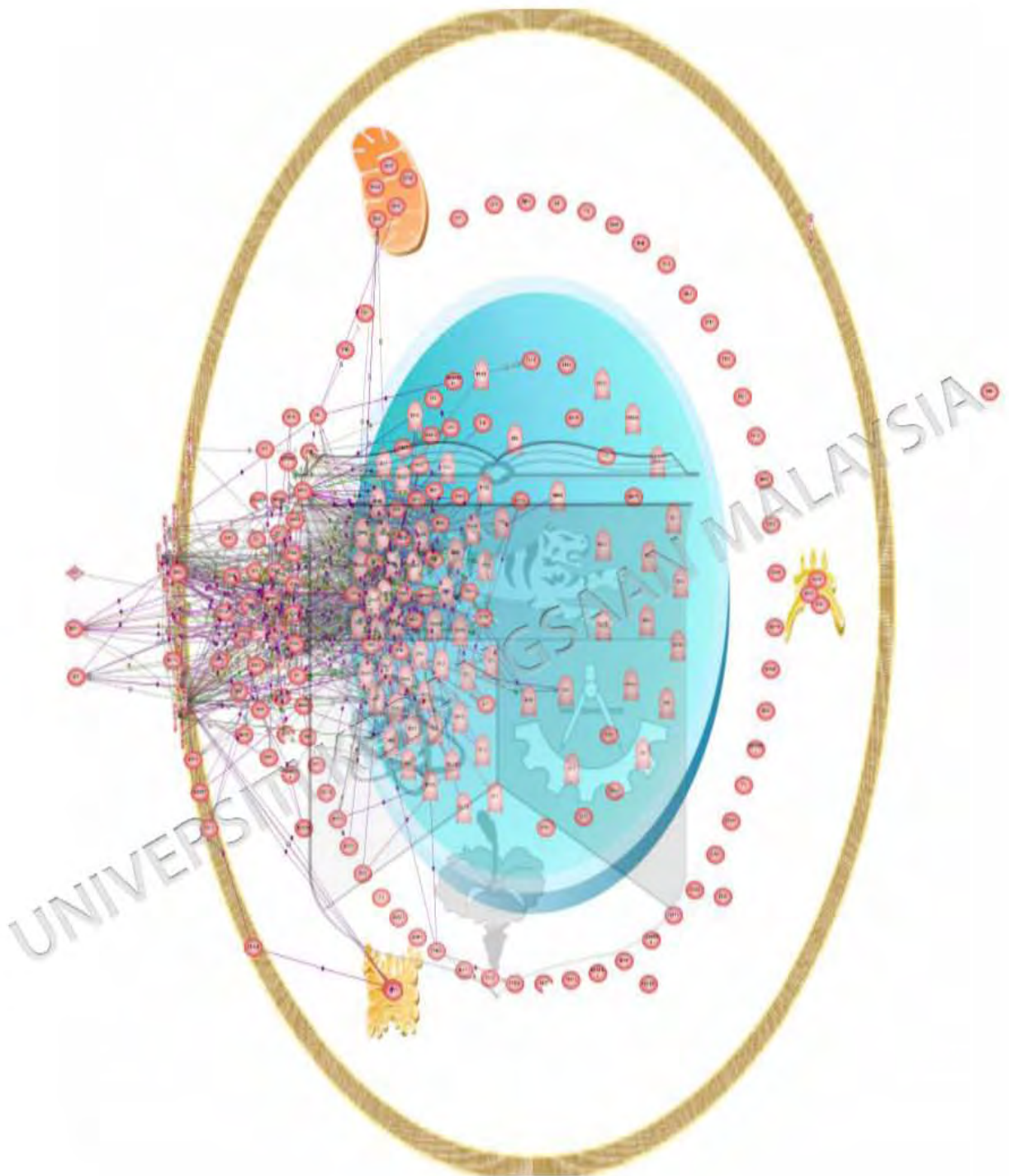
Di dalam analisis tapak jalan biologi molekul, perisian Pathway Studio 7.0 yang digunakan merupakan kombinasi pangkalan data ResNet 3.0 dan ResNet Core. Gabungan pangkalan data ini mempunyai ~ 650,000 binari hubungan yang merupakan hubungan mekanisme molekul seperti pengikatan molekul, pengikatan promoter, pengekspresan, pengawalan dan sebagainya dengan pelbagai jenis objek seperti protein, kompleks protein, molekul kecil, proses selular dan sebagainya. Semua senarai gen yang diekstrak diimport ke dalam perisian Pathway Studio 7.0 untuk analisis tapak jalan biologi molekul. Pada permulaannya, gen diimport ke dalam perisian untuk analisis tanpa memperbahagikan mengikut fungsi gen. Oleh kerana hanya nama gen sahaja dimasukkan maka pemilihan fungsi analisis *Gene and aliase* digunakan tanpa memilih jenis teknologi mikroatur.

Analisis tapak jalan biologi molekul diperincikan lagi dengan pembahagian gen mengikut fungsi biologi masing-masing. Tujuan utama analisis ini adalah untuk mengenalpasti serta memahami interaksi antara gen agar sasaran gen dapat dipilih serta dapat memberikan kesan rawatan pada kanser paru-paru. Secara keseluruhan, sebanyak empat jenis tapak jalan biologi molekul dapat diasingkan dari sejumlah 235 gen yang dianalisa. Tapak jalan tersebut adalah tapak jalan angiogenesis (Rajah 4.2), tapak jalan aktiviti telomerase (Rajah 4.3), tapak jalan anti-apoptosis (Rajah 4.4) serta tapak jalan metastasis (Rajah 4.5).

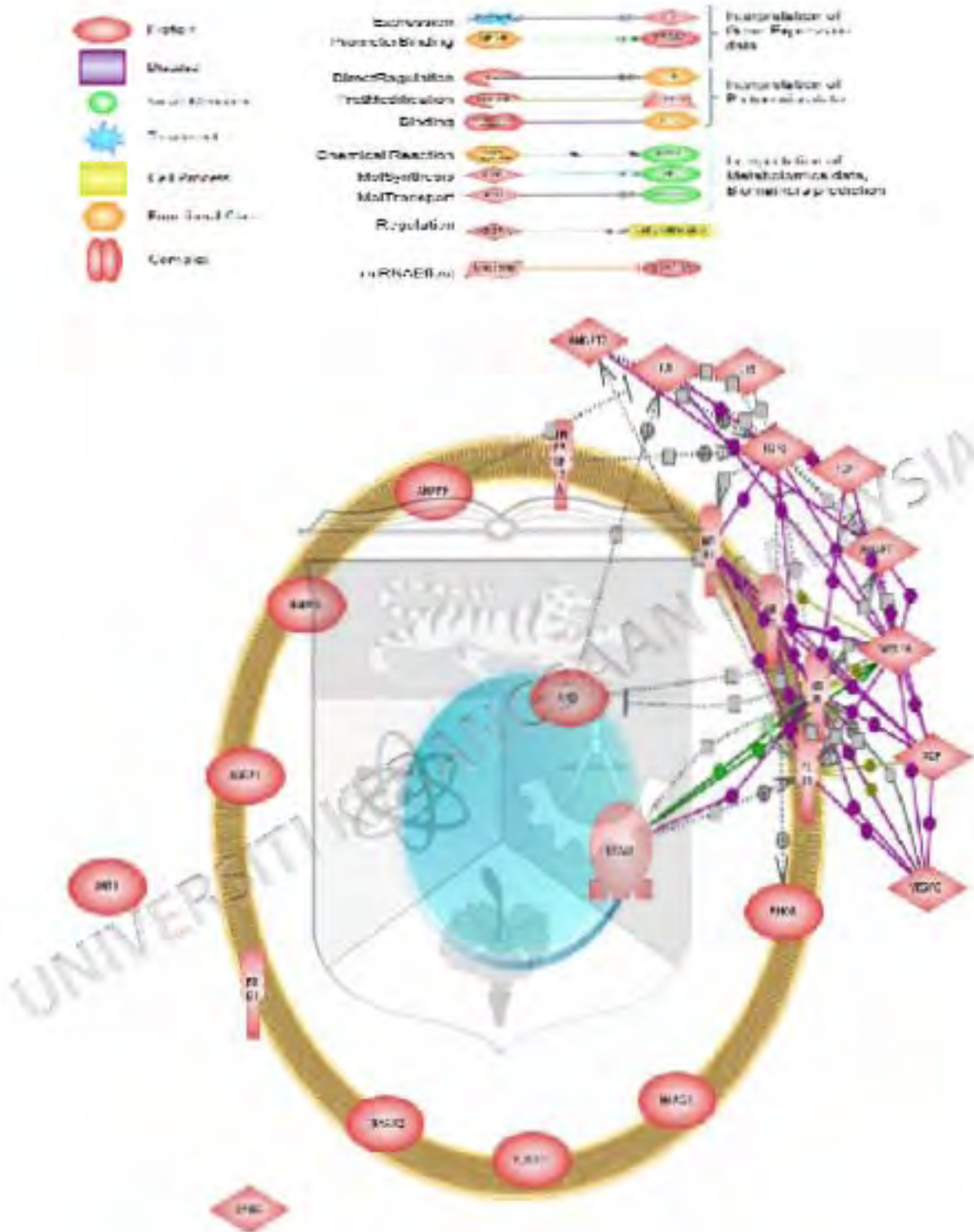


bersambung...

...sambungan

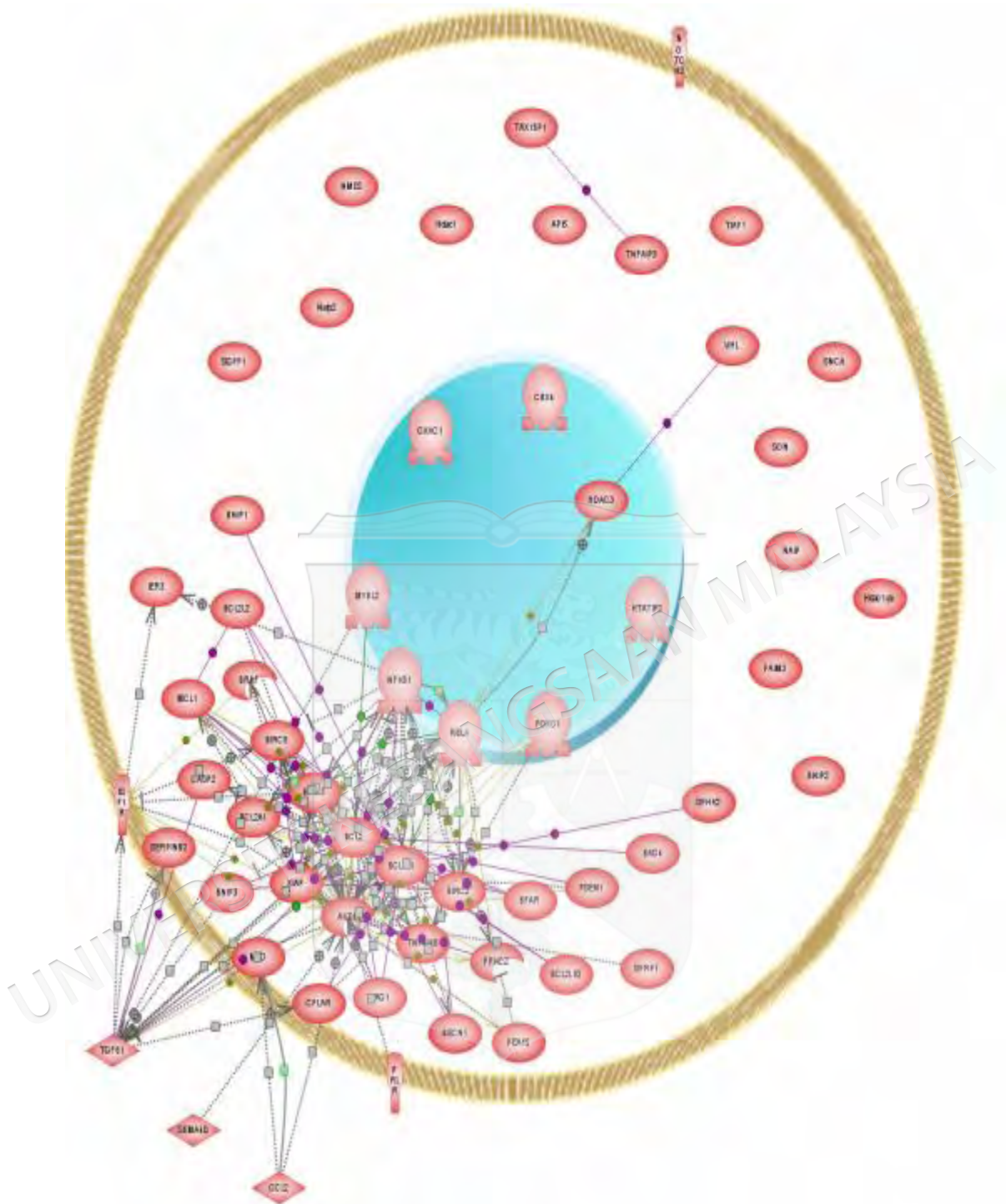


Rajah 4.2 Analisis Pathway Studio 7.0 yang memaparkan gambaran keseluruhan interaksi antara gen-gen terpilih dalam bentuk tapak jalan biologi molekul.

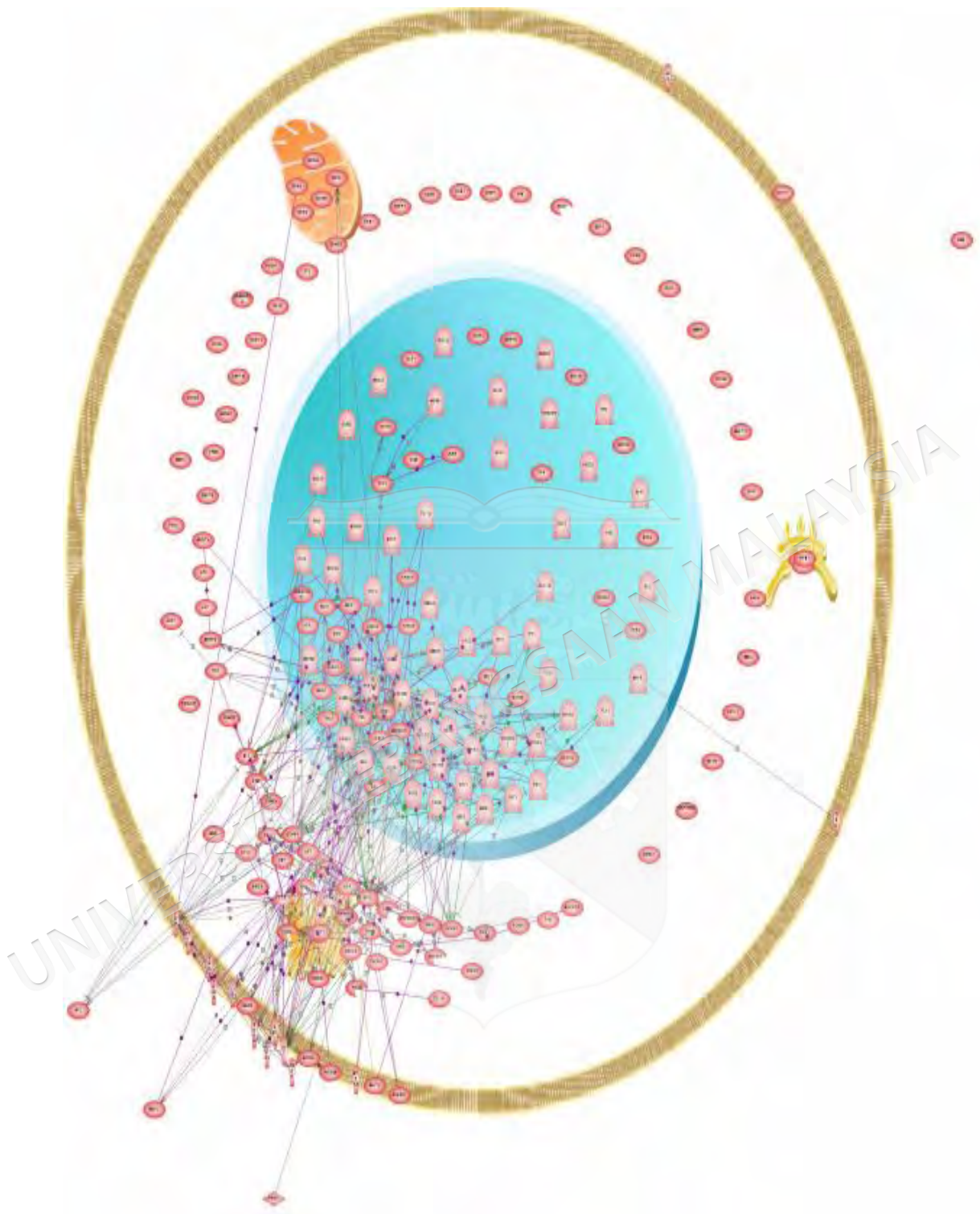


Rajah 4.3 Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan angiogenesis.

Rajah 4.4 Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam aktiviti telomerase



Rajah 4.5 Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan anti-apoptosis.



Rajah 4.6 Analisis tapak jalan biologi molekul bagi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme metastasis.

Analisis tapak jalan biologi molekul adalah bertujuan untuk mengenalpasti gen-gen pengutus yang berpotensi dalam mengawal selia tahap pengekspresan gen-

gen utama yang mempengaruhi kemandirian sel, membantut pertumbuhan sel serta mengarahkan sel melakukan proses apoptosis.

Sejumlah 80 gen telah dipilih sebagai sasaran terapi bagi kanser paru-paru (Jadual 4.2). Kebanyakan gen-gen yang dipilih adalah terlibat dalam tapak jalan anti-apoptosis (37.5%), aktiviti telomerase (23.75%), angiogenesis (21.25%) dan mekanisme metastasis (17.5%).

Jadual 4.2 Senarai gen yang dipilih untuk ujikaji sasaran terapi bagi kanser paru-paru.

Tapak jalan biologi	Gen
Angiogenesis	ANGPT2, FGF2, EPAS1, ANG, JAG1, PGF, MMP19, TNFRSF12A, PLXDC1, ANPEP, ERO1L, AGGF1, TEK1, RSPH1, LONRF1, LONP2, LRRC23
Aktiviti telomerase	HDAC1, POT1, RAD50, TEP1, RFC1, POT2, PPAR, DCHS, TMEM30B, DNHD1, DREV1, TOR1B, ADCY3, TINF2, PTGES3, BMP7, DNAH10, DYNLRB2, ATP6AP2
Metastasis	IGF2R, HSP90, PCDHB11, ANGPT2, IKBKB, NARG1, TNKS, TUBA8, DSG1, DCHS1, NLGN1, KDR, NRP1, ATP1B1
Anti-apoptotik	API5, SON, FOXO1, CFLAR, TIAF1, MYBL2, FAIM3, BIRC5, MCL1, PKD1, NRG2, FLT1, TINF, CAPS, DPP4, PEA15, SFRP1, TERF2, BNIP1, BECN1, NAIP, CCL2, PSMA6, TAX1BP1, TGFβ1, SERPINB2, BAG4, NME5, SPHK2, HTATIP2

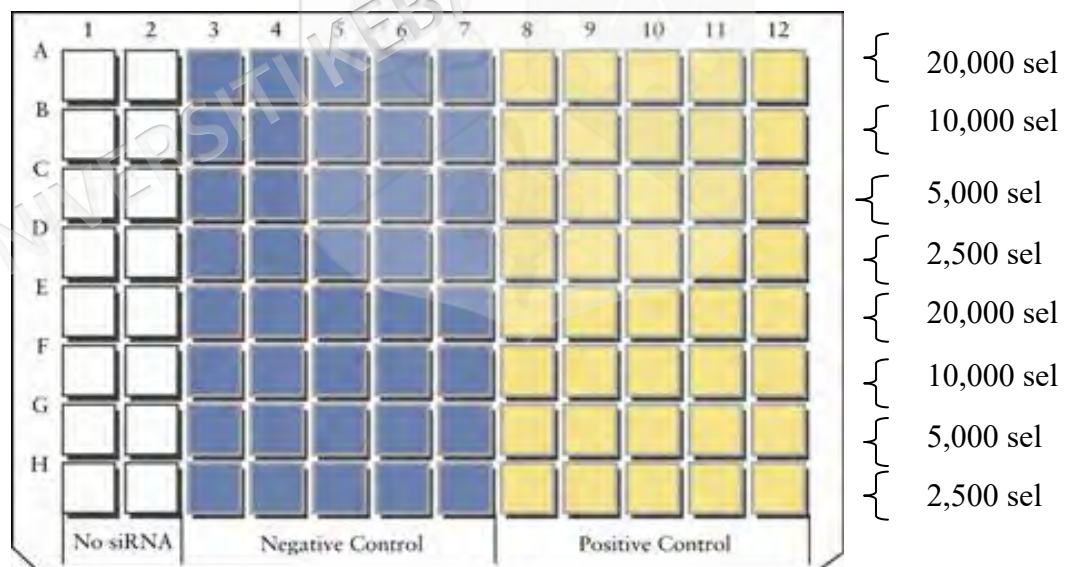
4.2 KESAN PENYENYAPAN GEN PADA VIABILITI DAN KEMOSENSITIVITI SEL A549

Dalam kajian ini, plat penskrinan *High Throughput* (HTS) telah diperolehi daripada Dharmacon Co. dengan setiap satu telaga plat mengandungi empat jujukan siRNA yang mensasarkan satu gen sasaran yang dipilih. Sebanyak 80 gen telah dipilih untuk saringan siRNA dimana empat jujukan siRNA yang mensasarkan gen sasaran telah digunakan.

4.2.1 Pembangunan Asai Penskrinan dan Pengoptimuman Transfeksi siRNA Dalam Sel A549

Seperti yang disebutkan pada bab sebelum ini, pengoptimuman tindak balas siRNA diperlukan agar keputusan yang optimum penindasan gen dapat diperolehi. Titisan sel yang berlainan memerlukan reagen transfeksi yang berlainan seperti yang dinyatakan dalam protokol Dharmacon. Reagen transfeksi DF1 telah digunakan dalam eksperimen ini. Reagen Transfeksi DF2, DF3 dan DF4 tidak digunakan kerana didapati bahawa dalam kajian siRNA transfeksi ke hadapan pada titisan sel A549, DF1 memberikan hasil penindasan gen yang paling optimum.

Plat bertelaga 96 dibahagikan kepada beberapa barisan. Setiap baris telaga telah trans-kultur dengan kuantiti titisan sel A549 yang berlainan dan kepekatan reagen transfeksi DF1 yang berlainan. Berikut adalah reka bentuk kajian pengoptimuman siRNA (Rajah 4.7). Setiap parameter eksperimen adalah diulangi sebanyak 5 kali. Setiap telaga plat pengoptimuman transfeksi siRNA mengandungi 50nM siRNA.



Rajah 4.7: Reka bentuk kajian pengoptimuman transfeksi siRNA pada plat siGENOME RTF Optimization kit.

Sumber: (Protokol Dharmacon siRNA, 2010)

Dua kawalan positif telah digunakan dalam kajian pengoptimuman siRNA ini iaitu titisan sel A549 tanpa sebarang siRNA dan titisan sel A549 yang dikulturkan bersama siRNA tanpa sasaran (siRNA yang tidak mensasarkan sebarang gen) (Rajah 4.8). Manakala siRNA ujian merupakan siGAPDH, iaitu siRNA yang mensasarkan gen *GAPDH*.

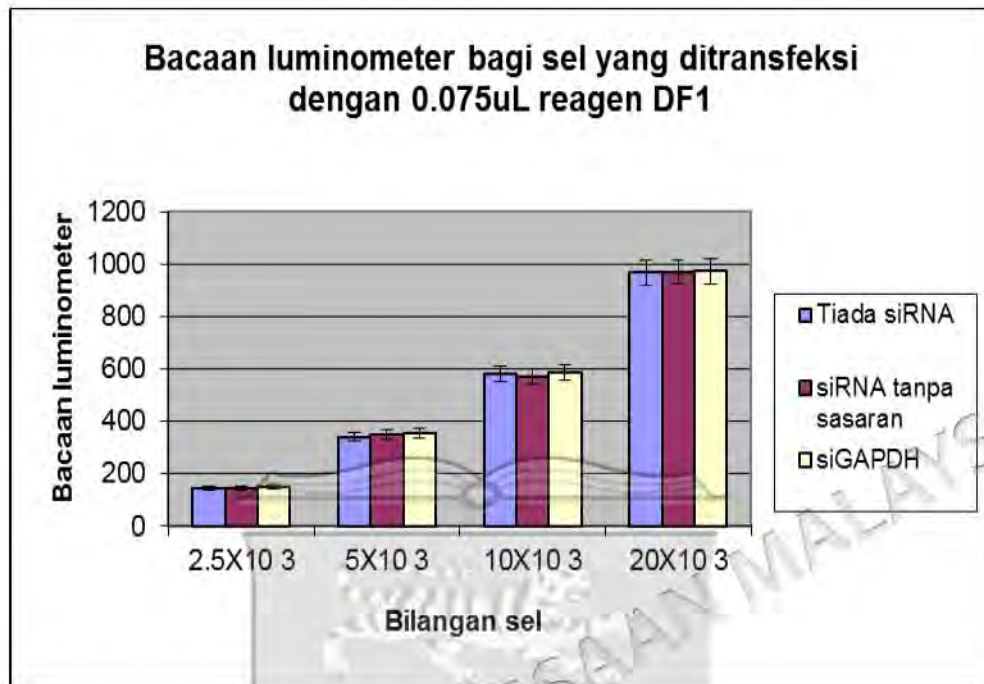
a)



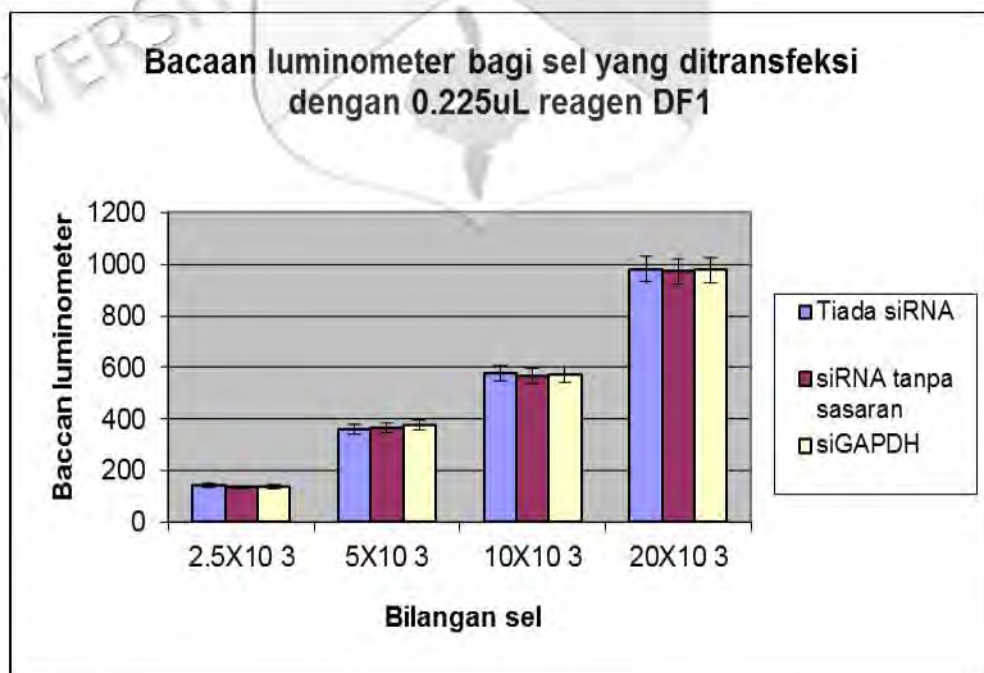
bersambung...

...sambungan

b)



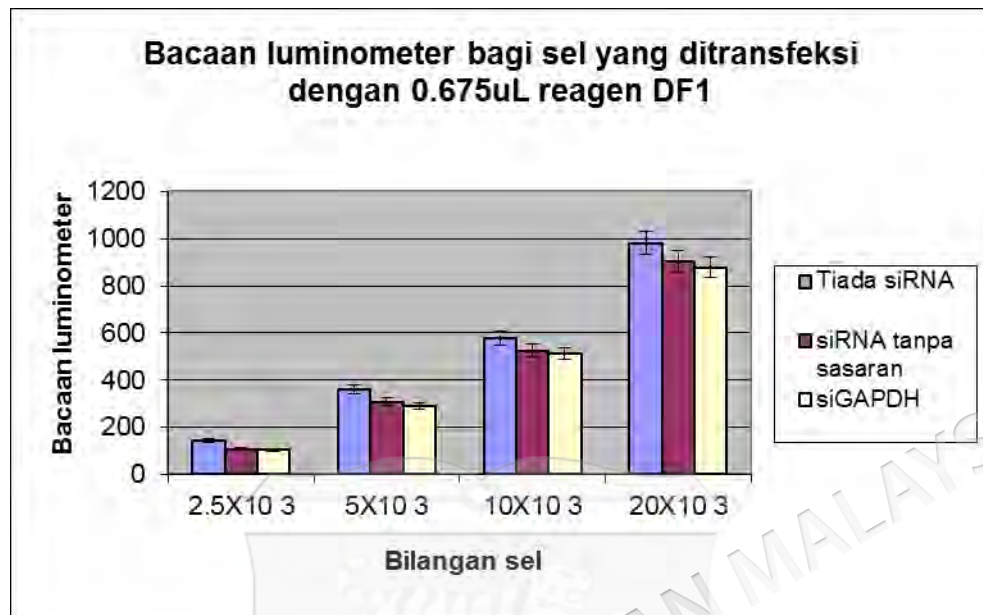
c)



bersambung...

...sambungan

d)



e)



Rajah 4.8 Keputusan kajian pengoptimuman transfeksi siRNA yang diuji dengan reagen transfeksi DF1 yang berlainan kepekatan (a) DF1 = 0.025 μ L, (b) DF1 = 0.075 μ L, (c) DF1 = 0.225 μ L, (d) DF1 = 0.675 μ L dan (e) DF1 = 2.025 μ L serta kuantiti sel A549 yang berlainan. Kawalan yang digunakan dalam perbandingan transfeksi siGAPDH merupakan transfeksi siRNA tanpa sasaran serta tiada transfeksi siRNA digunakan.

Berdasarkan keputusan kajian pengoptimuman transfeksi siRNA (Rajah 4.8), mendapati bahawa kepekatan optimum reagen transfeksi DF1 untuk menindas pengekspresan gen *GAPDH* yang ada pada titisan sel A549 adalah pada kepekatan 0.225 μ L. Pada kepekatan yang melebihi daripada 0.225 μ L, DF1 didapati akan memberikan kesan toksik pada titisan sel A549. Secara keseluruhannya tiada perbezaan ketara pada penggunaan kuantiti sel dalam menindas pengekspresan gen *GAPDH* pada sel A549 bagi transfeksi reagen DF1 yang kurang daripada 0.225 μ L, $p=0.35$. Maka boleh disimpulkan bahawa 50 nM siRNA adalah memadai untuk menindas pengekspresan gen *GAPDH* pada jumlah titisan sel yang berlainan sehingga 20,000 titisan sel A549 pada setiap telaga.

4.2.2 Kesan Saringan siRNA Gen Sasaran Pada Viabiliti Sel A549

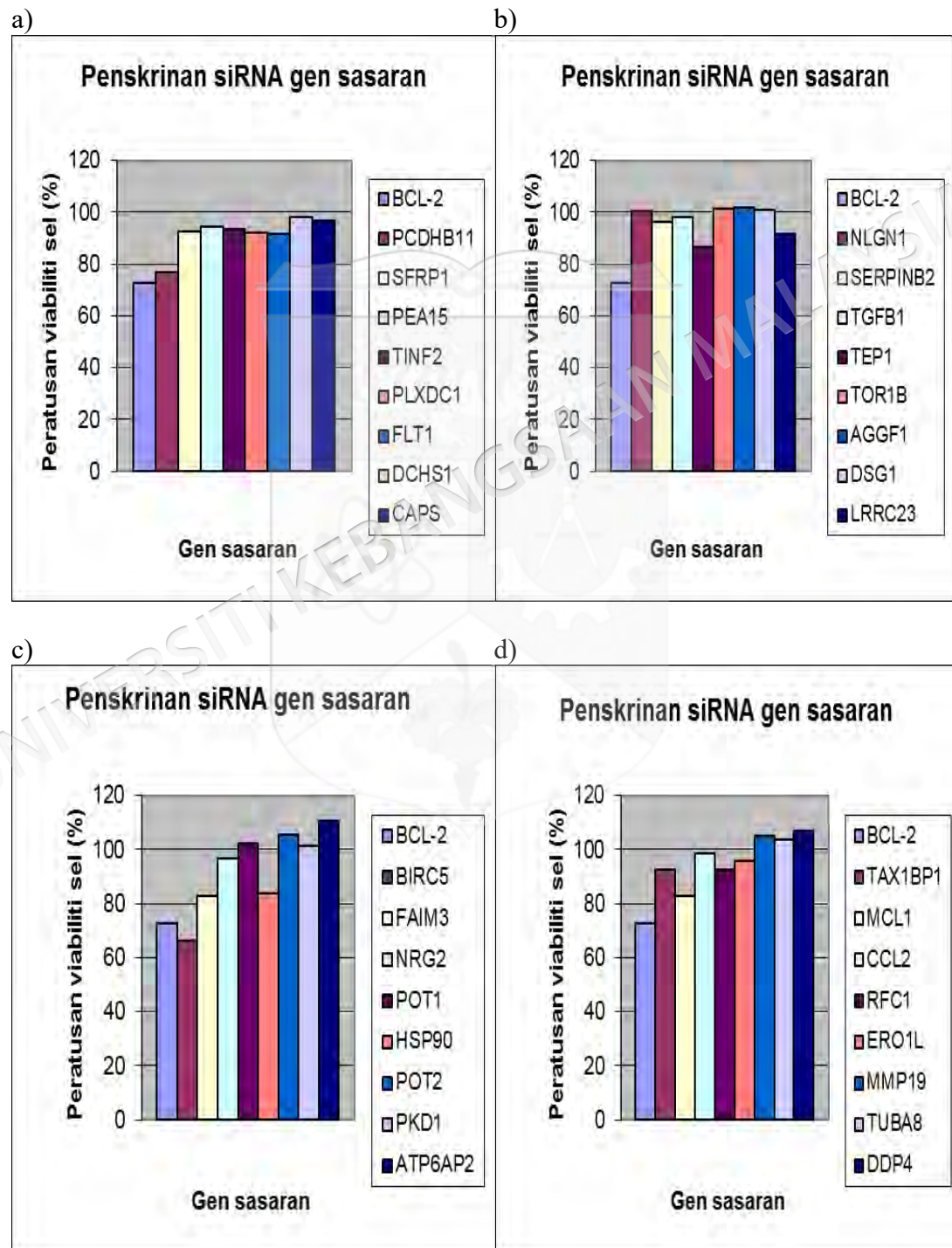
Transfeksi siRNA gen-gen sasaran dilakukan dengan menggunakan Dharmacon transfeksi reagen DF1 0.225 μ L diletakkan pada setiap telaga yang telah mengandungi 50 nm siRNA. Setiap telaga plat penskrinan diletakkan sejumlah 10,000 sel A549 dan ujikaji ini diulangi sebanyak 3 kali. Rajah 4.9 merupakan keputusan penskrinan yang dinyatakan dalam peratusan proliferasi sel dengan perbandingan antara kawalan positif dan telaga yang menerima rawatan siRNA gen sasaran. Formula matematik pengiraan peratusan proliferasi sel adalah seperti berikut:

Peratusan viabiliti sel [siRNA sasaran] =

$$\frac{[\text{Luminesen siRNA tanpa sasaran}] - [\text{Luminesen gen sasaran}]}{\text{Luminesen siRNA tanpa sasaran}} \times 100\%$$

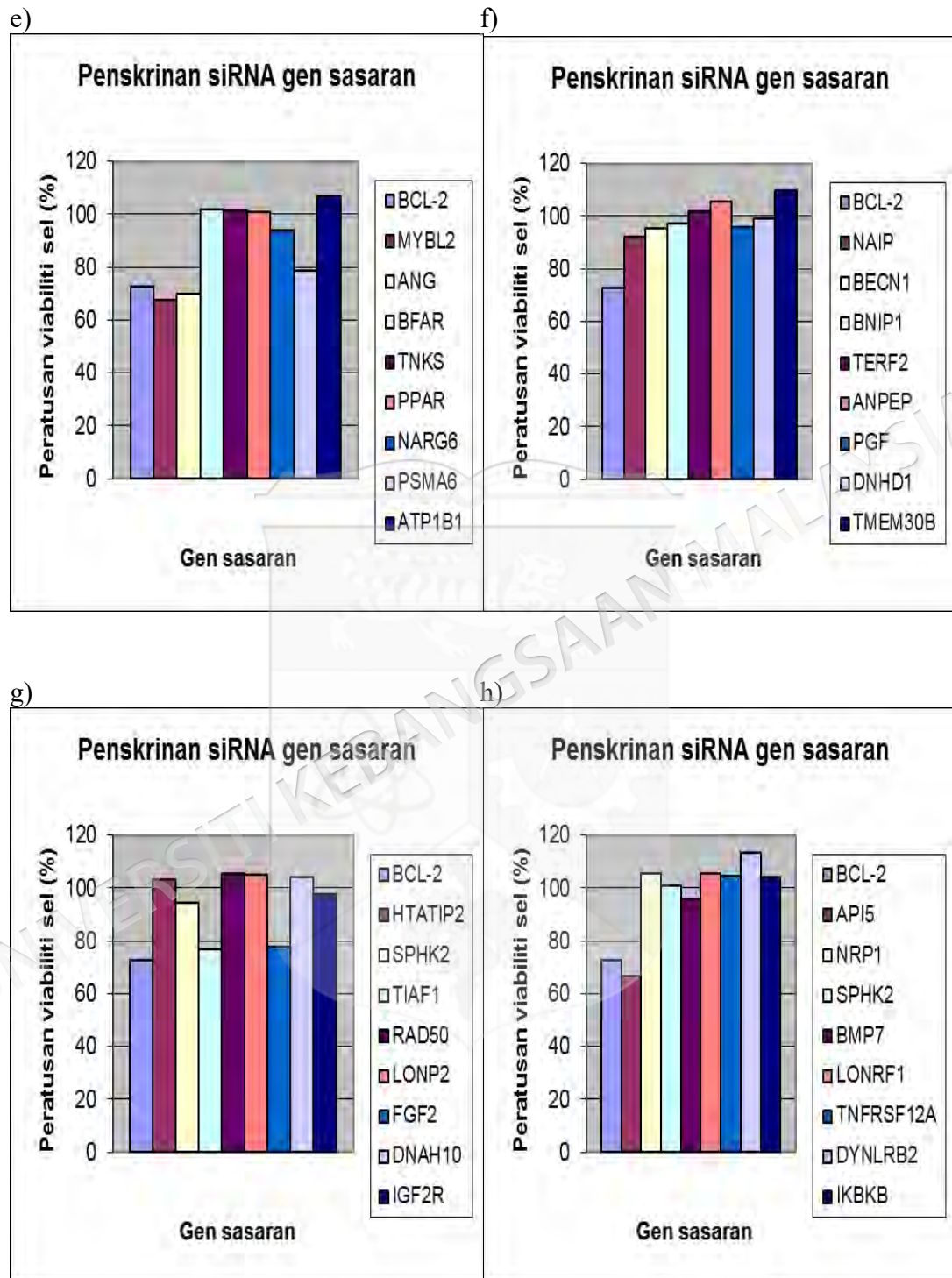
Di dalam kajian ini, kawalan positif yang digunakan merupakan siRNA tanpa sasaran. Ini adalah kerana berdasarkan keputusan pengoptimuman transfeksi siRNA mendapati bahawa tiada perbezaan ketara antara transfeksi siRNA tanpa sasaran dengan transfeksi si*GAPDH*, $p = 0.56$. Maka siRNA tanpa sasaran dijadikan sebagai penunjuk kawalan transfeksi dalam kajian saringan siRNA. Manakala suatu siRNA yang mensasarkan gen *Bcl-2* telah ditambahkan ke dalam plat penskrinan sebagai penanda pemilihan gen untuk kajian seterusnya. Gen telah *Bcl-2* dipilih

sebagai gen penanda piawaian kerana gen tersebut telah terbukti kesannya pada patogenesis kanser paru-paru serta banyak ubat molekul kecil telah dibangunkan untuk mensasarkan gen tersebut telah memasuki kajian klinikal ketiga atas keputusan rawatan yang memberangsangkan (Oltersdorf et al. 2005; Vogler et al. 2008).



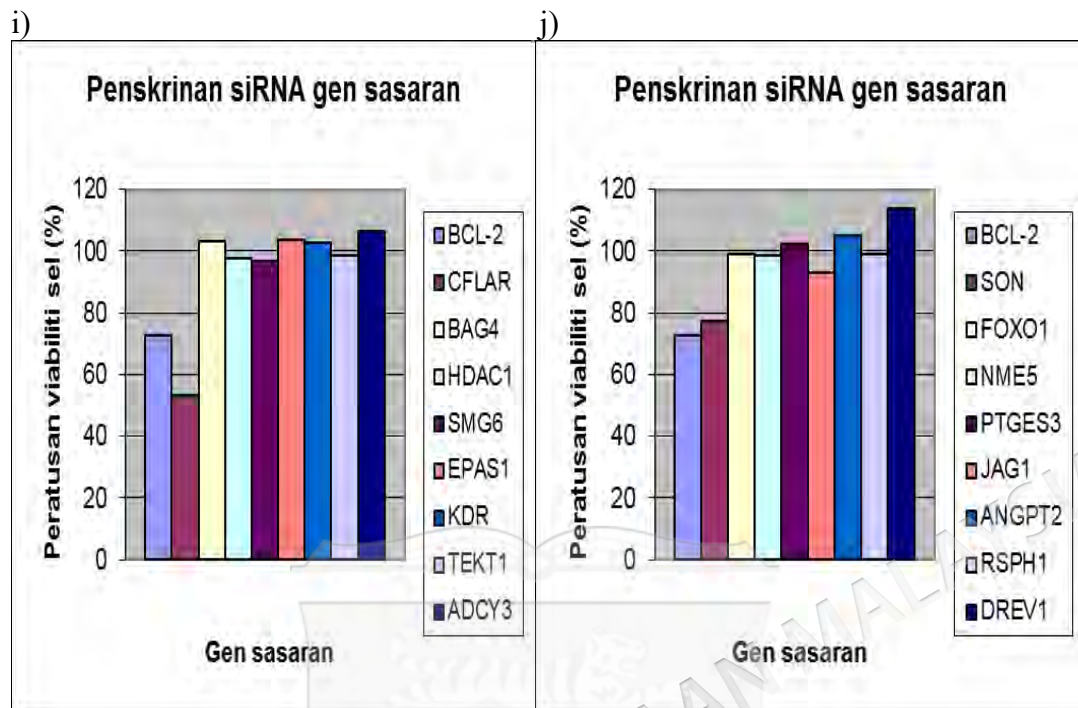
bersambung...

...sambungan



bersambung...

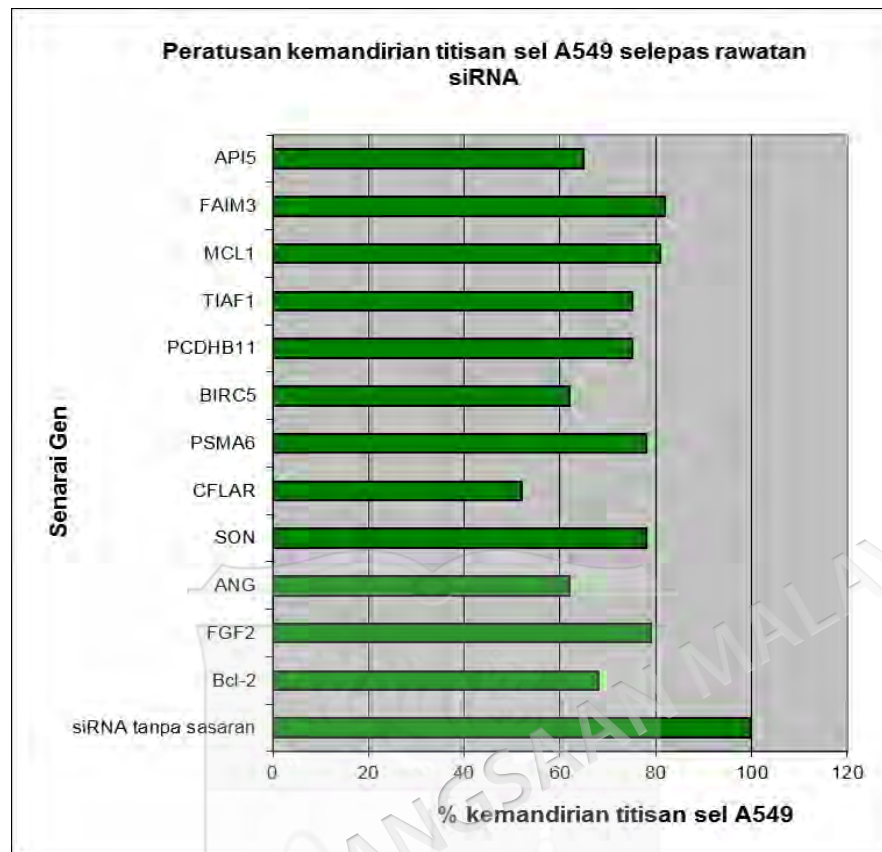
...sambungan



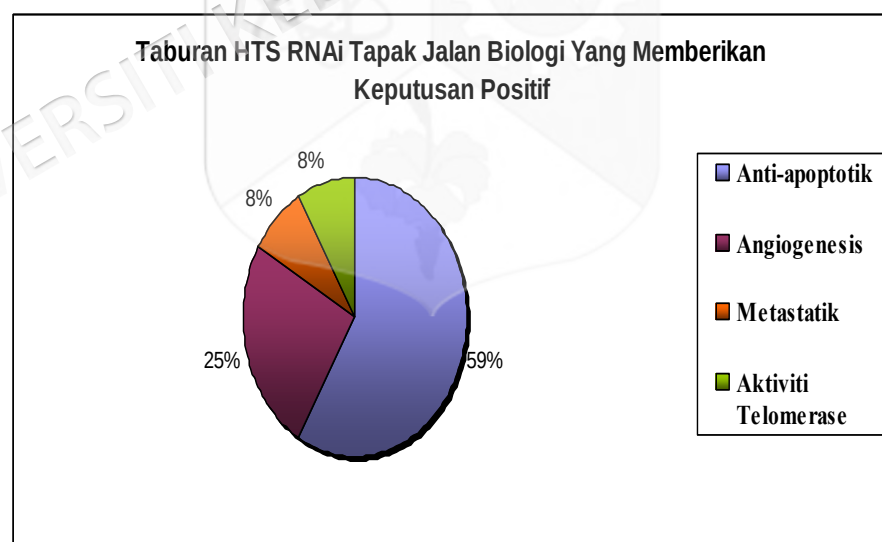
Rajah 4.9 Graf a-j merupakan keputusan HTS siRNA dengan setiap plat mempunyai 10,000 sel A549, 50 nM siRNA dan 0.225 μ L reagen transfeksi DF1.

Berdasarkan keputusan penskrinan siRNA yang diperolehi, didapati terdapat 11 gen yang memberikan keputusan yang positif. Gen-gen tersebut adalah *API5*, *FAIM3*, *MCL1*, *TIAF1*, *PCDH11*, *BIRC5*, *PSMA6*, *CFLAR*, *SON*, *ANG* dan *FGF2*. Rajah 4.10 menunjukkan rumusan keputusan penskrinan. Daripada keputusan kajian mendapati kebanyakan gen yang memberikan keputusan yang positif adalah terdiri daripada gen-gen yang terlibat dalam aktiviti anti-apoptotik, manakala pada kedudukan kedua merupakan gen yang terlibat dalam aktiviti metastasis (Rajah 4.10 (b)).

a.



b.

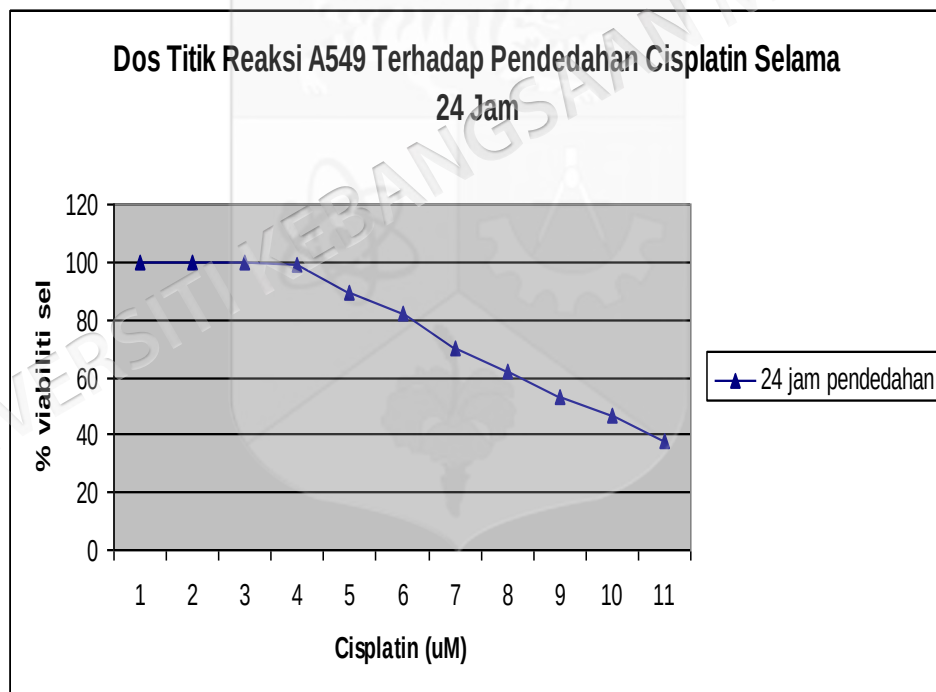


Rajah 4.10 Rumusan keputusan penskrinan siRNA, kehilangan fungsi gen, yang menyebabkan pengurangan viabiliti sel. (a) Senarai gen yang memberikan keputusan positif ujian siRNA. (b) Carta pai taburan fungsi biologi yang memberikan keputusan positif siRNA.

4.2.3 Kesan Penyenyapan Gen Sasaran ke atas Sensitiviti Sel A549 Terhadap Cisplatin

Ujikaji seterusnya adalah untuk mengenalpasti gen-gen yang berupaya meningkatkan sensitiviti sel kanser A549 terhadap cisplatin apabila ekspresi gen-gen ini direncat. Pencarian keluk dos respons cisplatin pada 10,000 titisan sel A549 yang dilakukan secara berulang sebanyak tiga kali mendapati pendedahan kepada cisplatin selama 24 jam dan pada kepekatan cisplastin 5 μM , viabiliti sel A549 akan mula menurun (Rajah 4.11 (a)). Manakala kajian yang sama diulangi dengan perubahan jangka masa pendedahan cisplatin ke 48 jam mendapati bahawa dos titik reaksi cisplatin pada titisan sel A549 menurun ke 4 μM walaupun isipadu medium kultur serta jumlah sel adalah sama.

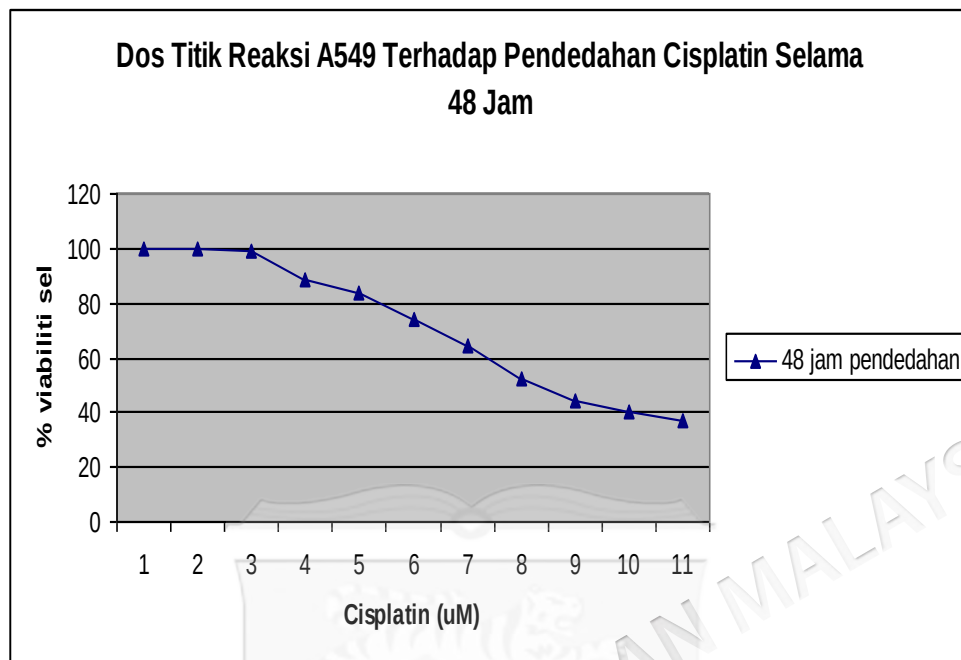
a.



bersambung...

...sambungan

b.



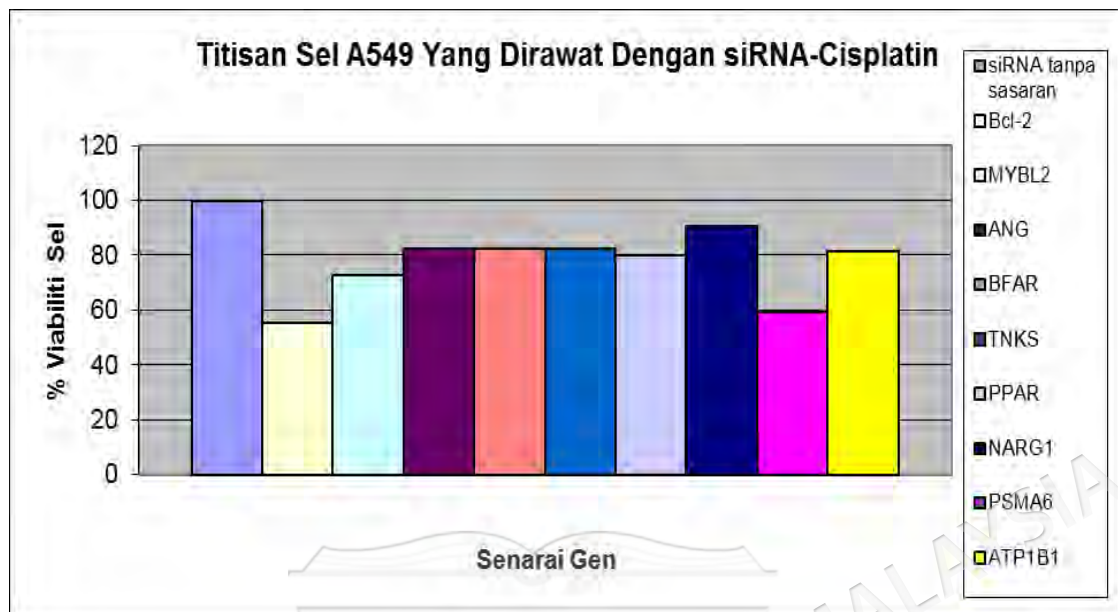
Rajah 4.11: Graf dos titik reaksi sel A549 terhadap rawatan cisplatin. (a) merupakan pendedahan sel A549 kepada cisplatin selama 24 jam pada kepekatan yang berlainan. (b) merupakan pendedahan sel A549 kepada cisplatin selama 48 jam.

Berdasarkan keputusan kelok dos respons sel A549 terhadap rawatan cisplatin, dos 3 μM dengan pendedahan selama 48 jam merupakan dos minima cisplatin yang dipilih dimana viabiliti sel A549 masih tidak terganggu. Maka penskrinan gen yang meningkatkan sensitiviti terhadap cisplatin pada sel A549 dilakukan dengan mendedahkan sel kepada 50nM siRNA selama 24 jam diikuti dengan pendedahan dos subletal 3 μM cisplatin selama 48 jam. Data yang diperolehi digunakan dalam pengiraan peratusan viabiliti sel berdasarkan formula pengiraan matematik yang berikut:

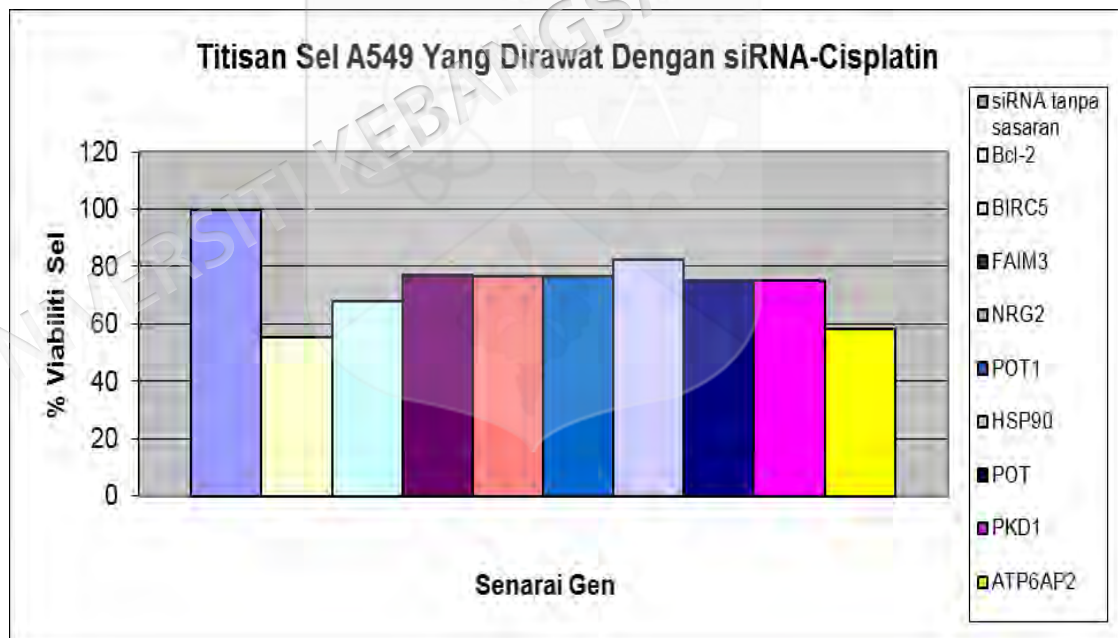
Peratusan viabiliti sel [siRNA sasaran] =

$$\frac{[\text{Luminesen siRNA tanpa sasaran}] - [\text{Luminesen gen sasaran}]}{\text{Luminesen siRNA tanpa sasaran}} \times 100\%$$

a.



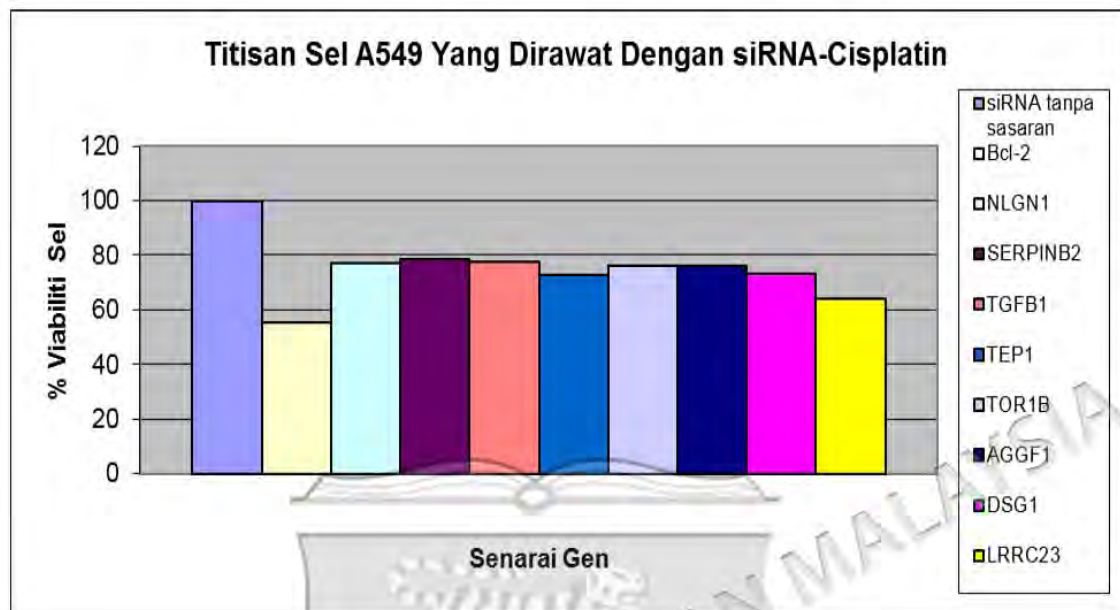
b.



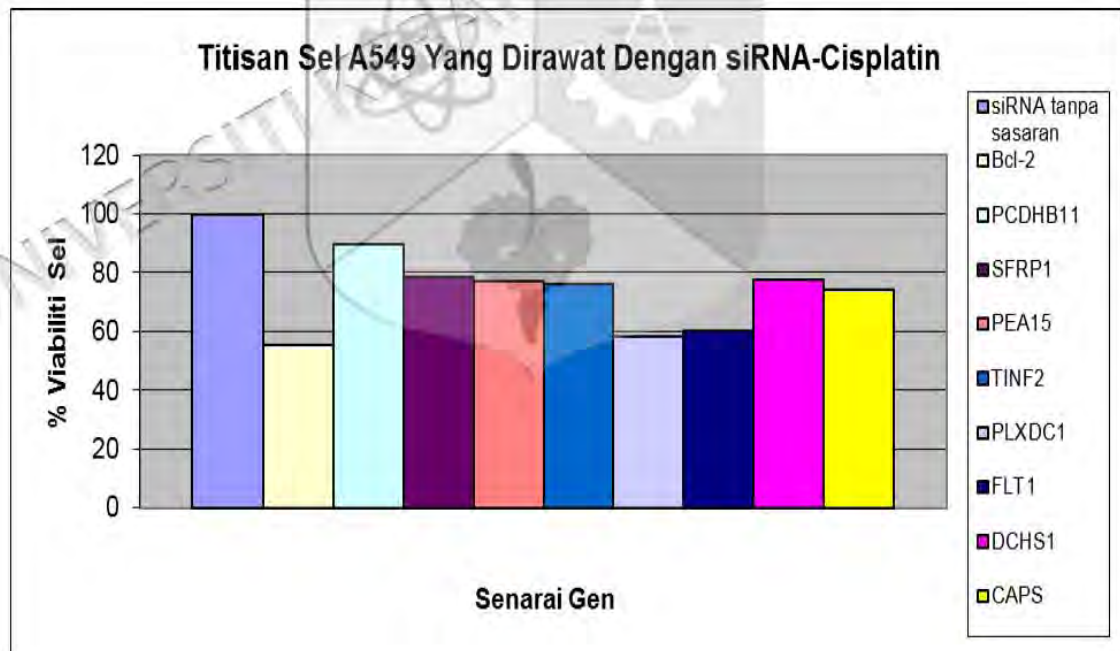
bersambung...

...sambungan

c.



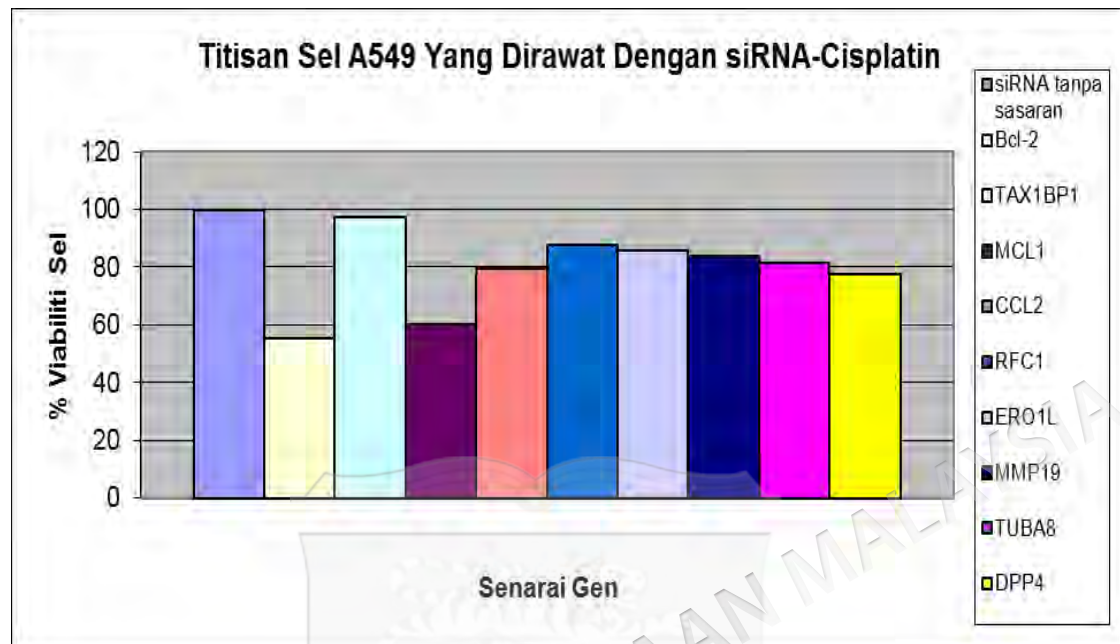
d.



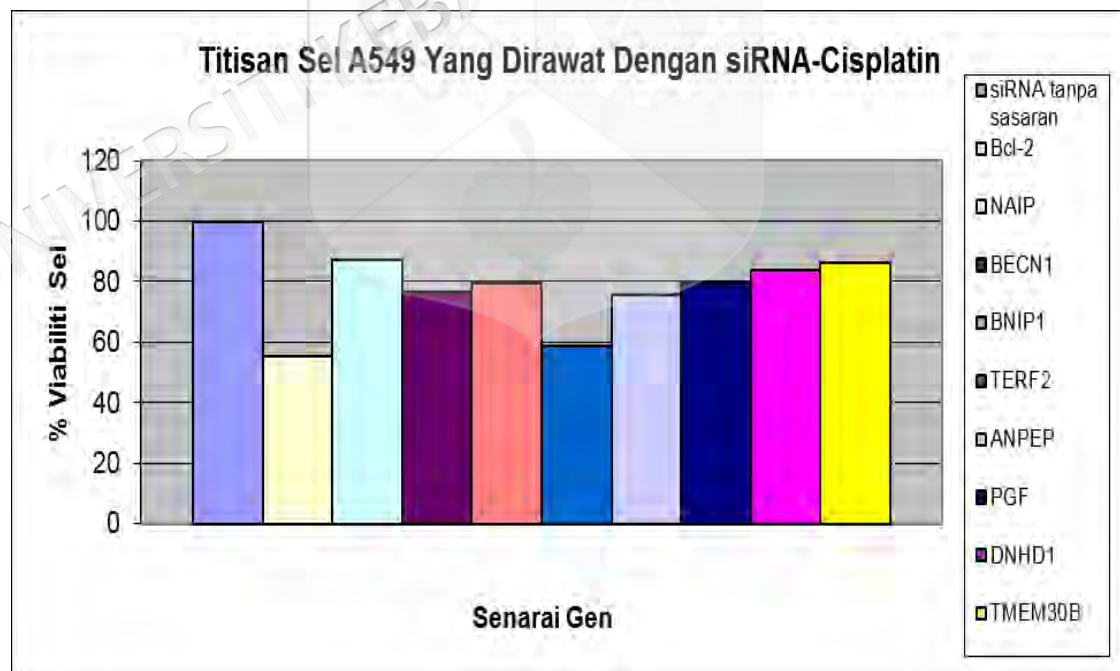
bersambung...

...sambungan

e.



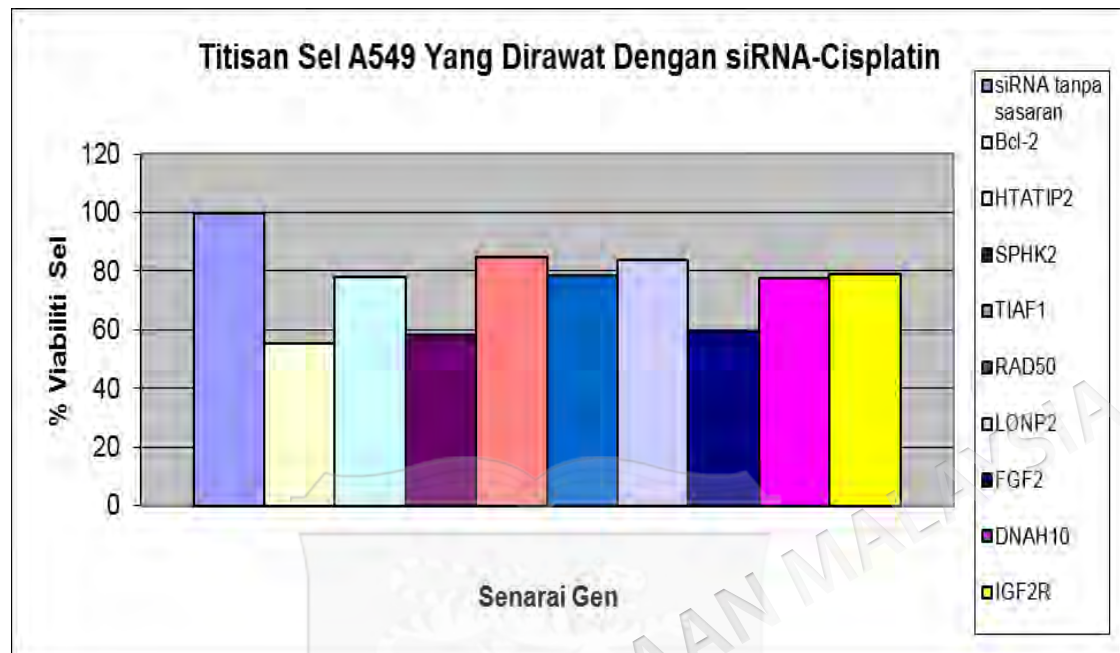
f.



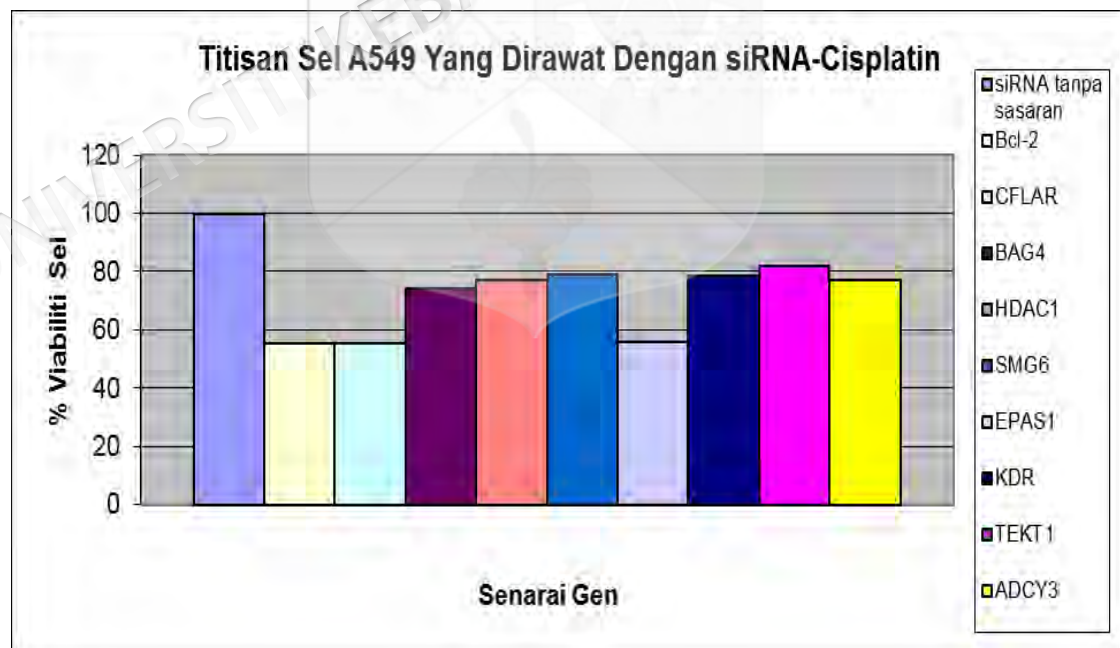
bersambung...

...sambungan

g.



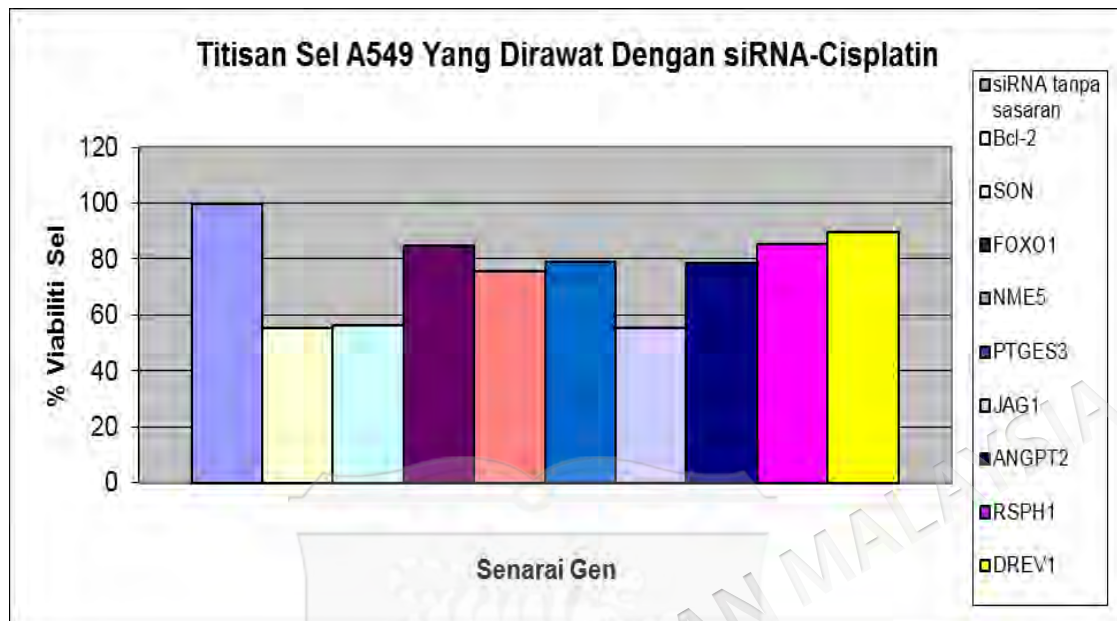
h.



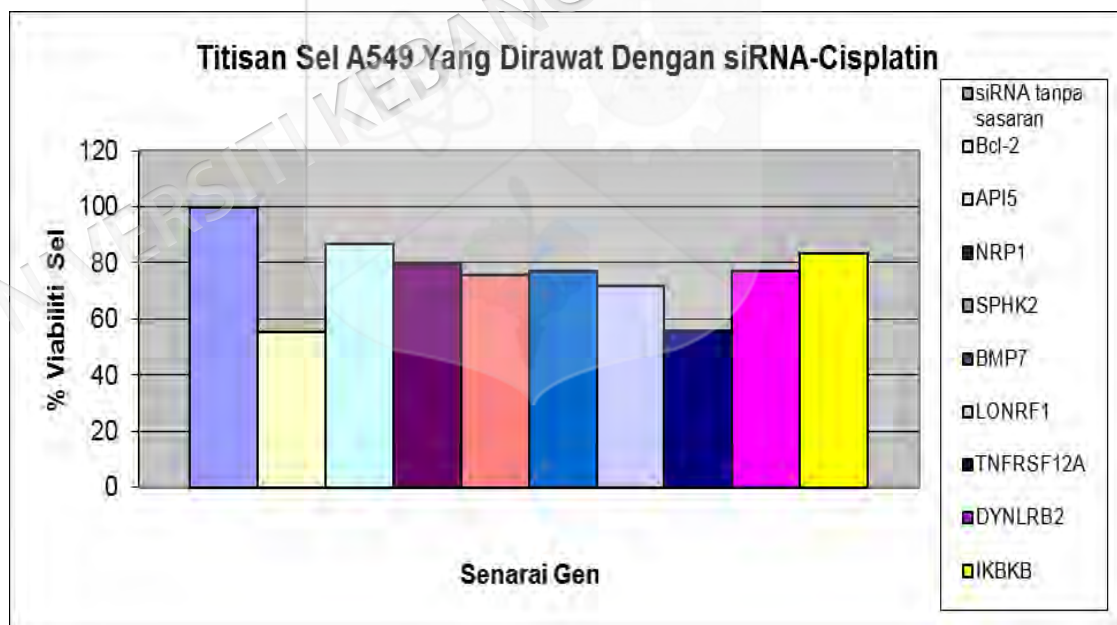
bersambung...

...sambungan

i.

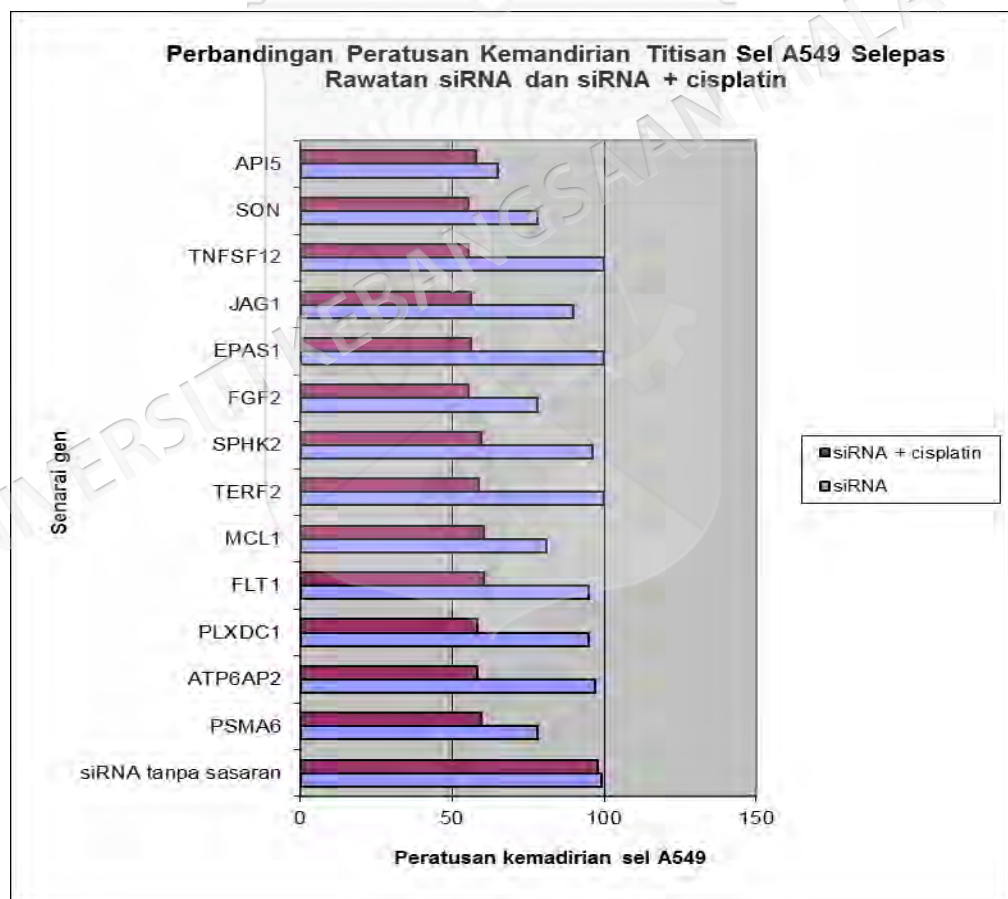


j.



Rajah 4.12 Keputusan HTS siRNA-cisplatin (a-j) dengan setiap plat mempunyai 10,000 sel A549 dirawat dengan 0.225 μ L reagen transfeksi DF1 dan 50 nM siRNA selama 24 jam diikuti pula dengan rawatan cisplatin 3 μ M selama 48 jam.

Rajah 4.12 menunjukkan keputusan penskrinan kehilangan fungsi gen yang dapat meningkatkan sensitiviti sel A549 terhadap rawatan cisplatin. Secara keseluruhan terdapat 13 gen yang memberikan keputusan peningkatan sensitiviti yang paling ketara dalam ujikaji penskrinan rawatan siRNA dan cisplatin. Gen-gen tersebut adalah *TNFSF12*, *JAG1*, *EPAS1*, *FGF2*, *SPHK2*, *TERF2*, *MCL1*, *FLT1*, *API5*, *SON*, *PLXDC1*, *ATP6AP2* dan *PSMA6*. Rajah 4.13 menunjukkan rumusan keputusan penskrinan siRNA dan sensitiviti pada cisplatin selepas rawatan siRNA. Daripada keputusan yang diperolehi mendapati bahawa kebanyakan gen yang memberikan keputusan positif adalah terdiri daripada gen yang terlibat dalam aktiviti angiogenesis, metastasis dan aktiviti telomerase (Jadual 4.3). Keputusan ini adalah amat berlainan dengan keputusan penskrinan siRNA.



Rajah 4.13 Rumusan keputusan penskrinan kehilangan fungsi gen meningkatkan sensitiviti sel A549 terhadap cisplatin. Rajah merupakan keputusan perbandingan antara peratusan survival titisan sel A549 yang dirawat dengan siRNA dan titisan sel yang dirawat dengan siRNA dan cisplatin.

Jadual 4.3 Senarai gen dan fungsi biologi yang memberikan keputusan positif penskrinan siRNA dan sensitiviti cisplatin.

a)

Penskrinan siRNA (Gen)	Fungsi Biologi
<i>API5</i>	Anti-apoptotik
<i>FAIM3</i>	Anti-apoptotik
<i>MCL1</i>	Anti-apoptotik
<i>TIAF1</i>	Anti-apoptotik
<i>PCDHB11</i>	Metastatik
<i>BIRC5</i>	Anti-apoptotik
<i>PSMA6</i>	Modifikasi protein
<i>CFLAR</i>	Anti-apoptotik
<i>SON</i>	Kitaran sel
<i>ANG</i>	Angiogenesis
<i>FGF2</i>	Angiogenesis

b)

Penskrinan sensitiviti kemoterapi (Gen)	Fungsi Biologi
<i>TNFSF12A</i>	Angiogenesis
<i>JAG1</i>	Angiogenesis
<i>EPAS1</i>	Angiogenesis
<i>FGF2</i>	Angiogenesis
<i>PLXDC1</i>	Angiogenesis
<i>SPHK2</i>	Anti-apoptotik
<i>TERF2</i>	Kitaran sel
<i>MCL1</i>	Anti-apoptotik
<i>FLT1</i>	Angiogenesis
<i>ATP6AP2</i>	Angiogenesis
<i>PSMA6</i>	Modifikasi protein
<i>API5</i>	Anti-apoptotik
<i>SON</i>	Anti-apoptotik

Di dalam kedua-dua kajian penskrinan kehilangan fungsi gen dan kajian penskrinan sensitiviti kemoterapi mendapati bahawa fungsi biologi gen-gen adalah amat berlainan. Gen yang terlibat dalam fungsi anti-apoptotik didapati sebahagian besarnya dapat mengurangkan proliferasi sel dalam penskrinan kehilangan fungsi gen manakala pada penskrinan sensitiviti cisplatin kehilangan fungsi gen anti-apoptotik kurang memberikan kesan pengurangan sel. Malahan dalam penskrinan sensitiviti cisplatin keputusan positif adalah lebih ketara pada gen yang terlibat dalam fungsi angiogenesis (Jadual 4.3).

Secara keseluruhan, terdapat lima gen yang memberikan keputusan positif yang signifikan pada kedua-dua kajian penskrinan. Gen-gen tersebut adalah *SON*, *API5*, *FGF2*, *MCL1* dan *PSMA6*. Antara kelima-lima gen tersebut, kehilangan fungsi gen *SON* mengurangkan proliferasi sel A549 dengan paling banyak (50% bagi penskrinan si*SON* dan cisplatin serta 30% bagi penskrinan si*SON*).

4.3 ANALISIS FUNGSI GEN *SON*

Berdasarkan kajian lepas didapati gen-gen yang terlibat dalam kerintangan cisplatin kebanyakan adalah melibatkan domain-domain pengikat DNA dan RNA. Antara molekul protein yang mempunyai domain tersebut adalah protein ERCC1, BRCA1, Topoisomerase II, HMG1 dan sebagainya (Cobo et al 2007; Friboulet et al. 2013; Rosell et al. 2003). Domain pengikat DNA dan RNA adalah penting dalam memastikan kestabilan ikatan DNA dan RNA serta memastikan ketepatan pembaikan DNA dan RNA.

Berikutan daripada keputusan penskrinan siRNA yang mendapati bahawa terdapat beberapa gen yang memberikan keputusan positif dan berkesan untuk mengurangkan pertumbuhan sel A549 apabila ditindas pengekspresannya serta meningkatkan sensitiviti sel pada agen kemoterapi, cisplatin. Antara gen-gen yang meningkatkan sensitiviti pada cisplatin adalah gen *SON* yang merupakan gen yang tidak pernah dilaporkan berkaitan dengan aktiviti patogenik NSCLC. Malahan fungsi gen *SON* juga kurang dikaji. Oleh demikian, gen *SON* dipilih untuk dikaji dengan lebih lanjut fungsinya dalam kemandirian sel kanser paru-paru.

4.3.1 Pencarian Domain *SON*

Nama penuh gen *SON* mengikut GenCard adalah Gen Pengikat DNA *SON*. Gen *SON* didefinisi sebagai gen yang berfungsi sebagai gen yang terlibat dalam pengikatan DNA dan RNA serta terlibat dalam aktiviti penyekatan jujukan pasca-mRNA. Namun fungsi sebenar gen ini masih tidak dibuktikan dengan sepenuhnya mengikut pangkalan data NCBI (kemas kini yang dilakukan oleh NCBI pada Disember 2014). Oleh sebab fungsi gen *SON* masih tidak diketahui dengan lengkap,

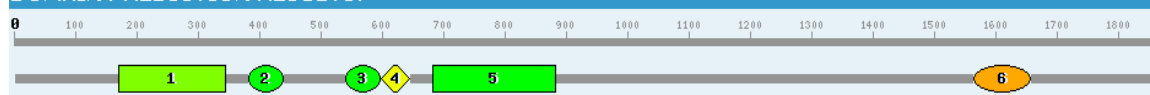
maka fungsi gen *SON* dikaji dengan menggunakan perisian SBASE bagi mengenalpasti domain yang terdapat pada jujukan gen *SON*.

Jujukan penuh gen *SON* diekstrak daripada perisian laman sesawang NCBI. Selepas itu, jujukan penuh gen diimport masuk ke dalam perisian SBASE yang dicipta khas untuk mengenalpasti domain-domain protein yang terdapat pada gen yang dikaji. Secara automatik jujukan gen akan ditranslasikan ke kod protein dan domain-domain protein akan disenaraikan (Rajah 4.14 dan Jadual 4.4).

Keputusan analisis domain pada jujukan *SON* menunjukkan terdapat enam domain utama. Domain-domain tersebut adalah domain protein terlarut asid otak 1 (*brain acid soluble protein 1*, BASP1), domain antigen permukaan sel (*cell surface antigen*), domain heliks berulang tiga kolagen (*collagen triple helix repeat*), domain WD40 dan domain oligosakaril transferase subunit STT3 (*oligosaccharyl transferase, STT3 subunit*). Jadual 4.4 menunjukkan rumusan fungsi domain-domain yang didapati pada jujukan gen *SON*.

Berdasarkan fungsi-fungsi domain yang telah dikenalpasti, maka secara kasarnya gen *SON* berkemungkinan memainkan peranan dalam aktiviti interaksi antara protein-protein di dalam sel serta pengangkutan kandungan sel masuk dan keluar dari sel. Manakala dalam kelima-lima domain yang didapati, hanya domain WD40 dan domain oligosakaril transferase subunit STT3 yang memainkan peranan menentukan mekanisme kemandirian sel. Domain protein terlarut asid otak 1 dan oligosakaril transferase subunit STT3 pula berkemungkinan terlibat dalam aktiviti kerintangan kemoterapi.

DOMAIN PREDICTION RESULTS:



Raw output of swissprot format

```

SBASE_PRED      STANDARD;          PRT;    1980 AA
AC      unknown;
DE      DOMAIN ARCHITECTURE PREDICTED BY SBASE SVM
KW
FT      DOMAIN          171      345      Brain acid soluble protein 1 - like
domain;
FT      DOMAIN          382      439      Cell surface antigen - like domain;
FT      DOMAIN          540      597      Cell surface antigen - like domain;
FT      DOMAIN          598      644      Collagen triple helix repeat - like
domain;
FT      DOMAIN          683      882      WD40-like - like domain;
FT      DOMAIN          1565     1657     Oligosaccharyl transferase, STT3
subunit          -              like          domain;
SQ      SEQUENCE    1980 AA;
matnieqifr sfvvskfriei qqelssgrne gqlngetntp iegnaqagdaa
asarslpnee ivqkieevls gvltdelryk pdlkegsrks rcvsvqtdpt
deiptkkskk hkkhknkkkk kkkekekkyk rqppeesekt kshddgnidl
esdsflkfds epsavalelp trafgpsetn espavvlepp vvsmevseph
iletlkpatk taelsvsvts viseqseqsv avmpepsmtk ildsfaaapv
ptttlvlkss epvvtmsvey qmksvlksve stspepskim lveppvavkl
epsetlvvss etptevypep ststmdfpe ssaiealrlp eqpvdvpsei
adssmtrpqe lpelpkttal elqessvasa melpgppats mpelqgppvt
pvlelpgpsa tpvpelpgpl stpvpelpgp patavpelpg psvtvpvqls
qelpglpaps mgleppqevp eppvmaqelp glplvtaave lpeqpavtva
melteqpvt tteleqpvgmt tvehpgphpev ttatgllgqp eatmvlelpg
qpvattalel pgqpsvtgvp elpglpsatr alelsqgppva tgalelpgpl
maagalefsg qsgaagalel lgqplatgvl elpgqpgape lpgqpvatva
leisvqsvvt tselstmtvs qslevpstta lesyntvage lpttlvgets
vtvgvdplma peshilasnt methilasnt mdsqmlasnt mdsqmlasnt
mdsqmlasst mdsqmlatss mdsqmlatss mdsqmlatst mdsqmlatss
mdsqmlatss mdsqmlatss mdsqmlatss mdsqmlatst mdsqmlatst
mdsqmlatss mdsqmlasgt mdsqmlasgt mdaqmlasgt mdaqmlasst
qdsamlgsk pdpyrlaqdp yrilaqdp yrl ghdp yrlghd ayrlgqdp yrl
lghdp yrltp dpyr msprpy riaprsyria prpyrlaprp lmlasrrs mm
msyaaersmm ssyrs mmsy ersmmspm ae rsmmsayers mmsayersmm
spmaersmm ayersmmsay ersmmspm ad rsmmsmgadr smmssysaad
rsmmssysaa drsmmssyta drsmmsmaad sytdsytdty teaymvpplp
peepptmppl ppeppmtp lpeeppegp alpteqsalt aentwptevp
sspseesvsq peppvsvsei sepsavptdy svsasdpvsv vseaavtvp
pppepessit ltpvesavva eehevvperv vtcmvsetpa msaeptvlas
epvmsetae tfds mrasgh vasevstsl vpavttpvla esileppama
apessamavl essavtvles stvtvlesst vtvlepsvvt vpeppvvaep
dyvtipvpv salepsvpvl epavsvlqps mivsepsvsv gestvtvsep
avtvsegtqv iptevaiest pmilessims shvmkginls sgqnlapei
gmqeialhsg eephaeehlk gdfyesehgi nidlninnhl iakemehntv
caagtspvge igeekilpts etkqrtvldt ypgvseadag etlsstgpf
lepdatgtsk giefttastl slvnkydvd slttqdtahd mvistspsgg
seadieglp akdihldlps nnnlvskdte eplpvkesdq tlaallspke
ssggekevpp ppketlpdsg fsaniedine adlvprllpk dmerltslra
giegpllasd vgrdrsaasp vvssmperas essseekddy eifvkvkdh

```

bersambung...

...sambungan

```
eksksknknd kgekekkrds slrsrskrsk sseksrkrt sesrsrarkr
sskskshrsq trsrsrsrrr rrsrsrsk rgrsvskek rkrsphrsk
srerkrkrss srdnrktvra rsrtpsrrsr shtpsrrrrs rsvgrrrsfs
ispsrrsrt p srrsrtpsrr srtpsrrsrt
```

Rajah 4.14 Keputusan pengenalanpastian domain SON dengan menggunakan perisian SBASE

Jadual 4.4 Rumusan fungsi domain-domain yang terdapat pada jujukan gen SON

Nama	Fungsi Domain
Protein terlarut asid otak 1	Famili protein ini terdiri daripada beberapa protein terlarut asid otak 1 (BASP1). BASP1 merupakan protein neuron yang diperkayakan dengan ion Ca^{2+} protein pengikat kalmodulin yang tidak diketahui fungsinya sehingga kini.
Antigen permukaan sel	Domain ini pada mulanya dianggap mewakili apidaecins, tetapi kini protein ini telah ditemui dalam pelbagai jenis permukaan sel. Ia didapati dalam protein antigen permukaan sel yang terabit dalam karies gigi; antigen permukaan sel SpaA dan SpaP.
Heliks berulang tiga kolagen	Ahli keluarga ini tergolong dalam superfamili kolagen. Kolagen pada umumnya merupakan struktur protein luar sel yang terlibat dalam pembentukan struktur tisu perantara.
WD40	Motif WD40 didapati dalam pelbagai protein eukariotik yang terlibat dalam pelbagai proses sel. Motif WD40 yang berulang-ulang bertindak sebagai tapak untuk interaksi protein-protein dan protein yang mengandungi motif WD40 yang berulang-ulang diketahui sebagai platform untuk perhimpunan protein kompleks atau berfungsi sebagai tapak interaksi pelbagai jenis protein. Dalam spesies Arabidopsis, protein yang mengandungi motif WD40 bertindak sebagai pengawal sesetengah mekanisme pertumbuhan tumbuh-tumbuhan. Antara protein-protein yang telah diketahui mengandungi motif WD40 yang berulang adalah protein G isyarat transduksi, protein Cdc4 dan protein interaksi aktin.

bersambung...

...sambungan

Oligosakaril transferase subunit STT3	Glikosilasi berhubungan-N merupakan protein pengubahsuaian yang didapati dengan banyak, dan ia adalah penting untuk menentukan kemandirian sel-sel eukariotik. Oligosakarida asas yang berhubung dengan lipid terkumpul pada membran retikulum endoplasmik dan ia amat diperlukan untuk memsadikan pemindahan keluar masuk kandungan sel dilakukan dengan lancar.
---------------------------------------	---

Pencarian domain protein SON diteruskan dengan menggunakan pencarian berpandukan motif jujukan. Dalam pencarian ini, pangkalan data Pfam (*Protein Families Database*) digunakan. Pangkalan data ini membolehkan pencarian domain terdekat berdasarkan jujukan motif asid amino. Salah satu kebaikan penggunaan pendekatan pencarian domain berdasarkan motif jujukan adalah pencari domain boleh berpandukan hasil keputusan analisis statistik untuk mengetahui di mana terletaknya protein tersebut di dalam sel.

Daripada hasil analisis motif jujukan protein SON mendapati bahawa gen ini mempunyai dua jenis motif domain iaitu DND1-DRSM (*Double strand RNA binding domain from Dead End protein 1*) dan G-patch (Rajah 4.15). Analisis dilanjutkan lagi dengan pembinaan filogenetik bagi mengenalpasti hubung kait rapat protein SON dengan protein yang lain dengan berdasarkan motif jujukan dua domain tersebut. Hasilnya didapati bagi domain SON yang mempunyai motif domain DND1-DSRM mempunyai kaitan filogenetik yang rapat dengan protein DND1 (protein *Dead End*) bernilai *neighbor joining* = 0.84 (Rajah 4.16 (a)) dimana protein ini terlibat dalam fungsi pengikatan jujukan RNA yang diperkayakan dengan nukletida AU. Manakala bagi motif domain G-patch didapati mempunyai kaitan filogenetik yang rapat dengan protein D1037.1 dan protein CG8273 (nilai *neighbor joining* = 0.84, Rajah 4.16 (b) dimana kedua-dua protein ini didapati terlibat dalam fungsi pengikatan DNA (protein D1037.1) dan pengikatan RNA (protein CG8273). Daripada keputusan analisis filogenetik ini, kesemua jenis protein-protein yang mempunyai kaitan rapat dengan motif jujukan domain yang dimiliki oleh SON didapati dengan banyak pada kawasan protoplasma yang berdekatan dengan saluran nukleus dan jalinan retikulum endoplasma.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

G-patch (PF01535.10)
 Description: G-patch domain
 Coordinates: 1986 - 2030 (alignment region 1986 - 2029)
 Source: pfam

Significant Pfam-A Matches

We found 2 Pfam-A matches to your search sequence (all significant) and 6 Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

DND1_DSRM (PF14709.1)
 Description: double strand RNA binding domain from DEAD END PROTEIN 1
 Coordinates: 2051 - 2121 (alignment region 2051 - 2121)
 Source: pfam

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
DND1_DSRM	double strand RNA binding domain from DE	Domain	CL0196	2051	2121	2051	2121	1	80	80	73.1	1.6e-20	n/a	Show
G-patch	G-patch domain	Family	CL0449	1986	2030	1986	2029	1	44	45	55.0	5.0e-15	n/a	Show

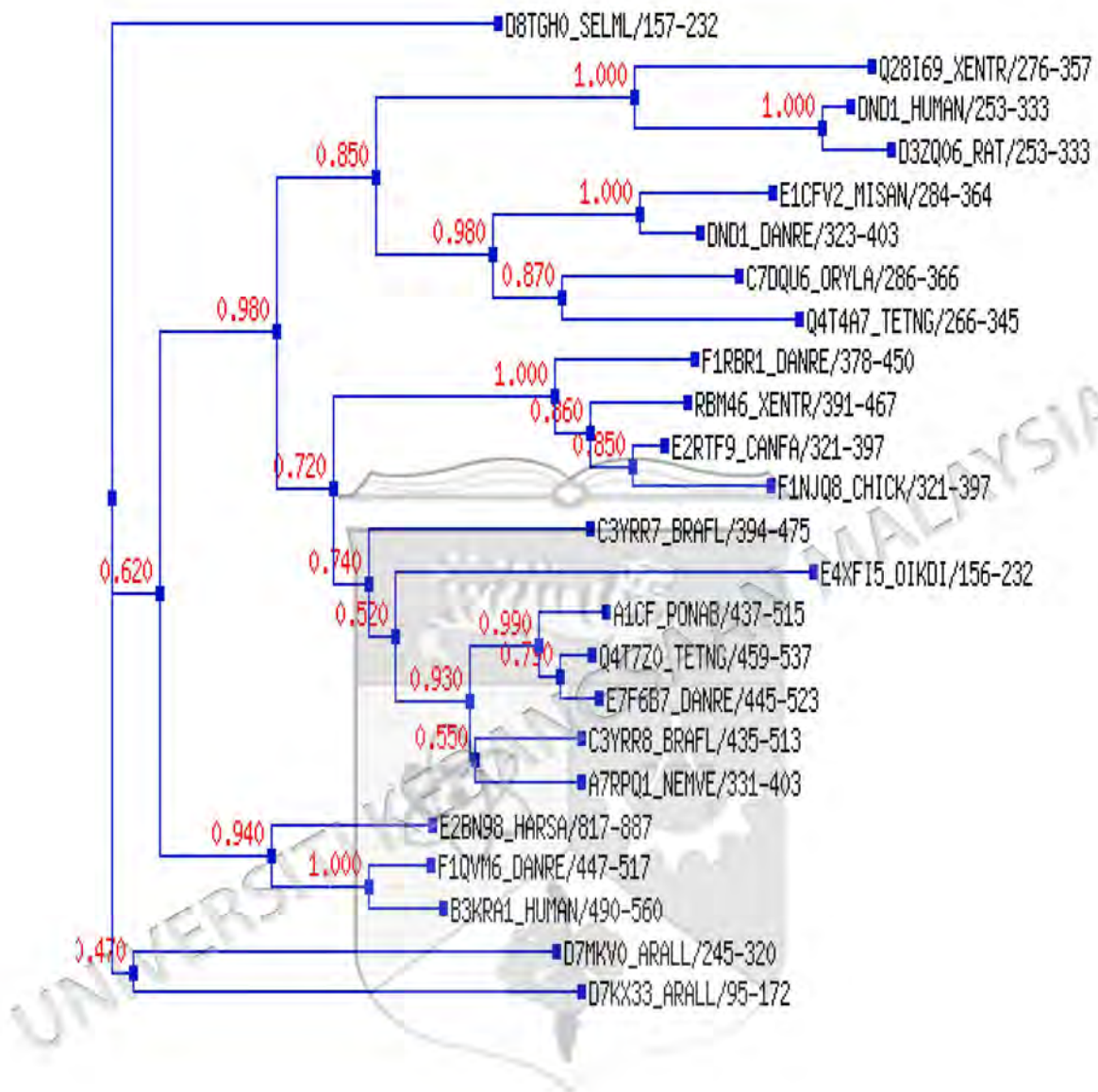
Pfam-B Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
Pfam-B 1702	n/a	n/a	n/a	1	163	1	146	697	842	920	86.5	1.6e-24	n/a	Show
Pfam-B 607	n/a	n/a	n/a	647	1740	662	1610	82	414	922	22.4	5.7e-05	n/a	Show
Pfam-B 8902	n/a	n/a	n/a	201	1660	702	1628	280	428	557	32.7	6.2e-08	n/a	Show
Pfam-B 8646	n/a	n/a	n/a	646	1618	703	1604	115	346	451	31.3	2e-07	n/a	Show
Pfam-B 715	n/a	n/a	n/a	1113	1741	1290	1696	99	307	813	27.5	1.1e-06	n/a	Show
Pfam-B 317	n/a	n/a	n/a	962	1759	1470	1680	83	295	649	24.4	1.6e-05	n/a	Show

Rajah 4.15 Hasil analisis motif domain gen *SON* yang mengenalpasti dua motif domain DND1 DSRM dan G-patch dengan nilai-E $1.6e^{-20}$ dan $5.0e^{-15}$ masing-masing.

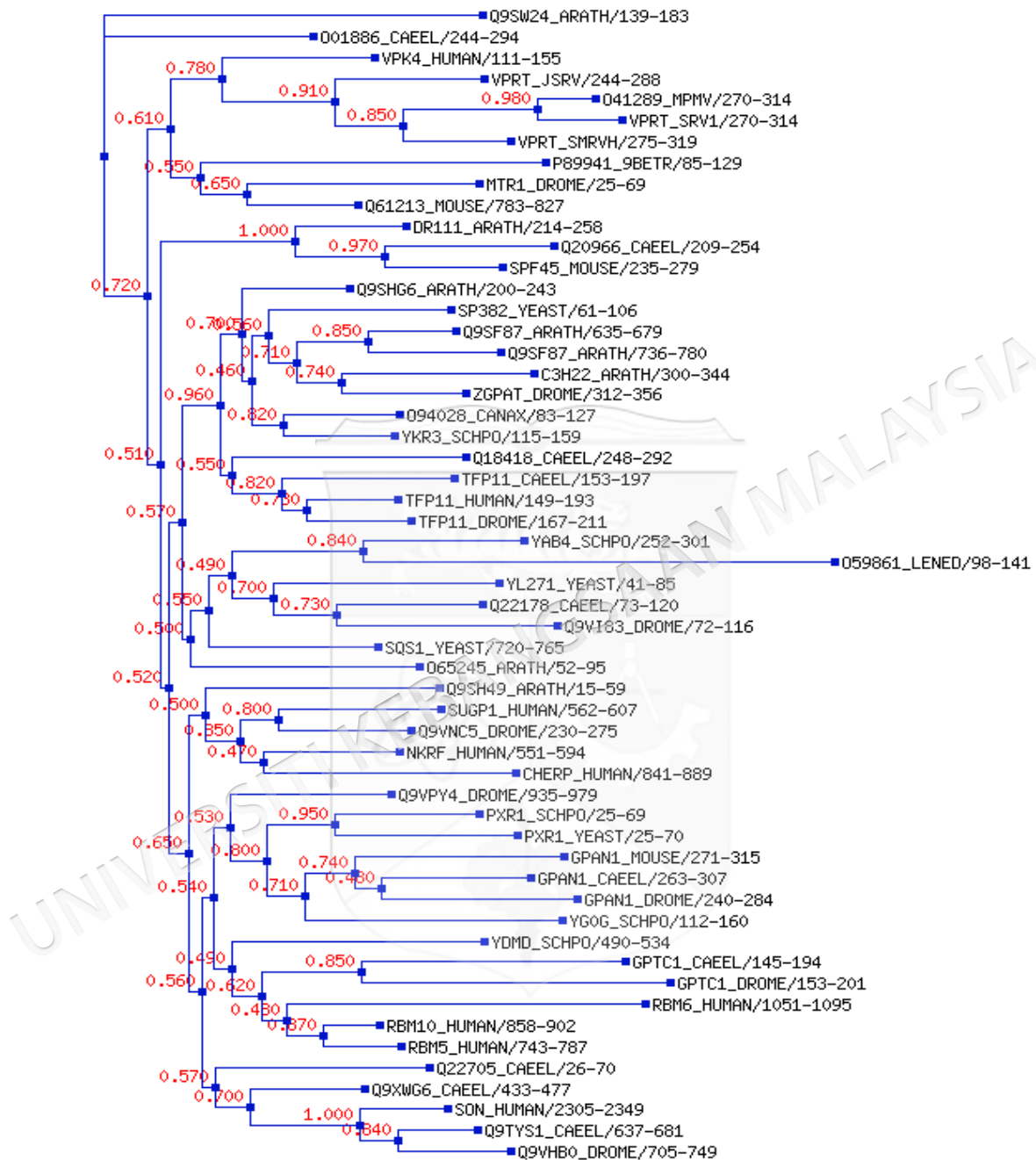
a)



bersambung...

...sambungan

b)

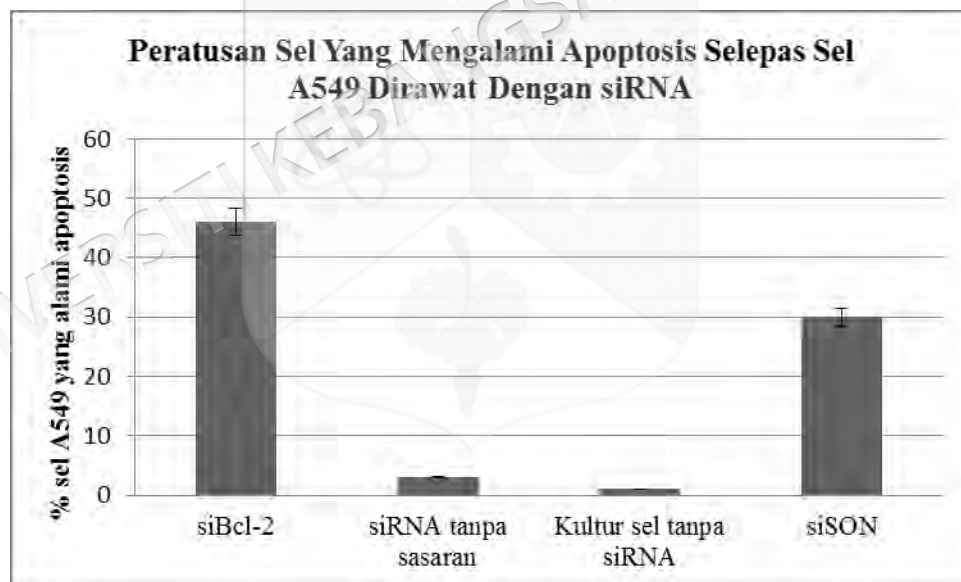


Rajah 4.16 Hasil analisis filogenetik bagi motif domain gen *SON* yang telah dikenalpasti. Dedahan filogenetik merupakan pengiraan kebarangkalian kesamaan maksimum antara protein. Filogenetik (a) merupakan hasil saringan motif domain *DND1-DSRM*. Filogenetik (b) merupakan hasil saringan motif domain *G-patch*.

4.3.2 Analisis Fungsi Gen SON dalam proses Apoptosis dan Migrasi Sel A549

Susulan daripada hasil kajian *in silico* fungsi gen *SON* yang dapat mengenalpasti penglibatan protein ini dalam pengikatan DNA dan RNA, kajian ini diteruskan untuk menentukan fungsi biologi gen *SON* yang lain yang mempengaruhi pertumbuhan kanser sel A549 dengan menggunakan asai apoptosis (Caspase-glo 3/7) dan asai migrasi (Radius™ 24-well cell migration assay).

Rajah 4.17 menunjukkan kesan penindasan ekspresi gen *SON* yang memberikan kesan apoptosis pada sel A549. Peratusan sel yang mengalami apoptosis adalah hampir sama dengan keputusan penskrinan siRNA iaitu sekitar lingkungan pengurangan 32% sel berbanding dengan kawalan. Selain menunjukkan kesahihan keputusan penskrinan siRNA, ia juga menunjukkan bahawa gen *SON* mengambil peranan dalam merangsangkan apoptosis pada sel A549.



Rajah 4.17 Hasil penerapan keputusan susulan daripada kesan perencatan gen *SON* yang dilakukan secara triplikasi ke atas aktiviti apoptosis titisan sel yang diukur dengan menggunakan asai apoptosis *Caspase-Glo 3/7*, $p = 0.0031$.

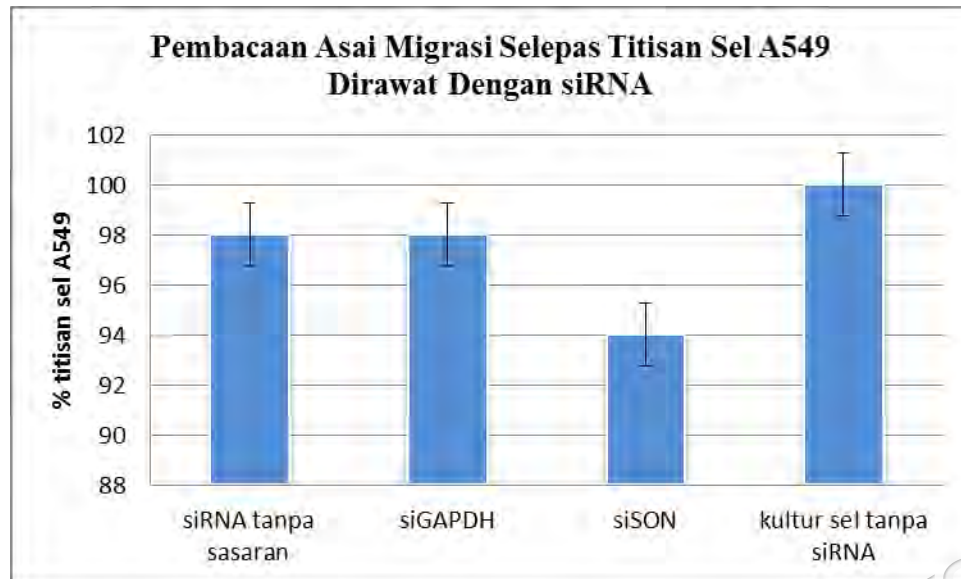
Sebab utama fungsi gen *SON* diuji dengan lebih lanjut menggunakan asai apoptosis adalah kerana di dalam pangkalan data GenCard menyatakan bahawa berkemungkinan fungsi biologi gen *SON* adalah terlibat dalam aktiviti anti-

apoptotik, manakala pada ujikaji pencarian domain secara *in silico* dengan menggunakan perisian SBASE dan pangkalan data Pfam menunjukkan gen *SON* mempunyai kebarangkalian yang tinggi memainkan peranan dalam aktiviti pengikatan DNA dan RNA.

Seperti yang dilakukan pada kajian asai viabiliti sel, parameter ujian dan jumlah sel A549 dikekalkan. Akan tetapi perubahan dilakukan pada ujikaji kawalan dimana penambahan gen kawalan *Bcl-2* sebagai kawalan positif tambahan, dimana gen ini telah dibuktikan terlibat dalam aktiviti anti-apoptotik di dalam kajian-kajian lepas malahan ujian ubat khas yang direka untuk menyekat aktiviti gen *Bcl-2* telah memasuki ujian klinikal tahap ke-II (Vogler et al. 2008).

Rajah 4.17 menunjukkan kesan perencatan ekspresi gen *SON* dalam sel A549 yang meningkatkan aktiviti apoptosis. Perbandingan antara titisan sel A549 yang dirawat dengan si*BCL-2* dan si*SON* mendapati bahawa perencatan kedua-dua gen ini menyebabkan peningkatan apoptosis pada sel yang tidak jauh berbeza. Ini bermaksud perangsangan pengaktifan kaspase 3/7 yang disebabkan oleh penindasan fungsi gen *BCL-2* dan *SON* berkemungkinan terletak pada tapak jalan anti-apoptotik yang berkaitan.

Salah satu ciri utama penyakit kanser adalah kebolehan kanser sel merebak ke tisu atau organ yang berlainan melalui proses yang dikenali sebagai metastasis. Kebolehan istimewa kanser sel melakukan migrasi dan invasi sel sering kali dikaitkan dengan gen-gen tertentu seperti *VEGF* dan *EGFR*. Dengan ini fungsi *SON* telah dikaji kebolehannya mempengaruhi proses migrasi sel A549 sekiranya pengekspresan *SON* ditindas. Rajah 4.18 merupakan keputusan ujian penentuan kelibatan gen *SON* dalam proses migrasi dengan menggunakan asai migrasi. Didapati bahawa perencatan pengekspresan gen *SON* mengurangkan migrasi titisan sel A549 sebanyak 16%. Keputusan ini sejajar dengan fungsi gen *SON* yang dilaporkan dalam *Gene Ontology* di mana gen ini terlibat dalam proses apoptosis.



Rajah 4.18 Keputusan pengujian fungsi gen *SON* dengan menggunakan asai migrasi yang dilakukan secara triplikasi ($p = 0.0041$).

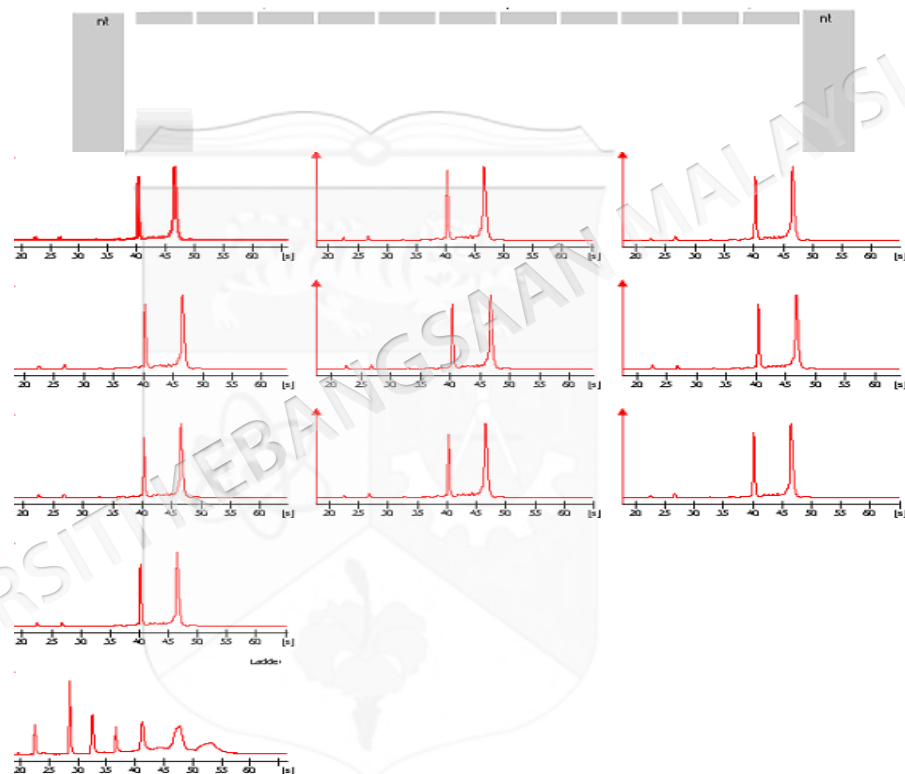
4.4 ANALISIS MIKROATUR SEL A549 DEFISIEN SON

Daripada analisis fungsi *SON* didapati penindasan gen ini meningkatkan apoptosis sel kanser A549 serta mengurangkan proses migrasi sel. Kajian terperinci diteruskan dengan menggunakan pendekatan mikroatur agar gambaran yang lebih menyeluruh dalam konteks proses biologi serta tapak jalan biologi molekul gen *SON* dapat diperolehi.

4.4.1 Pengekstrakan RNA dan Hibridasi Mikroatur DNA

Untuk menilai jaringan gen-gen yang dikawal oleh *SON*, eksperimen mikroatur dilakukan. RNA telah diekstrak daripada titisan sel A549 daripada sampel kawalan yang tidak dirawat dengan siRNA dan sampel yang telah dirawat dengan siSON selama 48 jam. Kedua-dua sampel kajian diulangi sebanyak empat kali menjadikan keseluruhan mempunyai lapan sampel mikroatur. Kuantiti dan kualiti RNA ditentukan dengan kaedah Nanodrop. Integriti RNA ditentukan menggunakan Bionalayzer (lihat Rajah 4.19). Keberkesanan hibridisasi RNA terlabel dengan prob DNA mikroatur bergantung pada saiz RNA komplementari tindakbalas transkripsi in vitro. Taburan saiz purata RNA komplementari ditentukan

menggunakan cip mikrofluidik RNA Nano dan Perisian mRNA smear Bioanalyzer (lihat Rajah 4.19). Kepekatan populasi RNA yang diperolehi daripada kelapan-lapan sampel kajian secara puratanya adalah 3500ng/ μ L. Ketulinan sampel RNA adalah antara 1.8 hingga 2.1 mm (A260/A280). Manakala integriti RNA adalah di antara nilai 7 hingga 9 (Rajah 4.19).



Rajah 4.19 Elektroferogram dan imej gel RNA total daripada RNAi SON dan kawalan.

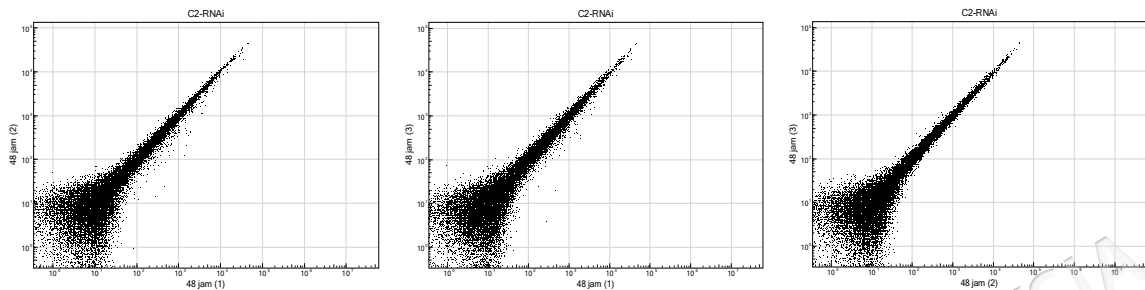
Nota: Imej gel dan elektroferogram *Bioanalyzer* populasi RNA daripada sampel RNAi SON dan kawalan. Kesemua sampel menunjukkan kualiti dan integriti yang baik.

4.4.2 Semakan Kualiti Data Mikroatur

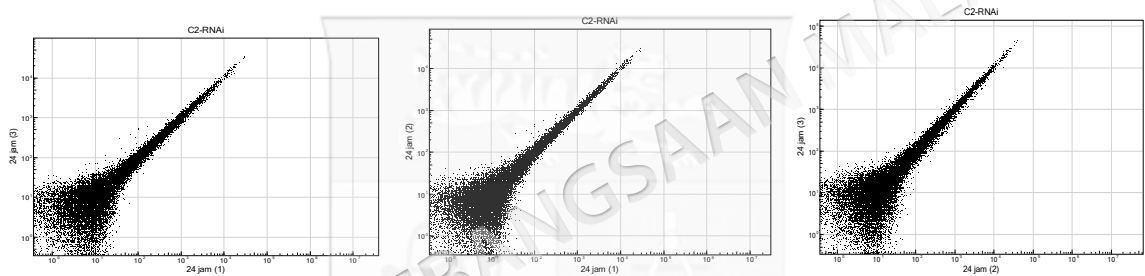
Analisis awal dilakukan oleh Perisian BeadStudio (Illumina). Analisis semakan kualiti (QC) data mikroatur menunjukkan kesemua kawalan dalaman menunjukkan

prestasi yang baik. Plot serakan bagi sampel kajian menunjukkan longgokan isyarat pada paksi 45°. Ini menunjukkan keseluruhan proses penjanaan cRNA, hibridisasi dan pemprosesan cip telah dilakukan dengan baik (lihat Rajah 4.20).

Panel A



Panel B

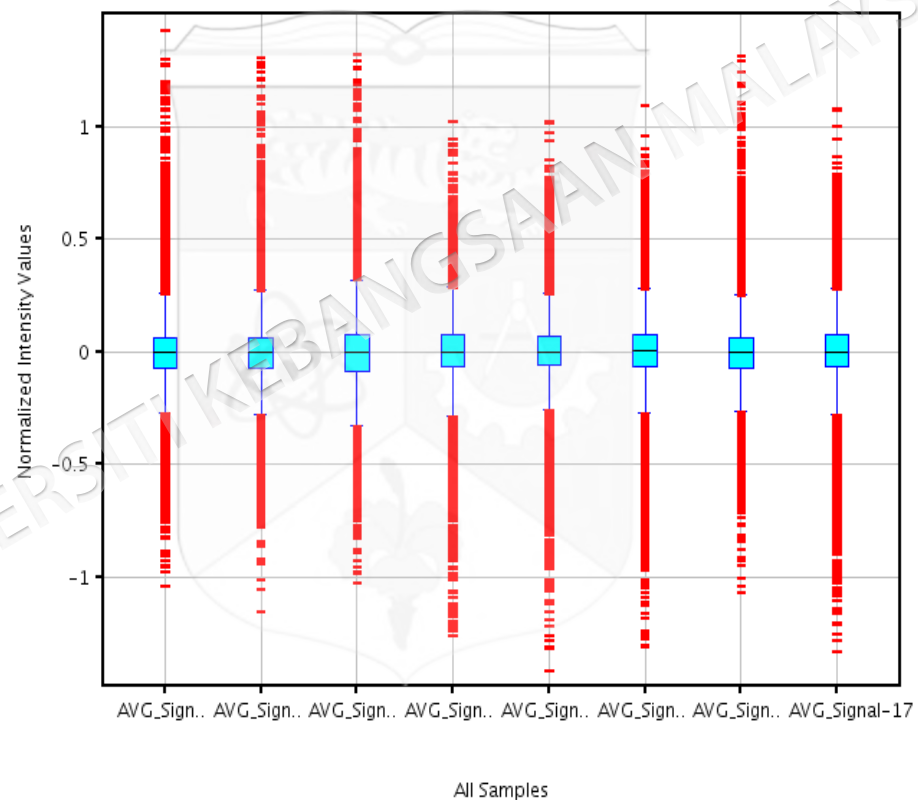


Rajah 4.20 Plot serakan mikroatur. Plot serakan bagi dua keadaan titisan sel A549 yang berlainan (sel yang dirawat dengan siSON dan sel yang tidak dirawat). Rajah merupakan plot sampel RNA A549 titisan sel yang dihibridisasikan ke atas cip mikroatur. Panel A merupakan plot serakan sampel kawalan titisan sel A549 tanpa rawatan siRNA. Panel B merupakan Plot serakan sampel titisan sel yang dirawat dengan siRNA SON. Majoriti isyarat membentuk paksi 45° menunjukkan hibridisasi yang baik.

Nilai purata isyarat bagi setiap transkrip bersama-sama dengan maklumat lain seperti nombor GenBank dan sebagainya dieksport ke Perisian *GeneSpring GX* versi 9 untuk analisis lanjut. Data yang dicerap daripada penskrinan mikroatur DNA dipuratakan oleh Perisian *GeneSpring GX 9.0*. Data yang dipuratakan diperolehi daripada transformasi data dengan kaedah per cip dipuratakan dengan peratusan ke-50 manakala untuk setiap gen adalah dipuratakan dengan nilai min dan median setiap gen. Pengawasan kualiti untuk kajian pengekspresan gen ini dinilai dengan memerhatikan plot kotak Whisker dan analisis prinsip komponen (PCA) (Rajah

4.21). Selepas normalisasi dan penapisan, sebanyak 15,449 gen hadir dalam dua komponen yang hadir dan ditandakan sebagai hadir dan marginal (Rajah 4.21 (a)). Berdasarkan plot kotak Whisker, didapati purata taburan yang diwakili oleh garis melintang di dalam kotak biru serta titik pertengahan yang diwakili kotak merah panjang bagi semua cip mikroatur adalah sama dan menghampiri 0. Manakala melalui pemerhatian pada plot PCA (Rajah 4.21 (b)), pengekspresan gen-gen antara dua kumpulan sampel kajian mempunyai perbezaan yang ketara dari segi pengekspresan gen dengan pembentukan dua kelompok kumpulan gen yang berasingan.

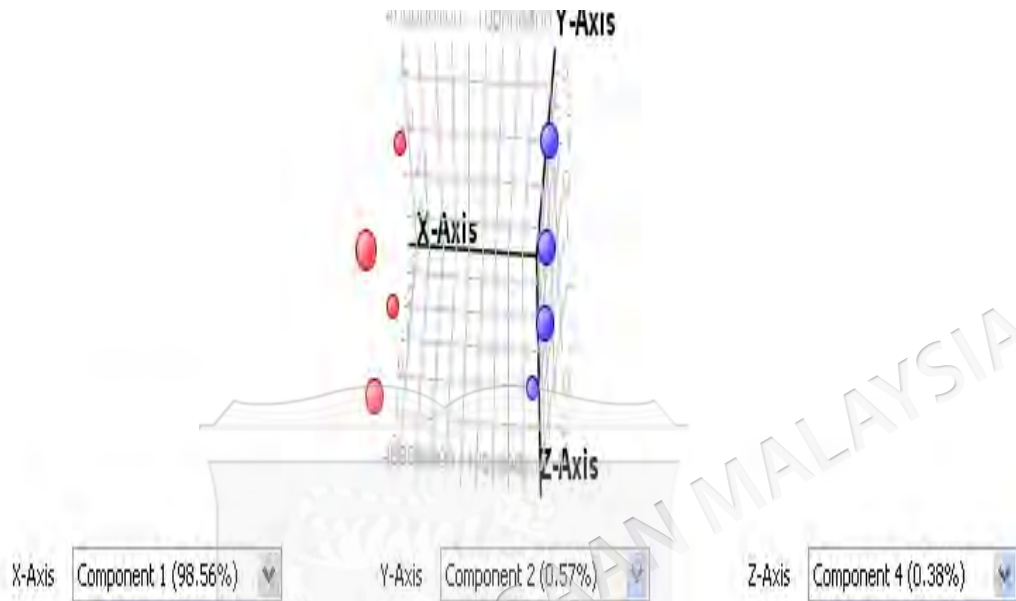
a. Plot Kotak Whisker



bersambung...

...sambungan

b. Analisis Komponen Prinsipal (PCA)



Rajah 4.21 Plot pengawalan kualiti hasil pencerapan ujikaji pengekspresan gen. Plot A merupakan Plot Kotak Whisker yang diperolehi daripada sejumlah gen yang telah melepasi analisis *Filter by present and marginal*. Plot B – merupakan analisis komponen prinsipal (PCA) yang menunjukkan taburan pengekspresan gen yang berlainan dan dikelompokkan kepada dua gugusan yang berlainan.

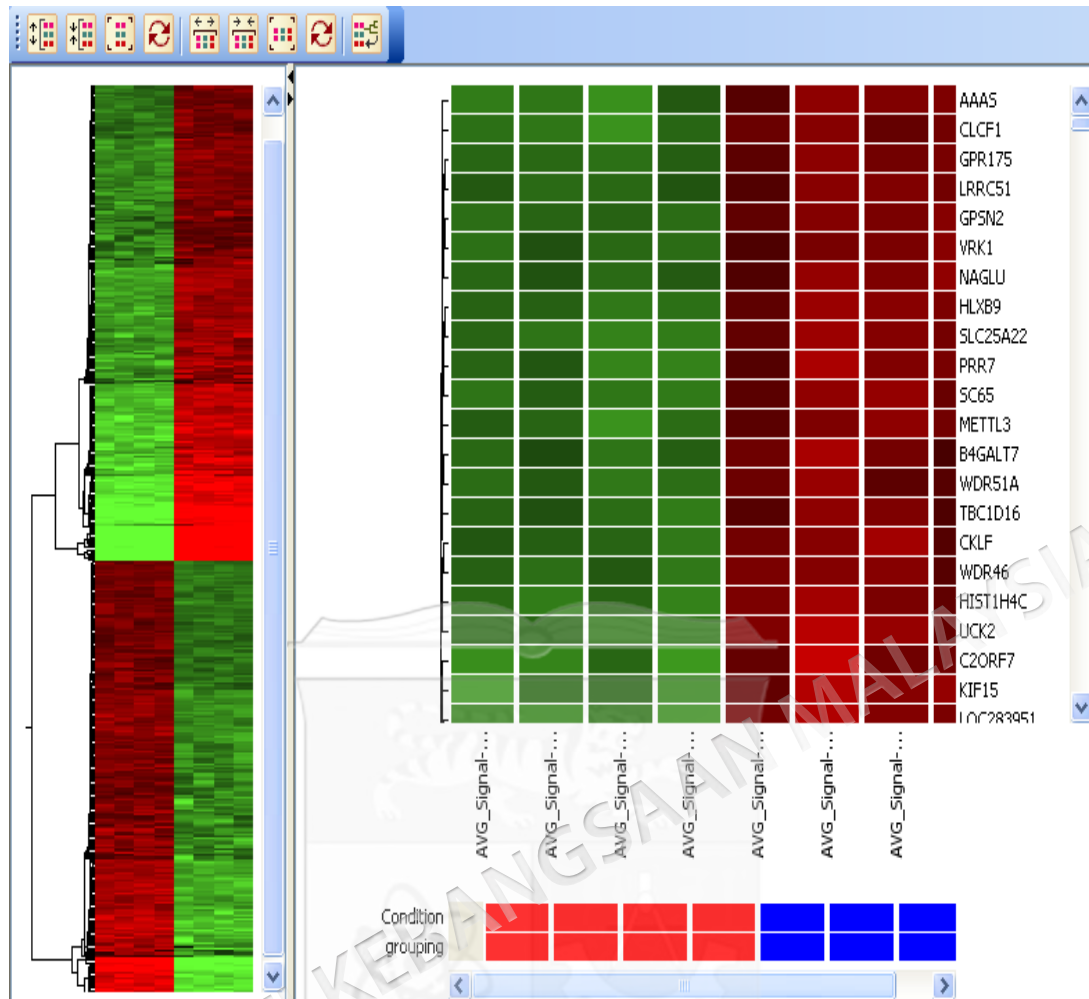
Analisis statistik ujian t tak parametrik pada nilai $p \leq 0.001$ dilakukan bersama-sama dengan pemilihan ujian pengiraan tidak bersimetri dan ujian pelbagai pembetulan Benjamin-Hochberg. Senarai gen yang diperolehi ditapis lagi dengan pemilihan parameter perubahan pengekspresan dengan nilai $p < 0.0001$. Hasil analisis statistik ujian-t tak parametrik memaparkan sebanyak 2847 gen yang mempunyai perbezaan pengekspresan antara sampel rawatan dan kawalan pada nilai $p \leq 0.0001$ (Rajah 4.22). Apabila parameter perubahan ekspresi gen dua kali ganda atau lebih digunakan, hanya 336 gen diekspreskan mengalami penurunan pengekspresan pada tahap berbeza secara signifikan antara titisan sel A549 yang dirawat dengan siSON berbanding dengan sel A549 kawalan. Apabila kadar pengesanan palsu, FDR (*false discovery rate*) dinaikkan kepada 0.1% (nilai $p =$

0.001) dan parameter bilangan kali ganda kadar perubahan pengekspresan gen dikekalkan, dua kali ganda, bilangan perbezaan pengekspresan gen yang didapati tidak berubah iaitu sebanyak 336 gen.

Differential Expression Analysis Report						
Test Description						
Selected Test : T Test unpaired						
p-value computation: Asymptotic						
Multiple Testing Correction: Benjamini-Hochberg						
Result Summary						
	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0....	P < 0....
FC all	13332	6197	5322	4715	4159	2847
FC > 1.1	6242	5711	5147	4623	4116	2839
FC > 1.5	1315	1315	1315	1315	1315	1291
FC > 2.0	336	336	336	336	336	336
FC > 3.0	60	60	60	60	60	60
Expekte...		309	106	47	20	2

Rajah 4.22 Keputusan analisis ujian t tak-parametrik dengan ujian Benjamini Hochberg dengan pelbagai nilai p dan bilangan kali ganda perubahan pengekspresan gen (FC) antara sampel yang dirawat dengan siSON dan sampel kawalan.

Rajah 4.23 menunjukkan pengklusteran hieraki antara pengekspresan sampel kawalan dan sampel yang dirawat dengan siSON. Hasil analisis menunjukkan perubahan pengekspresan gen dalam sampel yang dirawat dengan siSON dapat dibahagikan kepada dua kelompok kumpulan gen secara jelas.



Rajah 4.23 Analisis pengklusteran hieraki mengelompokkan gen-gen yang mempunyai perbezaan ekspresi antara sampel kajian dan sampel kawalan. Warna hijau bermaksud penurunan pengekspresan gen. Warna merah bermaksud peningkatan pengekspresan gen. Kotak berwarna merah merupakan sampel kawalan. Kotak berwarna biru merupakan sampel rawatan.

4.4.3 Analisis Pengayaan Set Gen

Analisis pengayaan set gen (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) membantu memahami fungsi biologi bagi sekelompok gen yang berkaitan kerana setiap satu gen mempunyai rangkaian ikatan dan hubungan yang rumit dimana membolehkannya memainkan peranan dalam pengawalan lebih daripada satu fungsi biologi. Dalam analisis ini, gen-gen yang mempunyai fungsi biologi yang sama akan dikelompok dalam kumpulan set gen yang sama, maka GSEA berkeupayaan mengatasi masalah jumlah data gen yang besar ini kerana ia adalah tertumpu pada set gen sahaja.

GSEA telah dilakukan ke atas 336 gen yang mempunyai kelainan pengekspresan. Jadual 4.5 menunjukkan hasil analisis GSEA dengan nilai $q < 0.3$ dan nilai $p \leq 0.05$. Di dalam jadual 4.5 merupakan senarai gen set yang disenaraikan pada bahagian teratas yang paling signifikasi nilai p apabila 336 gen disaringkan untuk membuat analisis GSEA dengan menggunakan Perisian GeneSpring.

Berdasarkan keputusan saringan set gen (Jadual 4.5), didapati *SON* mempunyai keupayaan untuk menentukan survival kanser sel. Didapati sebahagian besar daripada gen yang menurun tahap pengekspresan gen apabila pengekspresan gen *SON* tertindas adalah terlibat dalam proses kitaran sel. Malahan sekiranya berdasarkan keputusan saringan GSEA sahaja, adalah didapati pengekspresan gen *SON* mungkin berkait dengan survival pesakit kanser paru-paru. Ini adalah kerana set gen ekspresi survival kanser paru-paru Cheng (*Cheng lung cancer survival expression, 2006*) memberikan keputusan saringan yang signifikan ($p = 0.0005$).

Jadual 4.5 Set gen dari koleksi C2:CP:BIOCARTA yang mempunyai skor pengkayaan (ES) positif apabila disaringkan dengan set gen yang mengalami penurunan pengekspresan gen susulan penindasan RNA gen *SON*. (a) merupakan senarai set gen dan (b) merupakan senarai gen di dalam set gen.

a)

Set gen daripada koleksi C2	Jumlah gen dalam set gen	Jumlah gen yang dijumpai	Nilai p
SA_G1 AND SA_DN	139	93	0.0001
GEORGE_CELLS_CYCLE_PATHWAY	262	142	0.0001
CHENG_LUNG_CANCER_SURVIVAL_EXPRESSION	85	22	0.0005
DING_LUNG_CANCER_EXPRESSION_BY_COPY_NUMBER	100	68	0.012

bersambung...

...sambungan

KIM_MYC_AMPLIFICATION_TARGETS_DN	204	74	0.034
----------------------------------	-----	----	-------

b)

Nama gen set	Senarai gen	Profail pengeskpresan gen	Nilai-p
SA G1 and S phase	CDKN2A	Menurun	6.42E-04
	CDKN1A	Menurun	6.42E-04
	CDKN1B	Menurun	2.94E-04
	PRB1	Menurun	6.42E-04
	MDM2	Menurun	5.50E-04
	E2F1	Menurun	2.94E-04
	MDM2	Menurun	3.40E-04
Georges cell cycle	BRCA1	Menurun	3.99E-04
	BCL2	Menurun	3.99E-04
	ERCC3	Menurun	6.16E-04
	NIN	Menurun	3.99E-04
	LMNB2	Menurun	3.09E-04
	RAD51	Menurun	3.99E-03
	PLS3	Menurun	3.09E-03
	NFYA	Menurun	3.99E-04
	DBF4B	Menurun	3.99E-03
	RB1	Menurun	5.39E-03
	PRPF38A	Menurun	6.37E-05
	SMARCB1	Menurun	3.09E-04
	SERTAD2	Menurun	5.69E-03
	CDC73	Menurun	7.01E-03
	NCAPH	Menurun	3.99E-04
	RAD1	Menurun	5.71E-05
	RACGAP1	Menurun	6.16E-04
	HOXA10	Menurun	6.37E-05
	DLG5	Menurun	5.39E-04
	USP1	Menurun	3.09E-05
	CRK	Menurun	5.44E-05
	UVRAG	Menurun	3.99E-04
	RAD21	Menurun	3.99E-04

bersambung...

...sambungan

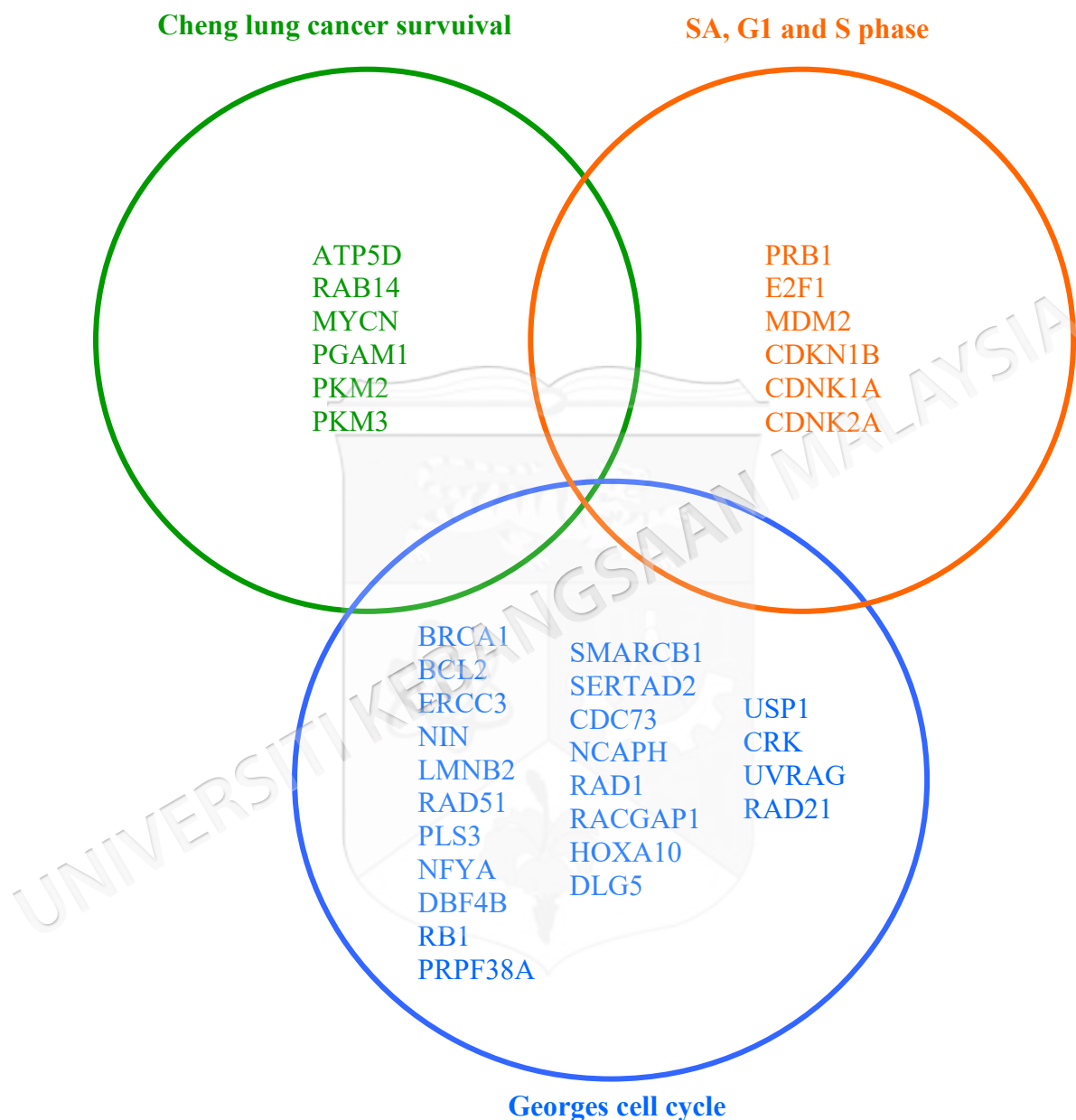
Cheng lung cancer survival expression	PKM3	Menurun	6.52E-06
	PKM2	Menurun	6.19E-06
	PGAM1	Menurun	4.83E-04
	MYCN	Menurun	4.83E-06
	ATP5D	Menurun	4.83E-05
	RAB14	Menurun	4.83E-06

Ekoran daripada keputusan GSEA, gen-gen yang didapati mempunyai pertindihan dengan gen set diekstrak keluar dan disaringkan semula bagi mengenalpasti fungsi biologi gen-gen tersebut. Hasilnya mendapati terdapat persamaan antara mereka iaitu majoriti gen-gen tersebut adalah terlibat dalam tapak jalan kitaran sel.

Penelitian set gen diteruskan dengan melakukan pencarian perpustakaan hasil kajian ke atas set gen tersebut (Jadual 4.5). Set gen *SA G1 and S phase* merupakan kajian mikroatur yang dilakukan ke atas perbezaan pengekspresan gen-gen kitaran sel antara sel normal dan kanser kolon. Set gen Cheng lung cancer survival merupakan hasil kajian perbandingan antara pesakit kanser paru-paru yang berjangka hayat panjang dengan pesakit yang berjangka hayat pendek. Manakala gen set George cell cycle pula merupakan gen set yang dijanakan hasil daripada kajian perbandingan profail pengekspresan gen antara kitaran sel MCF-7 dan sel payudara yang normal.

Bagi mengetahui sama ada wujudnya pertindihan gen-gen antara ketiga-tiga set gen, suatu gambar rajah Venn telah dilukis dan dipadankan (Rajah 4.24). Rajah 4.24 menunjukkan tiada wujudnya pertindihan gen antara ketiga-tiga set gen. Ini secara terusny dapat menunjukkan bahawa gen-gen yang berkait rapat dengan pengurangan pengekspresan gen *SON* merupakan set gen yang berlainan tetapi terlibat secara terus dalam tapak jalan kitaran sel kanser. Susulan informasi yang diperolehi daripada analisa GSEA, secara amnya, dapat dibuat suatu hipotesis bahawa gen *SON* berkemungkinan terlibat dalam fungsi biologi kitaran sel yang mampu berperanan sebagai faktor penentu jangka hayat pesakit kanser paru-paru. Namun, sejauh manakah gen *SON* berupaya memanjangkan jangka hayat pesakit

paru-paru dan bagaimanakah gen *SON* terlibat dalam mekanisme kitaran sel masih belum dapat diselesaikan dengan analisa GSEA.



Rajah 4.24 Tiga gambar rajah Venn dengan setiap satu mewakili set gen berlainan yang diperolehi daripada analisis GSEA. Gen-gen daripada tiga set gen ini digabungkan dan didapati tiada pertembungan gen antara ketiga-tiga set gen.

4.4.4 Analisis Tapak Jalan SON

Fungsi gen *SON* masih tidak difahami secara teliti walaupun analisis GSEA berjaya mengenalpasti beberapa set gen yang berkemungkinan mempunyai fungsi yang berkaitan dengan gen *SON* terutamanya dalam fungsi replikasi sel. Untuk memahami lebih terperinci bagaimana gen-gen ini berinteraksi secara langsung dengan gen *SON*, maka analisis tapak jalan telah dijalankan dengan menggunakan Perisian Pathway Studio 7. Perisian ini berupaya menjalinkan hubungan antara gen-gen dengan berbekal data mikroatur DNA.

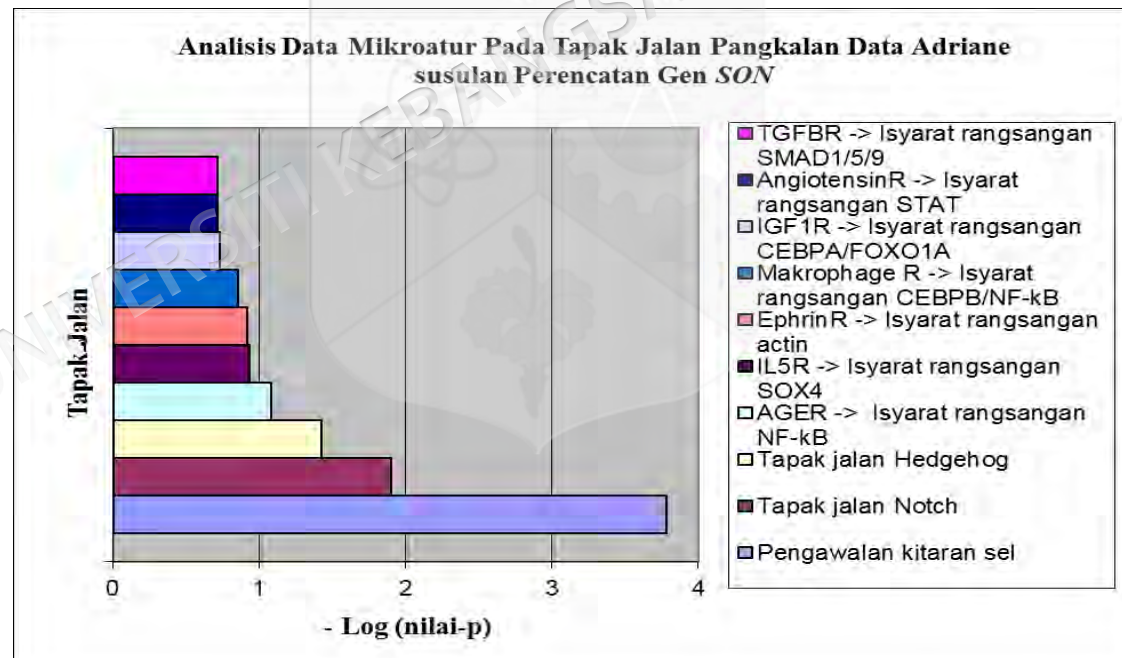
Kesemua 336 gen dari analisis GeneSpring telah diimport ke Pathway Studio 7 bersama-sama dengan data mentahnya. Gen-gen ini dianotasi dengan menggunakan gen dan disaringkan fungsi tapak jalan biologi dengan menggunakan pangkalan data tapak jalan Adriane. Rajah 4.25 merupakan ringkasan keputusan analisa dengan menggunakan pangkalan data tapak jalan pengisyratan Adriane. Analisis ini mendapati bahawa tapak jalan pengawalan kitaran sel menduduki tangga teratas (Jadual 4.6). Keputusan ini adalah selaras dengan hasil analisis GSEA. Ini membuktikan bahawa gen-gen yang dikawal selia ataupun gen-gen yang mempunyai interaksi dengan gen *SON* adalah terlibat dengan tapak jalan biologi kitaran sel.

Selain daripada tapak jalan kitaran sel, hasil saringan 336 gen juga memaparkan bahawa gen-gen ini juga terlibat dengan tapak jalan yang lain (Rajah 4.25). Antara tapak jalan yang menduduki tangga 10 teratas adalah tapak jalan Notch, tapak jalan Hedgehog, tapak jalan isyarat NF-Kb, tapak jalan isyarat SOX 4, tapak jalan isyarat aktin, tapak jalan isyarat CEBPA/NF-Kb, tapak jalan isyarat CEBPA/FOXO 1A, tapak jalan isyarat STAT dan tapak jalan isyarat SMAD1/5/9. Secara keseluruhan kesemua tapak jalan biologi yang melibatkan 336 gen ini adalah berkaitan secara langsung dengan kitaran sel. Akan tetapi yang menarik sekali adalah tapak jalan Notch dan Hedgehog menduduki tangga kedua dan ketiga daripada hasil analisis. Ini berkemungkinan bahawa gen *SON* mengawal gen kitaran sel melalui pengawalan tapak jalan Notch dan Hedgehog ataupun gen *SON* mengawal gen tapak jalan kitaran sel yang mempunyai hubung kait dengan tapak

jalan Notch dan Hedgehog lalu menyebabkan sebahagian gen pada tapak jalan tersebut terjejas.

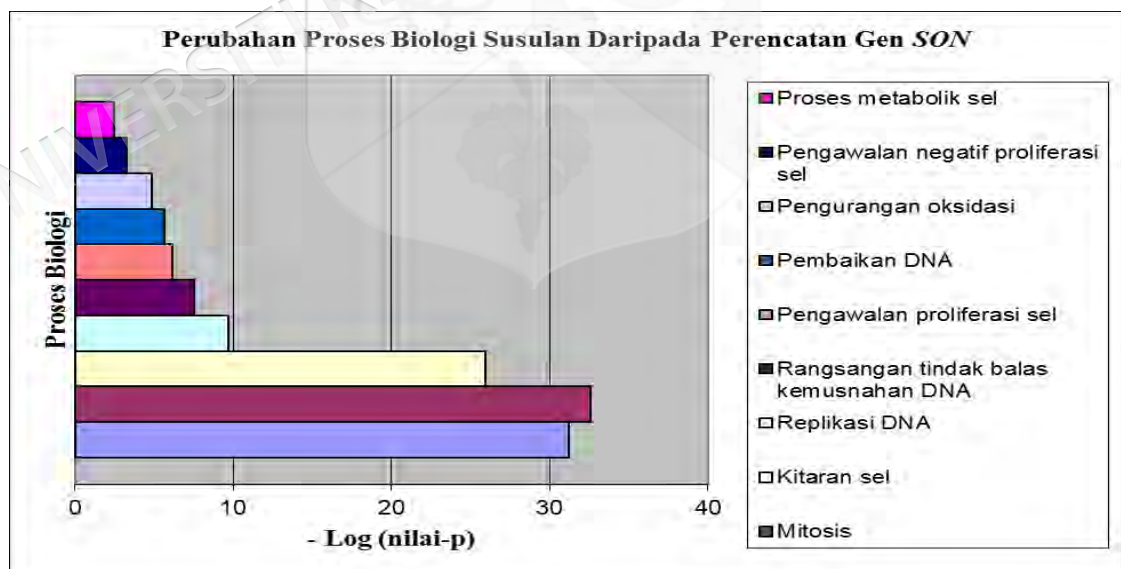
Jadual 4.6 Set gen dari koleksi C2 yang mempunyai skor pengkayaan (ES) yang positif atau yang diperkayakan dalam sel A549 yang mengalami gangguan RNA gen SON.

Set gen daripada koleksi C2	Jumlah gen dalam set gen	Jumlah gen yang dijumpai	Nilai p
CELL_CYCLE_REGULATION	135	90	0.000165
NOTCH_PATHWAY	40	59	0.012684
HEDGEHOG_PATHWAY	17	27	0.037314
AGER_ NF-Kb_ SIGNALING	14	3	0.08255
IL5R_SOX4_ SIGNALING	4	1	0.115822



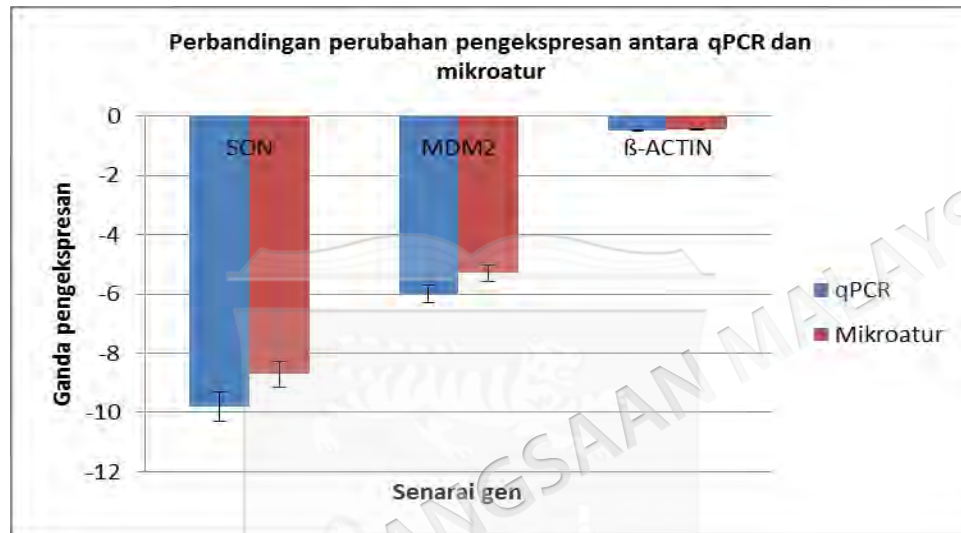
Rajah 4.25 Ringkasan keputusan analisis tapak jalan perisyaratan Adriane hasil saringan 336 gen ke atas pangkalan data Adriane – Pathway Studio 7. Keputusan ini merupakan sepuluh tapak jalan biologi teratas dari jumlah keputusan hasil saringan. Kesemua tapak jalan biologi ini didapati terlibat dalam pengawalan kitaran sel.

Setelah saringan gen ke atas pangkalan data tapak jalan Adriane dilakukan, kesemua 336 gen pula disaringkan ke atas pangkalan data proses biologi Adriane. Rajah 4.26 menunjukkan ringkasan keputusan analisis proses biologi. Di dalam rajah ini memaparkan sepuluh proses biologi yang teratas sekali iaitu proses biologi pembahagian sel, proses mitosis, proses kitaran sel, proses replikasi DNA, proses perangsangan reaksi kerosakan DNA, proses pengawalan kitaran sel, proses pembaikan DNA, proses pengurangan oksidasi, proses pengawalan negatif pembiakan sel dan proses metabolik. Secara keseluruhan tiga proses biologi yang teratas adalah yang paling signifikan. Keputusan ini adalah sejajar dengan hasil analisis GSEA dan keputusan saringan pangkalan data tapak jalan biologi Adriane. Ketiga-tiga proses biologi yang menduduki tangga teratas merupakan proses biologi yang melibatkan tapak jalan kitaran sel. Maka gen *SON* mungkin terlibat dalam tapak jalan kitaran sel dimana ia mungkin terlibat secara langsung dalam fasa M kitaran sel iaitu proses mitosis sel. Seperti yang diketahui, tapak jalan Notch juga terlibat dalam proses pembahagian dan mitosis sel, maka, isyarat tapak jalan Notch berkemungkinan mempunyai hubung kait dengan isyarat tapak jalan gen *SON* dimana hasil analisis menunjukkan terdapat interaksi molekul apabila gen *SON* direncatkan.



Rajah 4.26 Ringkasan keputusan analisis hasil daripada saringan 336 gen ke proses biologi dengan menggunakan pangkalan data *Adriane* melalui *Perisian Pathway Studio 7*. Keputusan ini merupakan sepuluh proses biologi teratas dari jumlah keputusan hasil saringan. Kesemua proses biologi ini didapati terlibat dalam tapak jalan kitaran sel.

Bagi mengesahkan keputusan siRNA-mikroatur yang dilakukan, tiga gen telah dipilih iaitu *SON*, *MDM2* dan β -*ACTIN*. Gen *MDM2* merupakan gen yang terlibat dalam pengawalan negatif isyarat tapak jalan p53. Daripada bacaan ekspresi yang didapati dari qRT-PCR, didapati ketiga-tiga gen ini mempunyai pengekspresan yang hampir sama dengan hasil pencerapan pengekspresan gen di dalam mikroatur cDNA (Rajah 4.26, Jadual 4.7).



Rajah 4.27 Perbandingan perubahan pengekspresan antara qPCR dan mikroatur

Jadual 4.7 Pengiraan perubahan gandaan (FC) daripada analisis tindakbalas rantaian polimerase masa nyata

Gen	Transfeksi siRNA tanpa sasaran	Transfeksi siRNA SON	$\Delta\Delta C_t$	Perubahan gandaan ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Nilai FC (Fold change) pada mikroatur	Ujian T tidak berpasang (nilai p)
<i>SON</i>	19.8	29.6	-9.8	891.44	903.6	0.12
<i>MDM2</i>	23.1	29.1	-6.0	64	66.5	0.23
β - <i>ACTIN</i>	26.7	27.2	-0.5	1.4	1.3	0.43

4.5 PENCERAPAN EKSPRESI PROTEIN SON DALAM NSCLC MENGGUNAKAN MIKROATUR TISU

Analisis fungsi gen dan ekspresi mikroatur telah mendapati gen *SON* memainkan peranan dalam mengawal kitaran sel pada fasa mitosis. Kitaran sel merupakan proses biologi yang diperlukan oleh sel untuk mengandakan kandungan DNA di dalam sel dan seterusnya membolehkan proliferasi sel berlaku. Di dalam kitaran sel kanser ia merupakan suatu kitaran yang tidak terkawal sehingga sel bertambah membentuk tisu yang dipanggil tumor. Bagi menentukan tahap pengekspresan protein SON dalam kes-kes NSCLC, teknik mikroatur tisu telah digunakan untuk membandingkan tahap pengekspresan SON antara sampel NSCLC dan tisu paru-paru normal. Selain daripada itu hubungan antara patologi klinikal tisu kes NSCLC dengan tahap pengekspresan protein SON juga dicerap.

4.5.1 Tahap Pengekspresan Protein SON Dalam NSCLC

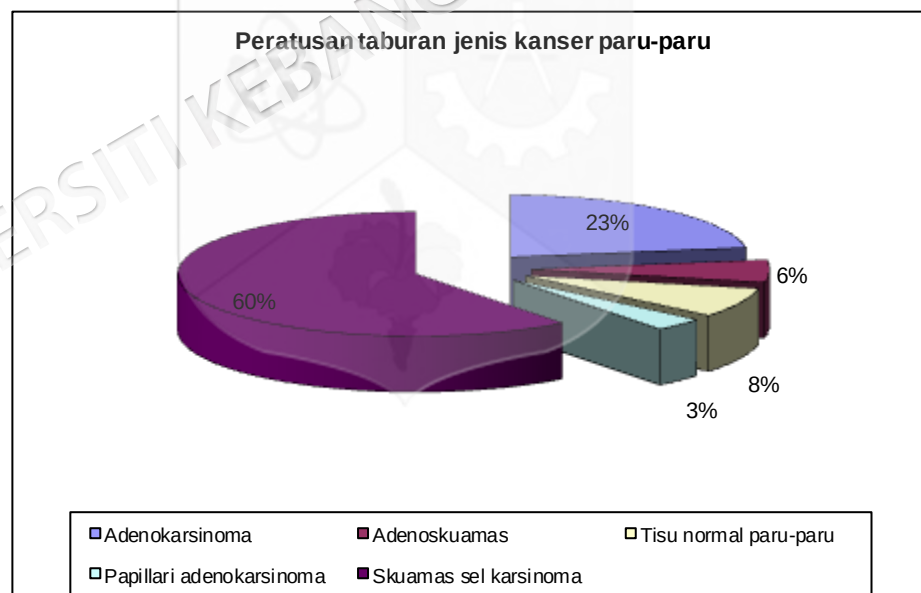
Dalam kajian ini, mikroatur tisu (*tissue microarray*, TMA) telah digunakan. Mikroatur tisu ini diperolehi daripada Biomax (USA) dan ia merupakan slaid kanser paru-paru yang dipotong daripada blok tisu mikroatur kanser paru-paru (BR701). Slaid mikroatur tisu ini terdiri daripada empat jenis tisu NSCLC iaitu adenokarsinoma, adenoskuamas, papillari adenokarsinoma dan skuamas sel karsinoma. Jumlah keseluruhan skor tisu pada slaid TMA ini adalah 209 skor. Slaid TMA yang telah diproses dinilai bawah *light microscope* dan gambar di ambil dengan kamera digital beresolusi tinggi (4k X 3k *pixels*). Slaid TMA telah dinilai oleh dua ahli patologi tanpa diberikan data klinikal dan patologi sampel. Konsep PCI (Positive stained cell index) telah digunakan dalam menilai slaid TMA (Rashmil & Sunil 2013; Qiao et al. 2002).

Jadual 4.8 dan Rajah 4.28 menunjukkan taburan jenis tisu-tisu kanser paru-paru yang terdapat pada slaid TMA dan taburan peratusan tisu kanser pada slaid. Di dalam slaid ini terdapat 47 (22.5%) tisu kanser adenokarsinoma, 12 (5.7%) tisu kanser adenosquamas, 7 (3.3%) kanser papillari adenokarsinoma dan 126 (60.3%) kanser skuamas sel karsinoma. Secara keseluruhan kes tahap 1 kanser paru-paru mempunyai 117 kes, iaitu 56% daripada jumlah kes keseluruhan. Manakala untuk

kes-kes kanser paru-paru tahap II, IIIa dan IIIb adalah masing-masing 41 kes (19.6%), 16 kes (7.7%) dan 16 kes (7.7%). Kes kanser paru-paru tahap empat hanya mempunyai 2 kes (1%) sahaja.

Jadual 4.8 Taburan frekuensi jenis tisu-tisu kanser paru-paru dalam slaid TMA

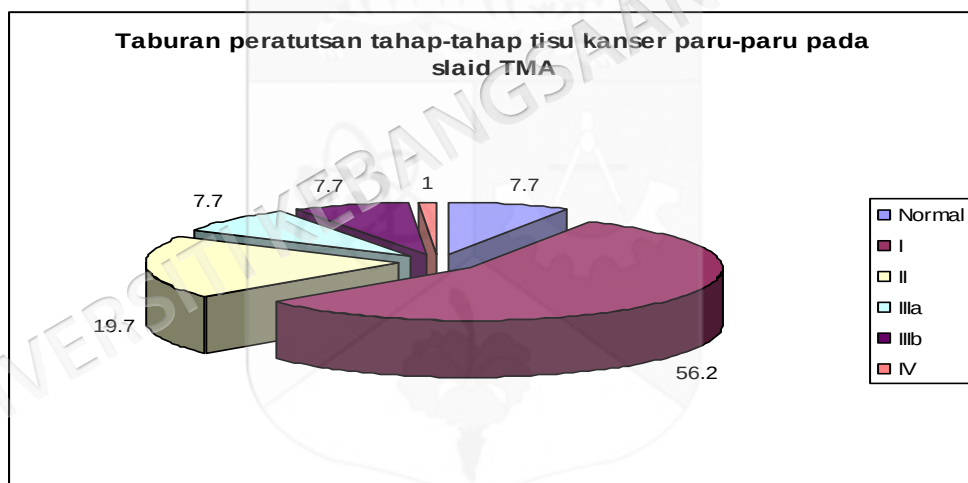
Jenis tisu kanser paru-paru	Frekuensi	Peratusan	Peratusan kumulatif
Adenokarsinoma	47	22.6	22.6
Adenoskuamas	12	5.8	28.4
Tisu normal paru-paru	16	7.7	36.1
Papillari adenokarsinoma	7	3.4	39.5
Skuamas sel karsinoma	126	60.6	100
Jumlah	208	100	



Rajah 4.28 Taburan jenis kanser paru-paru dalam slaid TMA

Jadual 4.9 Taburan frekuensi tahap kanser paru-paru pada slaid TMA.

Tahap kanser	Frekuensi	Peratusan	Kumulatif peratusan
Normal	16	7.7	7.7
I	117	56.2	63.9
II	41	19.7	83.6
IIIa	16	7.7	91.3
IIIb	16	7.7	99
IV	2	1	100
Jumlah	208	100	



Rajah 4.29 Peratusan taburan tahap-tahap kanser paru-paru pada slaid TMA

Slaid TMA kanser paru-paru diwarnakan dengan menggunakan antibodi anti-SON (Abcam®) berkepekatan 1:450. Prosedur perwarnaan antibodi protein pengikat DNA SON adalah mengikut protokol daripada syarikat pembuat antibodi. Pengukuran tahap ekspresi protein SON dalam mikroatur tisu adalah dengan menggunakan sistem penskoran. Jadual 4.10 menunjukkan cara penskoran keputusan protein SON. Skor protein SON diberikan kepada dua bahagian iaitu penskoran tahap perwarnaan protein SON sama ada lemah, sederhana atau kuat dan penskoran mengikut peratusan taburan sel yang mempunyai pengekspresan protein

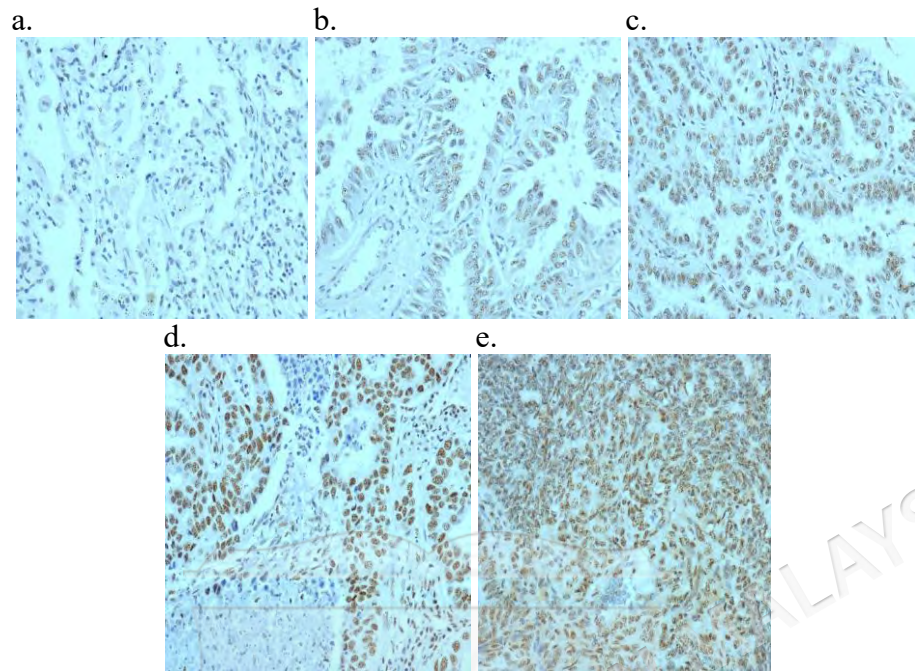
pengikat DNA SON. Setelah penskoran kedua-dua parameter, pengabungan penskoran akan dilakukan dan skor akan diberikan semula mengikut parameter yang direka untuk kajian ini. Bagi kajian ini penskoran kombinasi yang berskor satu bermaksud pengekspresan protein pengikat DNA SON adalah lemah dan skor kedua bermaksud pengekspresan protein SON di dalam tisu kanser paru-paru adalah sederhana. Manakala penskoran ketiga, ataupun skor yang tertinggi bagi kajian ini, bermaksud tahap pengekspresan protein SON adalah tinggi di dalam tisu kanser paru-paru yang dicerap.

Jadual 4.10 Penskoran keputusan protein SON

Pengekspresan protein SON	Skor
Perwarnaannya protein SON	
Lemah	1
Sederhana	2
Kuat	3
Peratusan taburan sel yang mempunyai pengekspresan protein SON	
0 - <25%	1
25 - <50%	2
50 - <75%	3
>75%	4
Kombinasi penskoran	
Skor 0 hingga 1	1 (lemah)
Skor 2 hingga 3	2 (sederhana)
Skor 4 hingga 5	3 (tinggi)
Skor 6 hingga 7	4 (sangat tinggi)

Jadual 4.11 merupakan rumusan keputusan penskoran slaid TMA selepas pencerapan keputusan pewarnaan protein SON yang menggunakan kaedah imunohistokimia. Secara keseluruhan, bagi penskoran TMA mengikut taburan pengekspresan protein SON di dalam tisu kanser paru-paru, didapati terdapat perbezaan antara skor tisu normal, skor tahap satu kanser paru-paru dan skor tahap dua kanser paru-paru. Perbezaan ini dapat diperhatikan pada skor TMA dimana skor meningkat apabila merentasi tahap kanser (Jadual 4.11).

Jadual 4.11 dan Rajah 4.30 merupakan rumusan penskoran slaid TMA mengikut intensiti pewarnaan protein SON. Rajah 4.30 merupakan gambar tisu NSCLC pada slaid TMA yang menunjukkan cara penskoran intensiti pewarnaan protein SON. Intensiti pengekspresan protein SON didapati adalah meningkat mengikut tahap kanser paru-paru NSCLC. Walaupun taburan bilangan sampel antara tahap kanser NSCLC adalah tidak sekata, namun perbezaan yang ketara masih dapat diperhatikan. Taburan pengekspresan gen SON adalah tinggi pada kanser tahap IIIa (68.75%), IIIb (75%) dan IV (100%), Jadual 4.11. Malahan pengekspresan gen SON juga meningkat pada tahap awal kanser NSCLC iaitu 85.5% daripada sampel tisu kanser pesakit yang beradakan tahap I kanser mempunyai pengekspresan gen SON yang sederhana dan tinggi.



Rajah 4.30 Penskoran slaid TMA mengikut intensiti pewarnaan protein pengikat DNA SON di mana gambar a (skor 0), gambar b berskor lemah (skor 1), gambar c dan d berskor sederhana (skor 2) dan gambar e berskor tinggi (skor 3).

Jadual 4.11 Rumusan penskoran slaid TMA mengikut intensiti pewarnaan SON

Tahap kanser paru-paru	Jumlah pesakit (n = 208)	Pewarnaan protein SON		
		Lemah (Skor 1)	Sederhana (Skor 2)	Tinggi (Skor 3)
I	117 (56%)	16 (13.7%)	46 (39.3%)	54 (46.2%)
II	41 (19.6%)	2 (4.9%)	32 (78%)	7 (17.1%)
IIIa	16 (7.7%)		5 (31.25%)	11 (68.75%)
IIIb	16 (7.7%)		4 (25%)	12 (75%)
IV	2 (1%)			2 (100%)
Normal	9 (7.7%)	9 (100%)		
Chi-square test, p-value		0.0015		

Selepas penskoran dilakukan, kedua-dua skor taburan dan intensiti digabungkan dan diskor semula mengikut skor kombinasi rekaan pada Jadual 4.11. Jadual 4.14 merupakan rumusan skor kombinasi yang telah digabungkan dan disenaraikan mengikut tahap-tahap NSCLC. Nilai kombinasi penskoran slaid TMA ditukarkan kepada *Heatmap* dengan menggunakan perisian *TMA-Deconvoluter for Tissue Arrays* yang diperolehi daripada Chih Long Liu et al. 2005 (Jadual 4.13). Berdasarkan *Heatmap* tersebut, keputusan analisis TMA, ia diterjemahkan kepada bentuk graf (Rajah 4.31). Pemerhatian ke atas rajah 4.31 mendapati bahawa pengekspresan SON menjadi ketara apabila tahap tumor semakin meningkat. Manakala pemerhatian pada gred kanser pula fenomena yang sama diperhatikan. Pengekspresan protein SON menjadi lebih banyak apabila tahap kanser meningkat. Akan tetapi, pada tisu normal, didapati protein SON juga diekspreskan tapi dalam jumlah yang tidak banyak. Ini mungkin disebabkan bahawa fungsi gen SON adalah terlibat dalam aktiviti pengawalan kitaran sel dan pada sel normal kitaran sel juga berlaku tetapi dalam keadaan yang terkawal.

Jadual 4.12 Rumusan kombinasi penskoran slaid TMA yang melibatkan gabungan penskoran intensiti pengekspresan gen SON dan peratusan liputan gen SON di dalam slaid.

Peratusan liputan pengekspresan SON	Skor intensiti pengekspresan SON	Skor kombinasi peratusan liputan dan intensiti pengekspresan SON
0-25%	1	1
25-50%	2	2
50-75%	3	3
>75%	3	4

Penganalisaan statistik ke atas TMA dengan menggunakan skor kombinasi antara tisu normal dan tahap-tahap kanser paru-paru menunjukkan ia adalah signifikan dengan ujian statistik Pearson Chi-Square nilai $p = 0.000$ (Jadual 4.13). Ini menunjukkan pengekspresan protein SON boleh dijadikan sebagai penanda biologi untuk menolong mengenalpasti tahap awal kanser paru-paru.

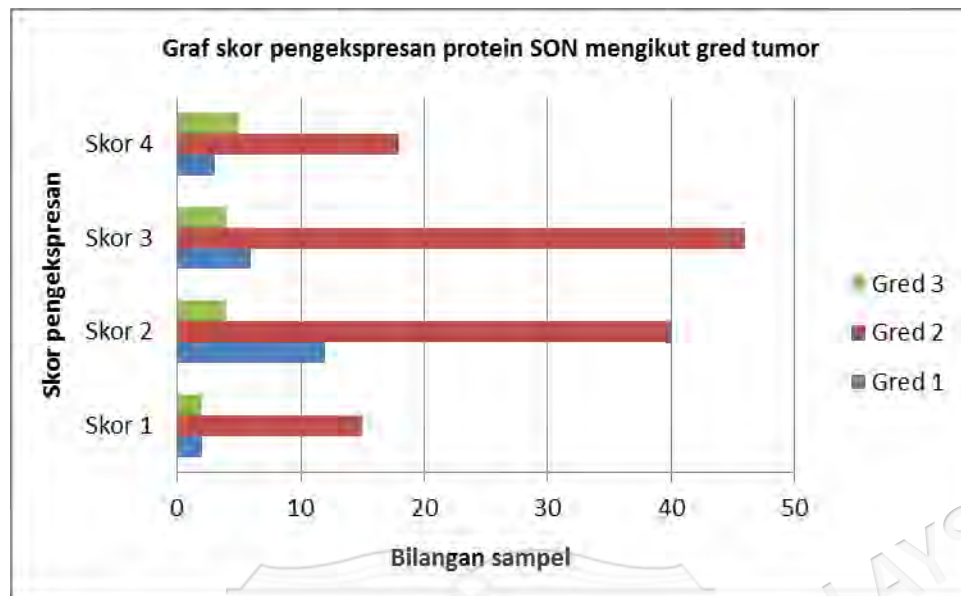
Jadual 4.13 *Heat map* yang dihasilkan dengan pertukaran skor ke warna di mana warna hijau merupakan skor 1, warna kuning merupakan skor 2, warna perang merupakan skor 3 dan warna merah merupakan skor 4. Jadual a merupakan *Heat map* bagi skor (S) dan gred (G) tisu tumor. Jadual b merupakan *Heat map* bagi skor (S) dan tahap (T) tumor.

a)

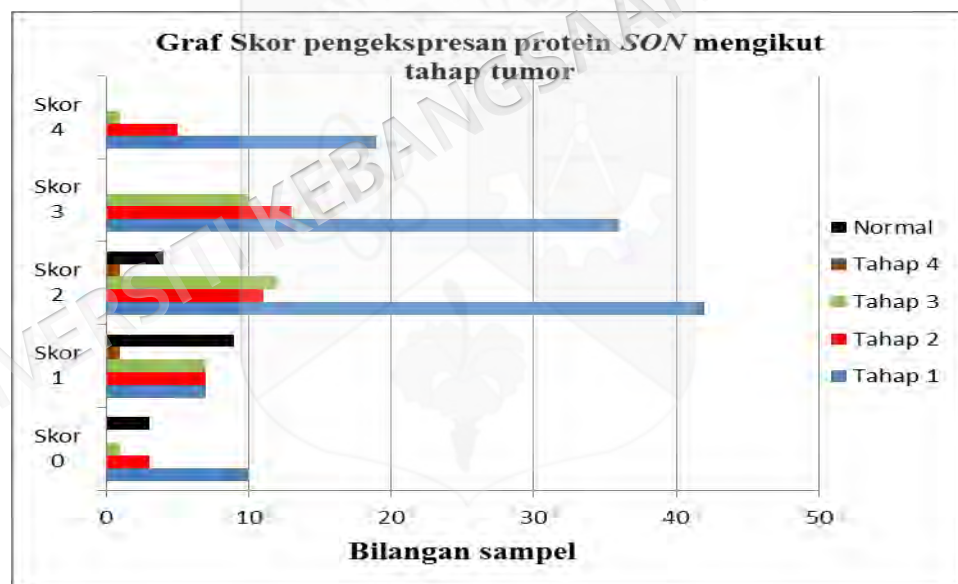
G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S
1	4	2	4	2	3	2	2	2	1	-	3	-	
1	4	2	4	2	3	2	2	2	1	-	3	-	
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	3	-	
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	3	-	
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	3	2	4	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2	1	-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	2		
1	2	2	3	2	3	2	2	2		-	1		
1	2	2	3	2	3	2	2	3	4	-	1		
1	2	2	3	2	3	2	2	3	4	-	1		
1	2	2	3	2	3	2	2	3	4	-	1		
1	2	2	3	2	2	2	2	3	4	-	1		
1	1	2	3	2	2	2	2	3	4	-	1		
1		2	3	2	2	2	2	3	3	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	2	3	3	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	2	3	3	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	2	3	2	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	2	3	2	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	1	3	2	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	1	3	2	-	1		
2	4	2	3	2	2	2	1	3	1	-	0		
2	4	2	3	2	2	2	1	3		-			
2	4	2	3	2	2	2	1	-	4	-			
2	4	2	3	2	2	2	1	-	3	-			

bersambung...

a)



b)



Rajah 4.31 Graf taburan penskoran pengekspresan SON pada slaid TMA mengikut a) gred tumor dan b) tahap tumor. Gred tumor merupakan ukuran tahap keterangan tumor berdasarkan sel normal disekelilingnya yang dilihat di bawah mikroskop. Ia merupakan petunjuk kemungkinan tumor berkembang dan merebak. Tahap kanser merupakan rujukkan kepada saiz atau tahap tumor asal telah merebak di dalam badan. Pengelasan tumor kanser adalah berdasarkan kepada faktor seperti lokasi tumor utama, saiz tumor dan penglibatan nodus limfa (Lung Cancer NICE guideline 2011).

Jadual 4.14 Rumusan kombinasi penskoran slaid TMA yang mengikut peratusan taburan pengekspresan SON dan intensiti pewarnaan protein SON. Jadual a adalah peratusan taburan penskoran mengikut skor dan tahap pada slaid TMA. Jadual b merupakan analisis ujian *Chi-square* pada penskoran dan tahap kanser

a)

Tahap Kanser Paru- Paru	Bilangan pesakit (n = 208) (%)	Kombinasi Skor Pengekspresan SON			
		Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4
I	117 (56%)	12 (10.26%)	44 (37.6%)	44 (37.6%)	17 (14.53%)
II	41 (19.6%)	2 (4.9%)	12 (29.3%)	17 (41.5%)	10 (24.4%)
IIIa	16 (7.7%)		3 (18.75%)	9 (56.25%)	4 (25%)
IIIb	16 (7.7%)		7 (43.75%)	7 (43.75%)	2 (12.5%)
IV	2 (1%)			2 (100%)	
Normal	16 (7.7%)	9 (100%)			

b)

	Nilai	df	Nilai p
Khi-persegi Pearson	41.735(a)	16	0.000
Nisbah kebolehjadian	38.446	16	0.001
Linear persatuan Bilangan kes sahih	6.396 201	1	0.011

4.6 KESAN RAWATAN siSON PADA PERTUMBUHAN TUMOR XENOGRAF

Di dalam kajian ini, gen *SON* telah digunakan sebagai sasaran terapi novel bagi penyakit NSCLC dimana gen ini telah memberikan keputusan yang memberangsangkan di dalam kajian in vitro. Objektif utama kajian ini adalah untuk membuktikan keberkesanan siSON menindas pertumbuhan tumor di dalam model tikus, yang juga mewakili model manusia, apabila pengekspresan mRNA gen ini ditindas oleh siRNA. Beberapa anggapan telah digariskan di dalam kajian ini iaitu:

- a. Tiada tindak balas imuniti di dalam tubuh tikus nude terhadap titisan sel A549.
- b. Mikro-persekitaran di dalam tubuh tikus nude adalah sama antara satu sama lain dan menghampiri mikro-persekitaran pesakit kanser.
- c. Genotip dan fenotip bagi mencit adalah sama antara satu sama lain.

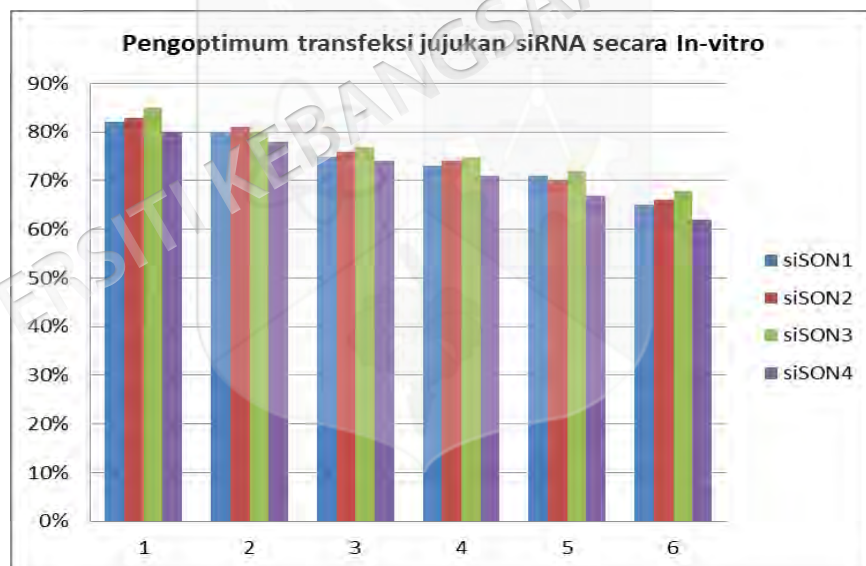
Oleh kerana gen *SON* telah dikenalpasti sebagai sasaran terapi yang berpotensi di dalam kajian in vitro, maka kajian in vivo dilakukan untuk membuktikan dengan lebih lanjut bahawa kehilangan fungsi gen *SON* pada model xenograft tikus *nude* dapat mengurangkan pertumbuhan tumor berbandingkan dengan kawalan serta membuktikan bahawa perencatan gen *SON* dapat membantut saiz pertumbuhan tumor yang rancak membesar.

Merujuk pada jadual 3.3 yang merupakan carta aliran rumusan metodologi kajian in vivo ini dimana langkah pertama adalah mengenalpasti jujukan siRNA yang memberikan keputusan penindasan gen yang paling optimum. Kedua adalah penentuan dos yang diperlukan untuk tujuan rawatan. Ketiga adalah proses transplan xenograf titisan sel A549. Seterusnya adalah proses rawatan mencit yang berlangsung selama sebulan dengan menggunakan siRNA yang dipilih dan dos yang telah ditentukan.

Langkah pemilihan jujukan siRNA yang digunakan dalam rawatan in vivo adalah penting untuk memastikan kejayaan penindasan pengekspresan gen. Penggunaan jujukan siRNA yang berlainan pada sesuatu gen akan menyebabkan

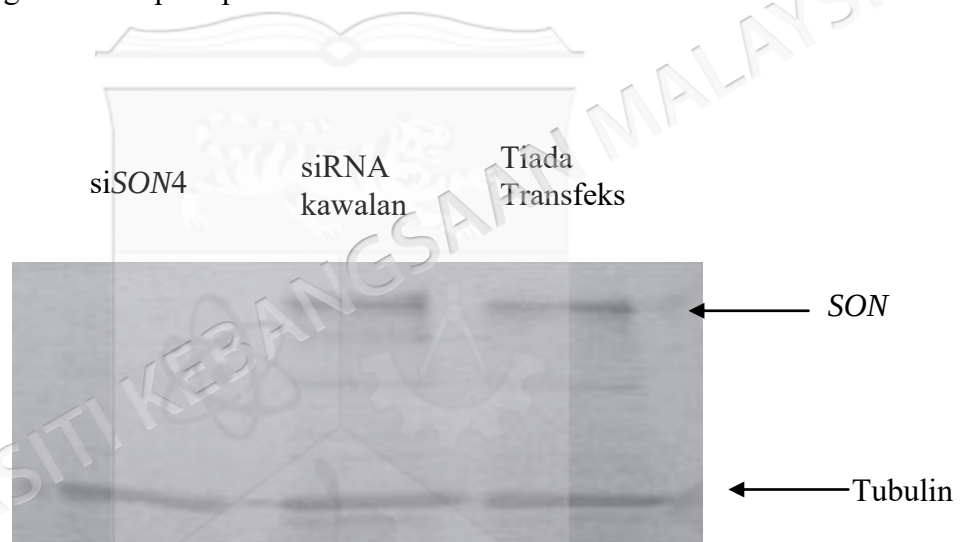
tahap pengekspresan gen yang berbeza diperolehi. Keberkesanan siRNA menindas pengekspresan gen amat bergantung kepada kekuatan pembentukan kompleks RISC oleh jujukan siRNA. Walaupun penggunaan lebih daripada tiga jujukan siRNA dalam kajian in vivo amat digalakkan namun pendekatan ini memerlukan banyak kos, masa serta langkah penyediaan.

Pengoptimuman transfeksi siRNA dilakukan secara in vitro pada titisan sel A549 dengan menggunakan empat jujukan siRNA yang berlainan. Setiap ujikaji dimulakan dengan 1×10^5 sel A549 setiap satu flaks kultur 75 cm^2 dan sel ditransfeksi dengan anti-SON siRNA dengan kepekatan 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM dan 300 nM pada setiap jujukan siRNA (Rajah 4.32). Berdasarkan kajian yang dilakukan mendapati jujukan siSON4 menghasilkan penindasan proliferasi sel A549 yang paling tinggi berbanding dengan jujukan siRNA yang lain (Rajah 4.32).

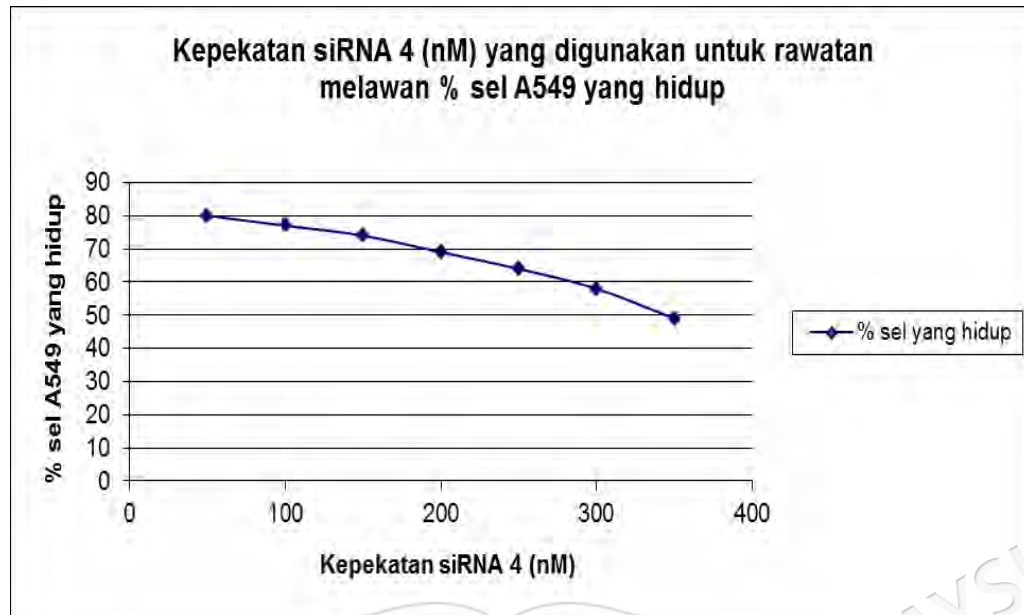


Rajah 4.32 Pengoptimuman transfeksi jujukan siRNA secara in-vitro dengan menggunakan empat jujukan siRNA gen SON yang berlainan. Paksi Y merupakan peratusan sel A549 yang hidup selepas transfeksi siSON dilakukan. Paksi X merupakan kepekatan siSON yang digunakan untuk transfeksi dengan 1 adalah 50nM, 2 adalah 100nM, 3 adalah 150nM, 4 adalah 200nM, 5 adalah 250nM dan 6 adalah 300nM. Setiap satu siRNA yang digunakan adalah dikulturkan dengan 1×10^5 sel selama 48 jam. Ujian transsfeksi siRNA ini dilakukan sebanyak tiga kali. Nilai p bagi replikasi adalah < 0.023 .

Keputusan penskrinan ini disokong dengan pencerapan pengekspresan gen *SON* yang ditindas oleh *siSON4* dengan menggunakan teknik western blot pengekspresan protein *SON* telah ditindas (Rajah 4.33). Selain menentukan jujukan *siRNA* yang memberikan kesan pengurangan proliferasi sel A549, dos reaksi tindak balas, IC_{50} juga ditentukan (Rajah 4.34). Salah satu kekangan utama dalam kajian *siRNA* secara in-vivo adalah kepekatan *siRNA* yang digunakan dalam transfeksi tidak mencukupi untuk menindaskan pengekspresan gen yang dikaji. Berdasarkan Rajah 4.34 didapati bahawa dos reaksi sel terhadap rawatan *siSON4* mencapai tahap 50% kematian sel adalah pada kepekatan 350 nM. Maka dos 350 nM ini dipilih untuk rawatan tikus *nude* bagi menentukan keberkesanan rawatan *siSON* terhadap transplan xenograf kanser paru-paru.



Rajah 4.33 Pengekspresan protein *SON* yang ditindas dengan *siSON4* yang dicerap dengan menggunakan teknik western blot.

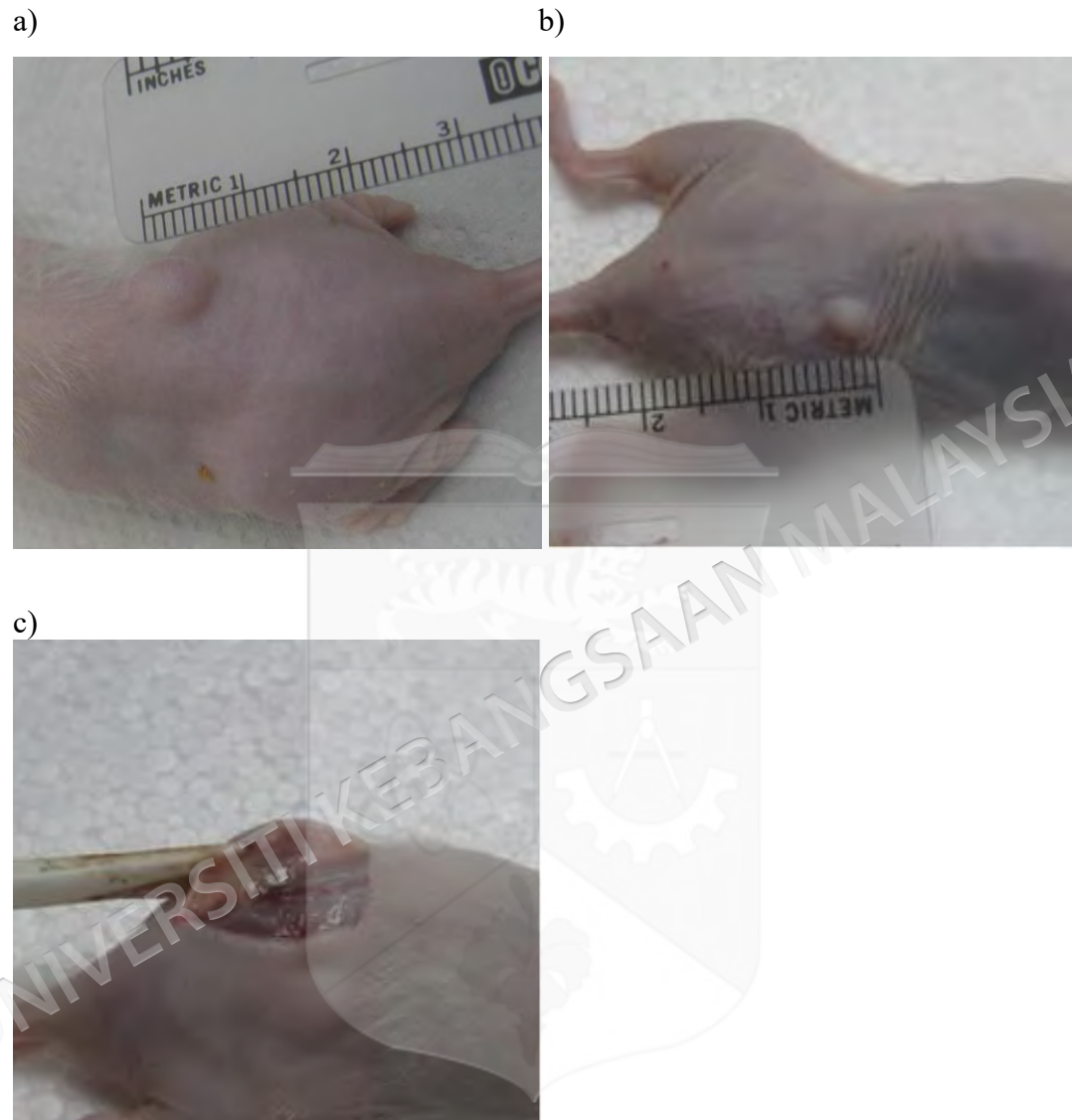


Rajah 4.34 Dos reaksi tindak balas bagi siSON4 menggunakan tujuh jenis kepekatan, 50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM dan 350nM. Setiap satu kepekatan siSON4 diulangi sebanyak tiga kali dan dikulturkan bersama-sama dengan 1×10^5 sel. Nilai p bagi replikasi adalah < 0.036 .

Kajian *in vivo* siSON dilakukan dengan menggunakan tikus *nude* (*nude mice*). Tujuan utama menggunakan tikus *nude* di dalam kajian ini adalah kerana tikus jenis ini tidak mempunyai sistem imuniti yang berfungsi. Maka penjagaan tikus jenis ini haruslah rapi dan cermat. Tikus yang diperolehi daripada BioLASCO Taiwan Co. Ltd. secara puratanya adalah berumur 6 minggu. Tikus diletakkan pada sangkar IVC (*Individual Ventilated Cage system*) sepanjang kajian dilakukan. Empat kumpulan tikus telah dibahagikan dengan setiap kumpulan mengandungi tiga ekor tikus (Rajah 4.40). Jangka masa pertumbuhan tumor sehingga saiz purata 0.6 cm mengambil masa selama 3 minggu. Rawatan siRNA dilakukan secara suntikan intratumoral bersama-sama dengan Atelogen (ReproCell®) di mana Atelogen merupakan kolagen estrakkan yang digunakan sebagai agen transfeksi siSON4.

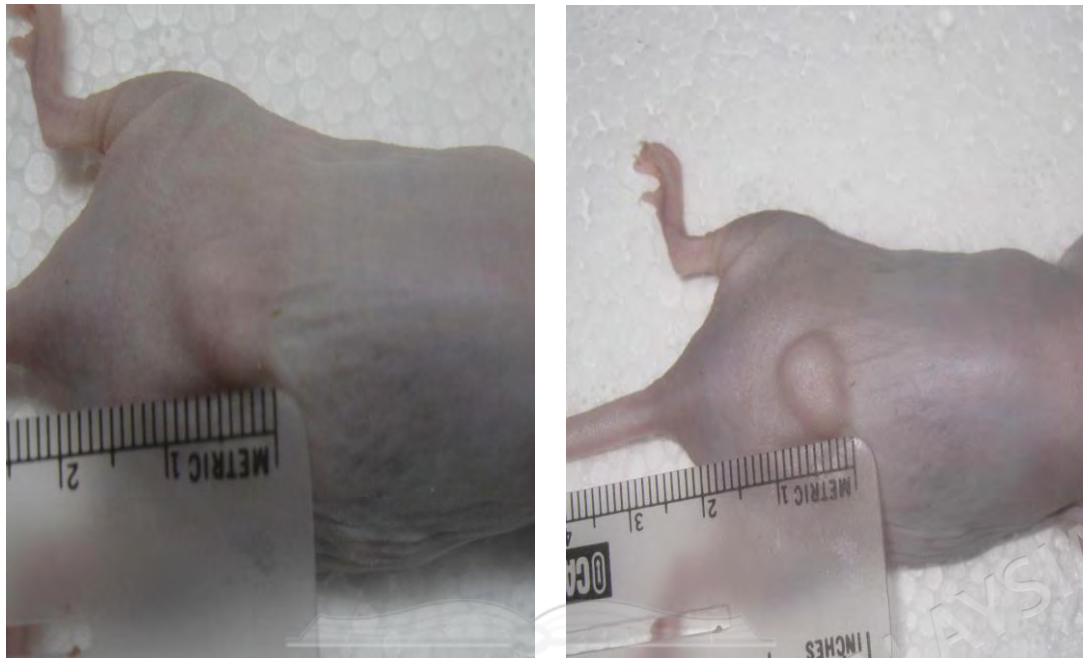
Rawatan siSON dilakukan dengan dos 350 nM setiap tiga hari sekali selama tiga minggu. Pencerapan keputusan rawatan siSON4 dilakukan dengan menggunakan model pertumbuhan kinetik tumor yang berdasarkan pengukuran saiz tumor setiap tiga hari sekali. Pengiraan pertumbuhan kinetik tumor adalah

berdasarkan persamaan $TV = L \times W \times H$, di mana TV merupakan isipadu tumor, L merupakan panjang, W merupakan ketebalan dan H merupakan ketinggian.



Rajah 4.35 Keputusan rawatan siSON4 pada tumor A549 yang telah ditransplan secara subkutin pada tikus *nude*. Gambar a merupakan tikus *nude* yang membawa tumor A549 sebelum rawatan dimulakan. Gambar b merupakan gambar selepas rawatan siSON4. Gambar c merupakan pemerhatian bawah kulit tikus *nude* yang telah dirawat dengan siSON4.

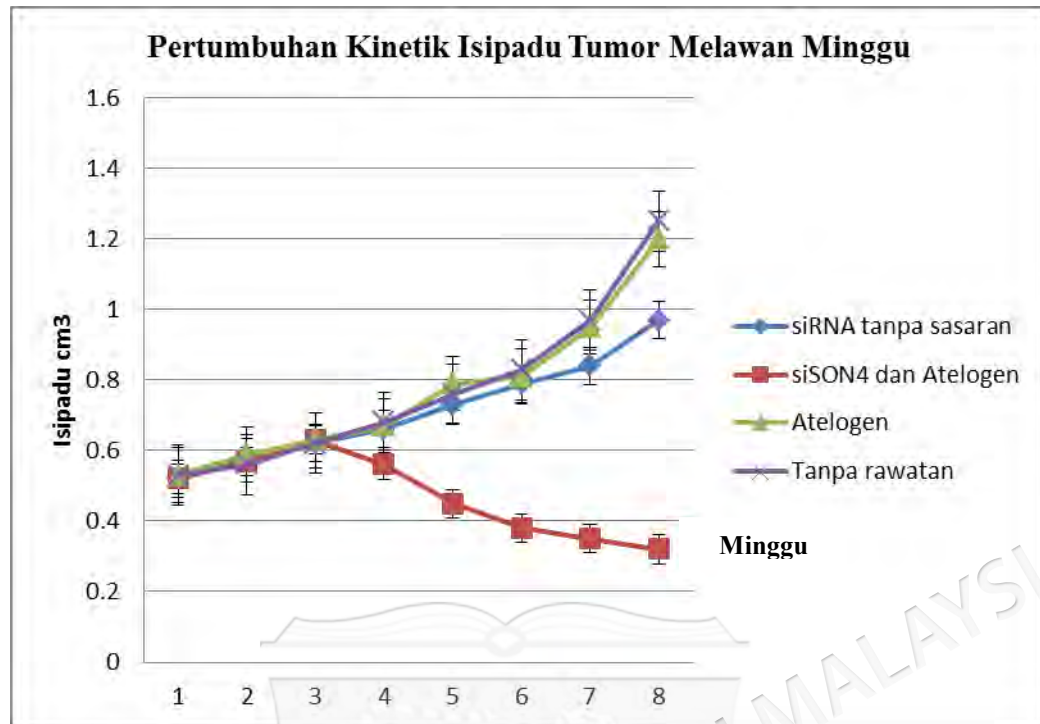
a) b)



c)



Rajah 4.36 Keputusan rawatan kawalan, siRNA tanpa sasaran pada tumor A549 yang telah ditransplan secara subkutin pada tikus *nude*. Gambar a merupakan tikus *nude* yang membawa tumor A549 sebelum rawatan dimulakan. Gambar b merupakan gambar selepas rawatan siRNA tanpa sasaran. Gambar c merupakan pemerhatian bawah kulit tikus *nude* yang telah dirawat dengan siRNA tanpa sasaran.



Rajah 4.37 Pertumbuhan kinetik tumor antara empat jenis kumpulan tikus *nude* yang menerima rawatan yang berlainan. Perbandingan statistik antara kumpulan rawatan siSON4 dan Atelogen adalah ketara dengan nilai $p = 0.0016$.

Pada kumpulan tikus *nude* yang dirawat dengan atelogen dan siSON yang berkepekatan 350 nM (0.35mg kg^{-1}) didapati menunjukkan perbezaan yang signifikasi (pengurangan $1.0 \pm 0.6\text{cm}^3$; $p < 0.0016$) apabila dibandingkan dengan kumpulan tikus dirawat dengan Atelogen sahaja bagi bacaan yang terakhir (Rajah 4.37). Manakala bagi kumpulan tikus yang dirawat dengan siRNA tanpa sasaran didapati saiz tumor terus menambah tetapi mempunyai sedikit kekurangan saiznya berbanding dengan kumpulan kawalan yang lain iaitu pengurangan $0.2 \pm 0.05\text{cm}^3$ (Rajah 4.37). Walaupun begitu pengurangan saiz tumor adalah tidak bererti bila dibandingkan dengan kumpulan tikus yang dirawat dengan atelogen ($p < 0.35$) dan kumpulan tikus tanpa rawatan ($p < 0.23$). Tikus yang dirawat dengan atelogen dan siRNA tanpa sasaran dan tikus yang tidak dirawat saiz tumor terus bertambah (penambahan $6.0 \pm 0.5\text{ mm}$).

Suatu keputusan yang menarik telah diperolehi dalam kajian ini iaitu ketiga-tiga kumpulan tikus kawalan yang membawa transplan titisan sel A549 secara xenograf mempunyai jenis tumor yang menembus masuk ke dalam bahagian dermis

tisu (Rajah 4.36) dan membentuk saluran darah. Keputusan ini tidak dapat diperhatikan pada kumpulan tikus rawatan (Rajah 4.35). Keputusan ini hampir selaras dengan kajian *in vitro* fungsi gen *SON* dengan menggunakan asai migrasi (Rajah 4.18). Dalam permulaan proses angiogenesis, sel-sel tumor haruslah berkeupayaan bertumbuh merentasi membran endothelial dan berhijrah untuk mendapatkan sumber nutrisi seperti faktor pertumbuhan sel agar ia boleh bertumbuh dengan subur. Dalam menilai keupayaan angiogenesis sel, asai migrasi pada kebiasaanya akan digunakan (Goodwin 2007; Auerbach et al. 2003).

Akhir sekali, berdasarkan keputusan *in vivo*, kesimpulan yang berkemungkinan tinggi untuk menerangkan fenomena ini adalah proses migrasi sel A549 ke bahagian epidermis tisu kulit berkait rapat dengan pengekspresan gen *SON*. Akan tetapi bukti perencatan *SON* menghalang pertumbuhan sel A549 ke bahagian epidermis masih perlu diperincikan dengan menggunakan kaedah imunohistokimia untuk menjejaki perkembangan pertumbuhan tumor setelah pengekspresan gen *SON* direncatkan.

Bab V

PERBINCANGAN

Kanser paru-paru merupakan jenis kanser yang menyebabkan kematian yang tertinggi di dunia (American Cancer Society 2014). Walaupun kebanyakan kes kanser paru-paru yang dilaporkan didapati berkolerasi dengan kelakuan menghisap rokok, namun terdapat juga sejumlah besar kes kanser paru-paru adalah melibatkan mereka yang tidak berokok. Dengan itu kajian patologi molekul ke atas kejadian patogenik kanser paru-paru amat diperlukan.

5.1 PENGENALPASTIAN SASARAN TERAPI NSCLC

Kajian profil pengekspresan gen dengan menggunakan teknologi DNA mikroatur semakin rancak dilakukan pada dekad ini. Ini adalah kerana ia merupakan satu teknologi yang mempunyai daya pemprosesan yang tinggi dan komprehensif untuk mengkaji profil transkriptom. Sehingga kini, terdapat lebih 150000 penerbitan penyelidikan kanser yang menggunakan teknologi mikroatur DNA telah dilaporkan. Malahan antara terbitan-terbitan profil pengekspresan gen bagi sampel kanser yang dinyatakan terdapat banyak integrasi data dan parameter telah dilaporkan juga. Justeru itu, data ini merupakan suatu aset yang sangat bernilai untuk dimanupulasikan bagi mencari sasaran terapi bagi kanser serta mendalami lagi kefahaman perkembangan dan tahap kanser.

Pemahaman dan penggunaan ribuan data profil pengekspresan gen bukan merupakan sesuatu perkara yang mudah. Analisis data profil pengekspresan gen dan integrasi dengan data etnik, umur, tahap kanser, jangka hayat pesakit kanser serta kerintangan terapi kimia adalah sangat rumit. Namun kerumitan ini telah cuba

diselesaikan oleh ONCOMINE, suatu pangkalan data yang baru dibangunkan. Antara keupayaan program dalam ONCOMINE adalah menganalisis data profil pengekspresan gen secara sistematik dengan menggunakan kaedah meta-analisis iaitu mengabungkan semua data yang ada dan menghuraikan data yang diperolehi sebelum dianalisis secara statistik.

Di dalam kajian meta-analisis ini, telah mengenalpasti 235 gen yang mempunyai pengekspresan meningkat berbanding dengan tisu normal. Analisis seterusnya dilakukan pada 235 gen tersebut dengan integrasi ke atas gen set kanser yang lain. Keputusan menunjukkan 10 set gen dengan sejumlah 80 gen pilihan untuk kajian siRNA berjaya disenaraikan. Secara amnya, gen-gen pilihan tersebut sekiranya diterjemahkan bersama berkemungkinan berpotensi sebagai gen ramalan fenotip untuk kepanjangan hidup pesakit yang lebih berkesan jika dibandingkan ramalan fenotip pesakit yang hanya menggunakan satu gen sahaja. Angapan ini selaras dengan kajian terkini yang telah menunjukkan ramalan keadaan pesakit adalah lebih tepat dengan berpandukan pelbagai interaksi molekul biologi (Cheng et al 2013; Nagalla et al 2013).

5.2 IDENTIFIKASI GEN YANG MENINGKATKAN KEMOSENSITIVITI SEL KANSER PARU-PARU MELALUI SARINGAN RNAi

Pengkulturan titisan sel kanser telah dilakukan 20 tahun yang lepas oleh George Gey di mana beliau berjaya mengkulturkan titisan sel manusia daripada kanser serviks – sel HeLa. Kejayaan yang diperolehi oleh beliau diteruskan dengan pengkulturan titisan sel kanser paru-paru pada tahun 1980-an. Sehingga kini, mengikut kajian yang dilakukan ke atas pangkalan data Wellcome Trust Sanger Institute, terdapat beratus jenis titisan sel kanser paru-paru telah dikulturkan dan digunakan untuk kajian. Daripada kesemua jenis titisan sel kanser paru-paru ini, lebih kurang 8000 kajian direkodkan di dalam pangkalan data PubMed bermula dari tahun 2000 sehingga kini.

Perbincangan mengenai kesesuaian titisan sel kanser digunakan dalam kajian kanser biologi telah berlarutan selama dua dekad. Jawapan bagi perbincangan ini masih tidak dapat diperolehi kerana ia adalah suatu isu yang kompleks dan meliputi

pelbagai pemikiran dan pertimbangan. Namun begitu, penggunaan titisan sel dalam kajian kanser biologi mempunyai beberapa kebaikan yang tidak boleh dinafikan. Salah satu kebaikan dan kelainan titisan sel daripada tumor adalah populasi titisan sel kanser adalah seratus peratus sel kanser yang tulen berbanding dengan tisu tumor primer dimana sebahagian besar adalah terdiri daripada sel stromal dan sel inflamasi. Maka dengan itu pencemaran sel malignan dengan sel bukan malignan sentiasa berlaku dan ini akan memberikan keputusan kajian yang kurang tepat terutamanya kajian ke atas mutasi gen.

Kebaikan penggunaan titisan sel yang lain adalah titisan sel dapat melakukan pembahagian sel dalam medium kultur. Ini secara terus dapat membekalkan DNA, RNA serta protein yang berkualiti dalam kuantiti yang tinggi untuk kajian kanser biologi. Juga pada masa yang sama, para pengkaji di merata dunia dapat membuat perbandingan data terhadap hasil kajian masing-masing ke atas sampel yang sama bagi menghurai ketepatan kajian. Perkara ini tidak dapat dilakukan sekiranya menggunakan sampel tumor yang berlainan.

Kejadian kanser adalah disebabkan oleh beribu-ribu jenis faktor sama ada faktor fizikal, faktor kimia ataupun faktor biologi. Namun kesemua faktor ini secara langsung melibatkan tindak balas tapak jalan biokimia yang banyak. Titisan sel merupakan pilihan yang terbaik untuk mengkaji, identifikasi serta menguji tapak jalan biologi yang menyumbang kepada perkembangan kejadian kanser. Keupayaan ini dapat mempercepatkan proses pengenalpastian sasaran penindasan gen bagi merawat kes kanser (Bernasconi et al. 2000).

Kini kajian biologi kanser bertambah menarik dengan adanya bantuan teknologi RNAi dan teknologi penskrinan plat mikrotiter. Kedua-dua teknologi ini membolehkan kajian kesan interaksi genom, perubahan genom yang menyumbang kepada patogenesis kanser dikaji dengan lebih komprehensif. Gabungan teknologi ini mampu menonjolkan gen-gen yang memberikan impak besar pada kemandirian kanser sel dan seterusnya berkemungkinan meningkatkan sensitiviti kanser sel pada rawatan terapi kimia.

Teknik RNAi ini telah digunakan dalam beberapa kajian lepas dengan berjaya dalam mengenalpasti gen-gen yang meningkatkan sensitiviti terapi kimia pada beberapa jenis kanser termasuklah kanser paru-paru. Antara kajian yang pernah dilakukan adalah seperti kajian yang dibuat oleh Zhang et al. 2012 di mana beliau dan rakannya berjaya menggunakan teknik ini untuk menunjukkan penindasan gen *XPA* dapat mengaktifkan semula sensitiviti sel kanser paru-paru yang sangat rintang pada rawatan cisplatin. Kejayaan penggunaan teknik RNAi juga diperolehi oleh Hong et al. 2013 iaitu beliau telah menggunakan teknik ini menemui gen *HRP-3* yang boleh mensensitifkan sel kepada rawatan radio terapi apabila pengekspresannya ditindas.

Di dalam kajian ini RNAi yang digunakan merupakan jenis RNA nukleotida dupleks pendek dengan purata kepanjangan adalah antara 20-23 nukleotida. Antara mekanisme jenis RNAi ini adalah pembentukan RISC (*RNA-induced silencing complex*) di dalam sistem sel dan pembentukan kompleks ini akan bertanggung jawab menghalang serta memotong sasaran mRNA yang bertujuan menghalang pengekspresan gen sasaran. Kajian ini juga mengambil pendekatan RNA pasca-transkripsi iaitu titisan sel dirawat dengan RNAi sebelum mengkulturkan titisan sel. Antara kebaikan pendekatan ini adalah ia dapat mengurangkan ralat mutasi pada titisan sel kanser yang berkemungkinan berlaku semasa pengkulturan sel.

Keputusan saringan RNAi ini selaras dengan konsep *Hallmarks of Cancer* yang diutarakan oleh Hanahan dan Weinberg (2000). Konsep yang disyorkan oleh Hanahan dan Weinberg (2000) menyatakan bahawa kanser sel merupakan sel yang rintang pada proses apoptosis. Keputusan saringan RNAi ini mendapati bahawa hampir 75% gen yang terlibat dalam proses apoptosis akan menurunkan proliferasi titisan sel A549 apabila pengekspresan gen-gen tersebut ditindas.

Apabila diperhatikan dengan lebih terperinci mengenai keputusan saringan siRNA didapati bahawa majoriti daripada gen yang memberikan keputusan positif adalah gen anti-apoptotik dan gen angiogenesis (rujuk jadual 4.2). Keputusan ini berlaku berkemungkinan gen-gen anti-apoptosis adalah lebih dominan dalam menentukan kemandirian dan patogenesis kanser paru-paru. Seterusnya ekor

daripada kegagalan proses apoptosis, gen angiogenesis akan diaktifkan dan merangsang proses pertumbuhan koloni sel kanser untuk membentuk saluran darah yang khusus bagi pembentukan tisu kanser. Namun, perkara ini masih menjadi suatu pertikaian yang harus diperhatikan mengenai dominasi gen angiogenesis dan gen anti-apoptosis. Ini adalah kerana faktor kedominan gen dalam kes kanser akan mempengaruhi rawatan terapi kimia.

Berdasarkan data hasil analisis kajian, antara 80 gen tersebut, terdapat beberapa gen-gen yang menunjukkan potensi sebagai sasaran prognosis bagi patogenik kanser paru-paru. Antaranya adalah seperti gen *ANG*, gen *TIAF1* dan gen *PCDHB11*. Gen *ANG* merupakan gen yang terlibat dalam merangsangkan pembentukan saluran darah baru. Ia bertindak dengan melakukan hidrolisis tRNA sel yang seterusnya mengurangkan protein sintesis dan seterusnya merangsangkan tekanan granular pada sel lalu mendesak sel untuk melakukan proses vaskulasi (Han et al. 2010; Emara et al 2010).

Gen *TIAF* pula merupakan gen yang terlibat dalam menghalang sitotoksik yang disebabkan oleh kelebihan pengekspresan TNF-alfa reseptor dan TNF-alfa yang seterusnya akan menyebabkan degradasi IkappaB-alfa (Chang et. al. 1998; Chang et. al. 2012). Manakala gen *PCDHB11* pula merupakan gen yang memainkan peranan dalam tapak jalan glukos metabolisme, carbon metabolisme dan pengikatan ion kalsium. (Wu et al. 1999). Namun, fungsi spesifik gen ini masih tidak dikenalpasti dan ia berkemungkinan memainkan peranan dalam pembentukna fungsi penghubung antara sel-sel neuron (Ota et al. 2004; Schmutz et al. 2004).

Susulan daripada saringan siRNA, kajian diteruskan dengan menggunakan set gen yang sama untuk melakukan penyaringan aktiviti sensitiviti pada cisplatin. Cisplatin merupakan ubat rawatan terapi kimia utama yang akan digunakan untuk merawat pesakit kanser paru-paru. Ini adalah kerana cisplatin mempunyai aktiviti anti-tumor yang luas, tetapi ketoksikannya hanya pada sesetengah sel dan tisu sahaja iaitu sel enterokromaffin gastro-usus, tubul buah pinggang, sel rambut koklea, akar ganglia dorsal, megakaryosit serta sel-sel yang aktif membahagi (McKeage 1995). Sel-sel normal mempunyai beberapa mekanisme perlindungan daripada persekitaran

merbahaya terutama dalam terapi kimia cisplatin (Crawford & Davies 1994; Prestera et al. 1993; Soti & Csermely 2006) yang boleh melindungi dan menyumbang kepada kerintangan pada terapi cisplatin.

Kerintangan cisplatin telah dikaji secara mendalam. Secara amnya, dalam mengkaji semula mekanisme kerintangan cisplatin, keseluruhan data yang ada mencadangkan bahawa mekanisme kerintangannya adalah hampir sama bagi pelbagai jenis kanser yang berlainan iaitu kerintangan secara intrinsik dan ekstrinsik. Kanser kolon dan buah pinggang mempunyai kerintangan intrinsik yang menghadkan keberkesanan rawatan cisplatin. Manakala bagi kerintangan ekstrinsik berlaku pada kes-kes kanser yang lain dimana sesetengah pesakit yang pada mulanya memberikan reaksi tindak balas pada rawatan cisplatin, tetapi mengalami kerintangan apabila rawatan diteruskan. Walaupun kerintangan pada rawatan cisplatin banyak dikaitkan dengan mutasi gen (Goldie & Coldman 1985), namun melalui pelbagai pemerhatian klinikal (Stewart et al. 2004) dan penyiasatan makmal (Nyce 1997) serta pemerhatian perangsangan kerintangan terhadap cisplatin dengan menggunakan ubat perangsang *in vitro* (Graham et al. 1994; Di Nicolantonio 2005; Akita et al. 2006), suatu kesimpulan telah dibuat iaitu perubahan epigenetik berkemungkinan menjadi faktor penyumbang utama pada mekanisme kerintangan cisplatin.

Kerintangan cisplatin boleh dikelaskan kepada kerintangan aktif dan kerintangan pasif. Kerintangan aktif berlaku apabila terdapat faktor kerintangan yang berlebihan, di mana wujudnya pembentukan bahu pada lengkung dos-tindak balas (DRC-*Dos response curve*) jika dibandingkan dengan graf ketepuan pasif. Manakala kerintangan pasif adalah akibat daripada kekurangan faktor yang menyebabkan penurunan kecerunan lengkungan DRC yang disebabkan oleh perubahan faktor gen dan seterusnya memberikan penurunan kecerunan DRC pada graf jika dibandingkan dengan graf ketepuan pasif (Stewart et al. 1996). Contoh faktor-faktor kerintangan aktif adalah termasuk protein pam pengeluaran ion bercaj, sistem pembaikan DNA, faktor-faktor anti-apoptotik, dan sebagainya. Manakala contoh faktor-faktor yang mempengaruhi faktor kerintangan pasif adalah seperti faktor sistem pengaktifan pengambilan ubat, penghalang sasaran terapi seperti

penghalang topoisomerase II untuk enzim topoisomerase II, faktor-faktor pro-apoptotik atau faktor-faktor yang merupakan sebahagian daripada famili gen apoptotik atau sel-sel yang berada dalam fasa sensitif pada kitaran sel.

Keputusan saringan siRNA ke atas sensitiviti A549 terhadap cisplatin memaparkan keputusan yang berbeza dengan keputusan saringan siRNA tanpa cisplatin. Dalam kajian ini didapati aktiviti sensitiviti cisplatin dipengaruhi oleh gen-gen angiogenesis, metastasis dan telomerase. Kesemua aktiviti proses biologi ini didapati mempunyai kesan pada proses kitaran sel dan pertumbuhan sel. Maka dengan ini kerintangan jenis ini adalah dikaitkan dengan kerintangan pasif iaitu sejajar dengan apa yang dilaporkan dalam kajian-kajian lepas.

Berdasarkan kajian-kajian lepas kerintangan terhadap cisplatin boleh dikaitkan dengan peningkatan pengeluaran cisplatin dari sel atau dari nukleus ke dalam sitoplasma (Stewart et al. 2007; Siddik 2003; Johnson et al. 1996). Pengangkut ion kuprum jenis-P adenosina trifosfat, ATP7A dan ATP7B telah dikaitkan dengan pengeluaran cisplatin daripada sel dan kerintangan sel pada cisplatin (Nakayama et al. 2001; Wang et al. 2004; Katano et al 2003; Higashimoto et al 2003; Miyashita et al 2003). Ion kuprum bersaing dengan cisplatin untuk pengambilan masuk ke dalam sel tetapi ia juga mengurangkan pengeluaran cisplatin daripada sel serta meningkatkan jumlah pengumpulan cisplatin dan sitotoksiti pada sel kanser (Melvik et al 1992; Min et al 2004). Peningkatan pengekspresan ATP7B dikaitkan dengan kekurangan kesan rawatan cisplatin pada pesakit kanser esofagus dan kanser sel skuamus otak dan leher (SCCHN). Keputusan yang hampir sama juga diperolehi dalam kajian ini dimana penindasan pengekspresan gen ATP6AP2 berjaya meningkatkan sensitiviti sel A549 pada rawatan cisplatin. Maka berkemungkinan dengan pengurangan pengekspresan gen ATP7B, ATP7B dan famili gen ATP6AP2 akan berpotensi menyumbang kepada pengurangan rintangan cisplatin pada rawatan klinikal (Miyashita et al 2003; Samimi et al 2004)

Di dalam sel, cisplatin-klorida akan digantikan oleh hidroksi neutral atau kumpulan aquas hidroksi yang bercas positif (Bose et al. 2005). Kumpulan kimia aquas cisplatin-klorida kebanyakannya adalah pengikat DNA (Anderson et al. 1994)

dan menyebabkan intra-bebenang dan inter-bebenang DNA bersilang, putus dan memendek lalu menyebabkan kematian sel berlaku (Zwelling et al. 1979). Di dalam suatu kajian tahap pemendekan DNA dalam limfosit telah menunjukkan kaitan pemendekan DNA dengan pembentukan tumor serta dengan keberkesanan rawatan cisplatin (Poirier et al. 1988; Reed et al. 1987; Parker et al. 1991; Dabholkar et al. 1992; Meijera et al. 2001). Pengikatan cisplatin-DNA didapati berlaku dengan kerap terutamanya dalam lokus kromatin nuklues yang berkepadatan tinggi dan di dalam mitokondria. Tahap pengikatan ini adalah yang tertinggi di dalam sel yang aktif membahagi (Raghuhand et al. 1999). Dengan itu kesan sitotoksik ikatan cisplatin-DNA adalah tertinggi pada sel yang berada dalam fasa G1 (Dempke et al. 1999).

Penurunan pembentukan ikatan DNA dan rintangan cisplatin mungkin berlaku walaupun kepekatan sel yang tinggi (Stewart et al. 1996). Cisplatin adalah paling berkesan pada pH yang rendah sama ada dalam intrasel ataupun ekstrasel (Kozin et al. 2001; Wahl et al. 2002). Nilai pH yang meningkat secara ketara di dalam sel menyebabkan rintangan cisplatin berlaku dimana DNA kurang membentuk ikatan dengan cisplatin (Stewart et al. 1995; Murakami et al. 2001). Pengikatan DNA-cisplatin meningkat secara ketara dalam keadaan asidik (Wahl et al. 2002). Dalam konteks kitaran sel, nilai pH intraselular adalah terendah semasa fasa G1 dan adalah tertinggi semasa fasa G2 /M. Maka selaras dengan fasa kitaran sel, fasa tertentu akan mempunyai ikatan DNA-cisplatin yang tinggi dan secara relatif meningkatkan kesitotoksikan sel (Murakami et al 2001). Beberapa gen yang mengawal kerosakan DNA, apoptosis dan isyarat kepanjangan jangka hayat sel didapati boleh menyumbang kepada rintangan pada cisplatin (Minagawa et al. 1999). Di dalam kajian ini didapati MCL1 dan API5 yang terlibat pada aktiviti apoptosis memberikan kesan positif yang ketara dalam meningkatkan sentiviti sel A549 terhadap cisplatin. Ini berkemungkinan disebabkan oleh keupayaan cisplatin yang boleh mendorong apoptosis melalui gangguan saluran isyarat kompleks FAS dan isyarat ligan FAS yang berinteraksi terus dengan MCL1 dan API5 (dengan mengaktifkan kaspase 8 dan seterusnya kaspase 3) (Kigawa et al. 2001).

Perencatan proses apoptosis menyumbang kepada penentangan terhadap kedua-dua mekanisme sitotoksik cisplatin dan tindak balas p53 (Asada et al. 1999).

Penurunan pengekspresan p53 berkemungkinan memberikan rintangan terhadap cisplatin dengan peningkatan pengekspresan pengawal negatif, MDM2 diikuti penurunan atau penindasan pengekspresn protein p14ARF (Rosell et al. 2004). Manakala dalam kajian ini mendapati bahawa pengekspresan gen *MDM2* yang merupakan pengawal negatif pengekspresan p53 adalah menurun susulan daripada penindasan gen *SON*. Rintangan cisplatin juga telah dikaitkan dengan pengurangan pengekspresan protein-2-pengikat p53 (Perego et al. 1996). Sel-sel yang mempunyai delesi atau mutasi p53 pada kebiasaannya adalah rintang terhadap cisplatin (Asada et al. 1999; Kigawa et al. 2001). Rintangan terhadap cisplatin yang dikaitkan dengan mutasi p53 telah dibuktikan secara in vitro pada titisan sel INOC dan SCCHN serta secara klinikal pada tumor sel germa dan SCCHNs (Houldsworth et al. 1998; Bradford et al. 1997; Kuwahara et al. 2002).

5.3 ANALISIS FUNGSI SON

Gen *SON* dikenalpasti oleh Berdichevskii et al. (1987) dimana kumpulan penyelidik beliau telah mengklonkan fragmen gen *SON* daripada cDNA embrio manusia. Jujukan nukleotida gen ini adalah sepanjang 1,454 pasangan bes dengan enam rangka bacaan terbuka (*open reading frame*). Apabila jujukan nukleotida gen ini ditranslasi kepada protein, didapati protein *SON* mempunyai ciri-ciri yang unik iaitu 7 hingga 19 jujukan pendek asid amino berulang terdapat pada bahagian tengah protein ini. Perbezaan utama analisis SBASE dengan kajian lepas adalah protein *SON* berdasarkan jujukan asid amino mempunyai jujukan homolog dengan struktur protein pengikat DNA yang lain seperti gallin (persamaan 55%), serta mempunyai persamaan dengan onko-protein yang mengekodkan proto-onkogen famili protein MYC. Ciri ketiga *SON* adalah ia mempunyai bahagian jujukan protein yang homolog dengan onko-protein MOS proto-onkogen.

Berikutan daripada penemuan gen *SON*, Khan et al. (1994) telah melakukan satu kajian dengan menggunakan perpustakaan cDNA keratinosit untuk menghasilkan klon *SON*. Beliau mendapati bahawa gen *SON* diekspres pada pelbagai jenis sel dan jujukan homolog dapat dikesan pada genom serangga serta

genom haiwan tanpa vertebra. Ini menunjukkan bahawa gen SON merupakan gen asas yang diperlukan oleh sel untuk memastikan kemandirian sel.

5.3.1 Kajian In Vitro Gen SON

Walaupun gen SON telah ditemui pada tahun 1987, namun fungsi utamanya masih tidak dapat dikenalpasti dengan tepat. Usaha ini telah diteruskan oleh Wynn et al. (2000) di mana beliau menggunakan protein SON tikus yang mempunyai 84.2% persamaan asid amino dengan protein SON manusia, untuk memerhatikan pergerakan protein SON pada sel dengan menggunakan teknik imunofluoresen. Keputusannya mendapati bahawa corak pewarnaan protein SON adalah hampir sama dengan corak faktor penyambatan mRNA (*mRNA spicing factors*) serta ia adalah didapati dengan banyak pada interfasa granul kromatin nukleus. Dengan itu, gen SON berkemungkinan terlibat dalam aktiviti pemprosesan mRNA. Hasil kajian yang dinyatakan selaras dengan hasil kajian ini di mana dalam kajian mikroatur DNA mendapati gen SON terlibat dalam aktiviti fasa M, fasa mitosis sel.

Manakala di dalam kajian ini, pencarian fungsi gen SON dimulakan dengan penyaringan jujukan mRNA menggunakan perisian SBASE. Hasil penyaringan tersebut mempunyai sedikit kelainan dengan hasil kajian Berdichevskii et al. (1987). Namun didapati antara kesamaan yang ada ialah gen ini mempunyai domain yang berkaitan dengan domain tansduksi isyarat protein G, domain protein Cdc4 serta protein domain Oligosakril transferase. Kesemua fungsi domain ini amat diperlukan dalam aktiviti patogenik sel kanser untuk memastikan sel sentiasa dalam keadaan aktif membahagi dan sentiasa menghasilkan protein yang diperlukan untuk kemandirian sel kanser. Pencarian fungsi gen diteruskan dengan menggunakan pangkalan data berdasarkan jujukan amino asid protein SON. Hasil saringan tersebut mendapati SON tergolong dalam famili protein pengikat DNA. Ini selaras dengan hasil kajian yang dilakukan oleh Wynn et al. (2000). Aktiviti penyambatan mRNA memerlukan jujukan mRNA diikat sebelum bahagian exon mRNA dapat dipotongkan dan dicantumkan intron untuk membentuk jujukan mRNA yang sedia ditranslasikan ke jujukan polipeptida.

Dalam suatu kajian replikasi virus influenza A yang dilakukan oleh Karlas et al. (2010) melaporkan bahawa 287 gen yang telah dikenalpasti mempengaruhi kitar hidup virus tersebut, *SON* merupakan salah satu gen tersebut. Didapati *SON* adalah sangat penting dalam pengangkutan virion influenza semasa peringkat awal infeksi virus. Fungsi pengangkutan virion influenza ini mungkin diambil peranan oleh domain subunit oligosakarida transferase STT3 yang terdapat di dalam jujukan protein *SON*. Protein yang mempunyai domain ini mempunyai peranan untuk memindahkan kandungan lipid yang dihasilkan oleh endoplasmik retikulum ke sitoplasma sel. Kandungan lipid merupakan kandungan yang penting dalam pembentukan sel membran serta pembentukan virion.

Kajian fungsi gen *SON* diteruskan dengan asai apoptosis. Penindasan ekspresi *SON* meningkatkan pengekspresan gene caspase 3 (*CASP3*) dan caspase 7 (*CASP7*). Brito et al. (2006) menyatakan semasa proses mitosis tertindas, tahap siklin B menurun secara perlahan-lahan. Penurunan pengekspresan faktor kitaran sel siklin B akan diikuti oleh peningkatan aktiviti pengekspresan caspase. Dalam kajian yang dilakukan oleh Gascoigne dan Taylor (2008), mereka juga mendapati bahawa apabila tahap pengekspresan protein siklin B menurun sampai pada kepekatan tertentu sebelum protein caspase mencapai kepekatan yang cukup untuk merangsangkan apoptosis, sel akan keluar daripada kitaran sel tanpa berlakunya apoptosis. Manakala sekiranya tahap pengekspresan siklin B tidak menurun ke tahap yang rendah dan tahap pengekspresan caspase terus meningkat, sel akan melalui proses apoptosis di dalam kitaran sel.

Walaupun ujian penindasan gen *SON* memberikan keputusan positif pada asai apoptosis, namun hubungan antara fungsi gen *SON* dengan caspase 3 dan caspase 7 masih tidak dapat ditentukan secara tepat. Berdasarkan kajian lepas, ubat anti-mitosis akan melewati perkembangan mitosis untuk suatu jangka masa dengan menghalang proses mitosis sel daripada melepasi program pemeriksaan mitosis sel. Kelewatan mitosis yang berpanjangan pada kebiasaannya akan diikuti oleh kematian sel di dalam mitosis. Walau bagaimanapun terdapat juga sesetengah sel dapat melepasi kematian sel pada fasa mitosis dan terkeluar daripada program pemeriksaan mitosis sel (Gascoigne & Taylor, 2008). Terdapat variasi yang besar

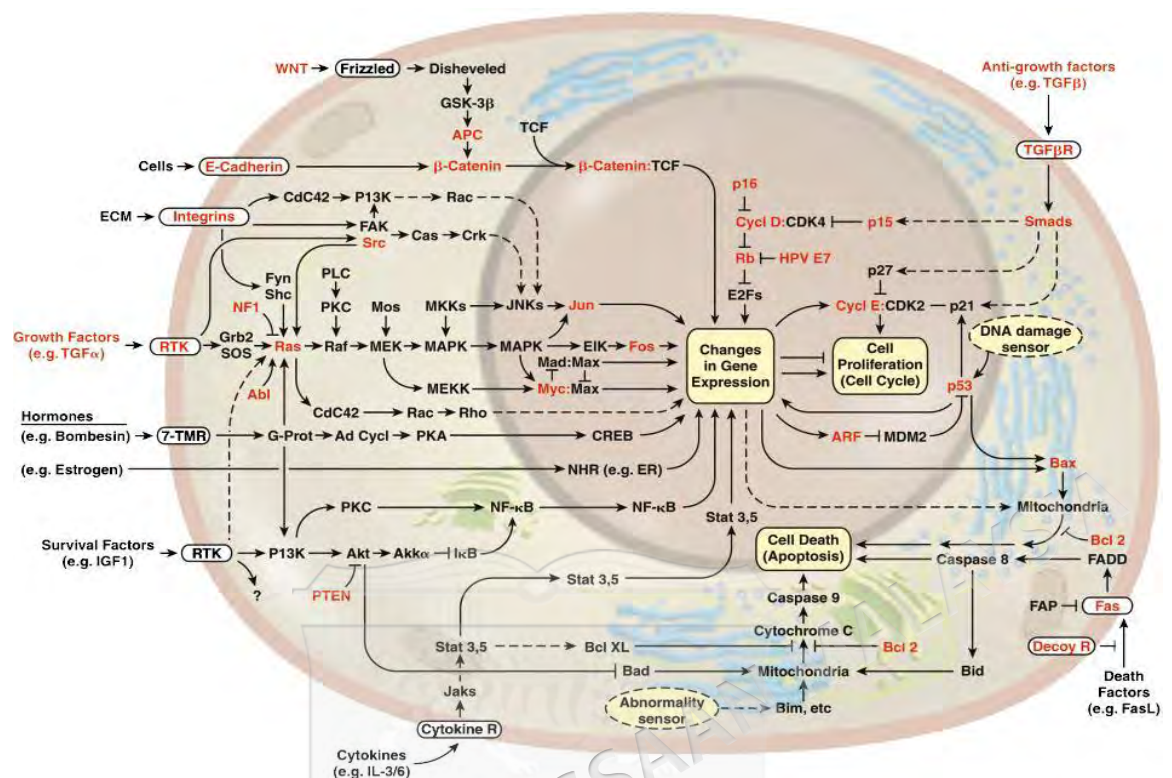
antara sel-sel pada masa penentuan kematian sel walaupun di dalam populasi sel yang mempunyai persamaan kandungan genetik. Oleh kerana itu, ini mengakibatkan terdapat sel-sel yang mati di dalam proses pemanjangan program pemeriksaan mitosis dan terdapat juga sel-sel yang hidup serta terkeluar dari program tersebut dengan berada dalam keadaan tetraploid (Rieder & Maiato 2004; Brito & Rieder 2006; Gascoigne & Taylor 2008). Di dalam beberapa kajian yang berlainan, tiada korelasi didapati antara pemanjangan masa mitosis dan kemandirian sel. Ini menunjukkan jangka masa sel terhalang pada proses mitosis tidak menentukan nasib sel sama ada sel akan mati pada proses mitosis, terkeluar daripada mitosis dan mati pada fasa G1 atau fasa seterusnya ataupun terkeluar dari mitosis dan terus melakukan proliferasi pada kitaran sel yang seterusnya (Gascoigne & Taylor 2008; Shi & Mitchison. 2008; Brito & Rieder 2009).

Siklin B-CDK1 dianggap berperanan sebagai pusat pengawalan jangka masa mitosis serta mengawal mekanisme apoptosis. Ia boleh mengalami fosforilasi secara sendiri dan seterusnya menghalang aktiviti caspase 9 semasa proses mitosis (Allan & Clarke 2007). Ini bermakna semasa pemanjangan jangka masa mitosis proses apoptosis akan dilambatkan, maka adalah dianggarkan bahawa penurunan pengekspresan protein siklin B-CDK1 dan peningkatan pengekspresan protein caspase 9 berlaku pada kadar yang sama. Kajian juga menunjukkan bahawa penambahan masa proses mitosis merangsang kekurangan degradasi protein MCL-1, protein anti-apoptosis (Harley et al. 2010). Selain daripada itu terdapat juga sesetengah kajian melaporkan terdapatnya pertindihan mekanisme tindakan berbalik antara aktiviti siklin B-CDK1 dan aktiviti protein anti-apoptosis, BCL-XL dan BCL-2 (Vantieghem et al. 2002; Terrano et al. 2010). Malahan kajian-kajian yang lain menunjukkan sesetengah aktiviti kinase mitosis boleh menghalang perangsangan pengaktifan protein p53. Antara keputusan yang didapati adalah sel yang mengalami kelewatan penamatan mitosis akan mengalami ketidakseimbangan protein kompleks yang diperlukan untuk mengaktifkan protein p53 (Ando et al. 2004; Ha et al. 2007; Wu et al. 2011). Secara keseluruhan berdasarkan keputusan kajian-kajian lepas, kelewatan penamatan proses mitosis akan menyebabkan halangan mekanisme apoptosis serta tapak jalan biologi pro-apoptosis.

Hasil analisis mikroatur yang diperolehi dalam kajian ini sejajar dengan keputusan yang diperolehi oleh Alok et al. (2010) walaupun sel kanser yang digunakan adalah sel HeLa di mana gen *SON* terlibat dalam aktiviti kitaran sel juga. Di dalam kajian yang dilakukan oleh Ahn et al. (2008) mendapati gen *SON* terlibat secara terus dalam kitaran sel. Di dalam kajian Alok et al. (2010), beliau menggunakan sitometri aliran untuk membuktikan gen *SON* memberikan kesan pada fasa G2 dan fasa mitosis kitaran titisan sel HeLa. Hasilnya mendapati bahawa gen *SON* terlibat dalam proses *splicing* RNA gen-gen di kitaran sel.

Manakala di dalam kajian mikroatur titisan sel A549 yang melibatkan penindasan fungsi gen *SON* mendapati bahawa gen *SON* lebih terlibat dalam aktiviti transkripsi, translasi gen pada kitaran sel serta gen yang mengawal perkembangan sel. Saitoh et al. (2004) melakukan analisis proteomik bintik nukleus (*nuclear speckles*) berjaya mengenalpasti protein *SON* sebagai protein yang mengandungi RS domain yang terbesar. RS domain merupakan domain yang dimiliki oleh protein yang terlibat secara aktif dalam aktiviti penyambatan (*splicing*). Domain RS merupakan kawasan yang banyak mengalami proses fosforilasi agar protein SR dapat dilepaskan daripada bintik nukleus selepas melakukan aktiviti penyambatan dan dikumpulkan semula pada *spliceosome* (Mermoud et al. 1994; Colwill et al. 1996; Yeakley et al. 1999)

Pemerhatian yang perinci telah dilakukan ke atas 336 gen yang terlibat secara langsung dengan gen *SON* dengan menggunakan perisian PathwayStudio 7.0, mendapati kebanyakan gen terlibat dalam kitaran sel dan tapak jalan NOTCH. Jika dibandingkan dengan kajian-kajian lepas, sel kanser mempunyai keupayaan untuk meniru isyarat pertumbuhan sel yang normal. Sel normal memerlukan isyarat pertumbuhan mitogenik untuk membolehkan ia bertukar daripada keadaan tidak aktif ke keadaan aktif membahagi. Rajah 5.1 merupakan kitaran litar sel yang diperlukan oleh kanser sel untuk membolehkannya terus hidup tanpa dikesani oleh sistem keimunan sel dan badan. Tapak jalan NOTCH merupakan antara komponen tapak jalan tersebut yang menolong kanser sel tidak dikenalpasti sebagai sel yang tidak normal oleh sistem keimunan.

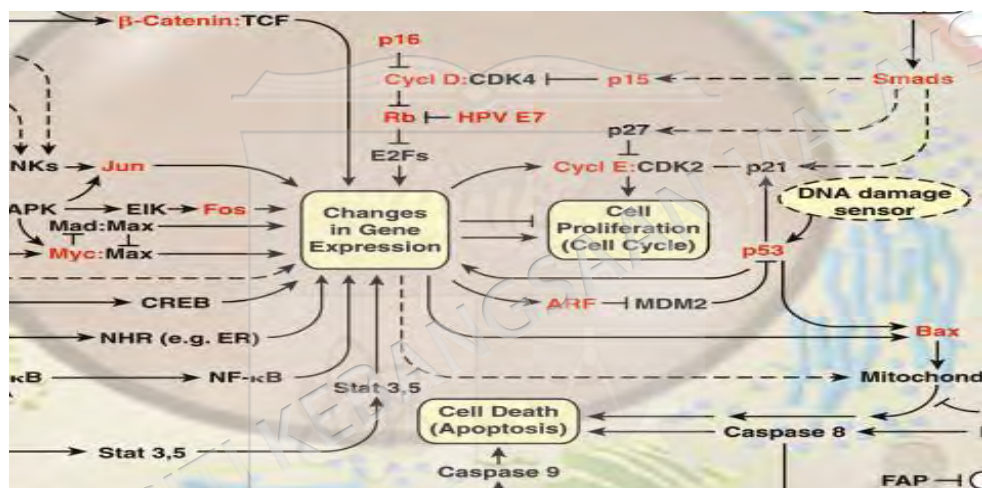


Rajah 5.1 Rumusan integrasi kitaran litar di dalam sel yang diperlukan oleh kanser sel melakukan proliferasi sel. Kitaran litar ini hampir sama dengan kitaran litar sel normal yang aktif membahagi kecuali senarai gen-gen yang berwarna merah yang telah terbukti fungsinya telah berubah. (Rajah petikan daripada Hanahan dan Weinberg 2000)

Tapak jalan NOTCH adalah berkait rapat dengan tapak jalan isyarat RAS, walaupun interaksinya adalah berubah-ubah pada sel-sel yang berbeza. Pengaktifan tapak jalan NOTCH merupakan laluan utama bagi merangsangkan RAS. Ini telah dibuktikan oleh kajian yang dilakukan oleh Weijzen et al. (2002) dimana penghalangan pengekspresan *NOTCH* berjaya menghalang pertumbuhan fibroblast yang mempunyai mutasi gen *RAS*. Dengan ini, tapak jalan NOTCH merupakan suis utama untuk membuka dan mengaktifkan tapak jalan RAS dan seterusnya mengaktifkan tapak jalan kitaran sel (Rajah 5.1)

Melihat semula fungsi gen *SON* yang dikaji dengan teknik mikroatur, gen-gen yang berinteraksi terus dengan pengekspresan gen adalah lebih tertumpu pada tapak jalan kitaran sel dan pengekspresan gen (Rajah 5.2). Keputusan ini disokong

oleh kajian *in vitro* dengan menggunakan asai viabiliti, apoptosis dan migrasi. Dalam kajian asai viabiliti didapati pertumbuhan sel terencat disebabkan oleh gangguan dalam kitaran sel. Antara gen-gen utama yang mengalami penurunan ekspresi adalah gen *MYC*, *CDK* dan *E2F* yang merupakan gen-gen hiliran kitaran sel. Manakala dalam kajian asai apoptosis dan asai migrasi pula mendapati penurunan ekspresi gen *SON* merangsang pengekspresan *CASP3* dan *CASP7* yang mempengaruhi proses apoptosis dan seterusnya mengganggu proses migrasi sel. Perkara ini mungkin merupakan penjelasan bagi keputusan yang diperhatikan dalam kajian *in vivo* iaitu kegagalan tisu xenograf menembusi lapisan epidermis susulan penindasan gen *SON*.



Rajah 5.2 Integrasi kitaran litar tapak jalan biologi kitaran sel, apoptosis dan pengekspresan gen di dalam kanser sel. (Rajah petikan daripada Hanahan dan Weinberg 2000)

Susulan daripada pemerhatian gen-gen yang berinteraksi terus dengan gen *SON* mendapati kebanyakannya adalah terlibat dalam aktiviti pengekspresan gen terutama pengekspresan gen yang berkaitan dengan kitaran sel. *SON* berkemungkinan sebagai protein kompleks yang diperlukan dalam merangsangkan pengekspresan gen kitaran sel fasa M ataupun fasa S. Berdasarkan kajian lepas yang telah dilakukan oleh Moore (2010), dan Eun-Young (2011) menunjukkan *SON* mempunyai fungsi spesifik dalam pemprosesan RNA di dalam kitaran sel, tapak jalan NOTCH dan replikasi sel pada titisan sel HeLa.

Proses penyambatan RNA merupakan suatu proses penting dalam mekanisme penghasilan protein. Proses ini merupakan penyumbang utama kepada kepelbagaian transcriptomik dan proteomik. Hasil produk transkrip yang menghasilkan mRNA akan melalui proses penyambatan sebelum proses translasi boleh berlaku. Proses ini akan memberikan kesan yang mendalam ke atas ciri-ciri protein, fungsi domain, kestabilan protein, lokasi protein serta interaksi antara protein. Proses penyambatan RNA merupakan suatu peristiwa yang sentiasa berlaku dalam sel normal. Data kajian terkini telah menunjukkan bahawa lebih daripada 90% daripada keseluruhan genom manusia menjalani proses penyambatan DNA dan RNA (Wang et al. 2008). Perubahan dalam proses penyambatan telah ditunjukkan dapat memberi kesan kepada proses biologi yang penting dan punca utama bagi kebanyakan penyakit termasuk kanser.

Mutasi dalam gen-gen yang terlibat dalam penyambatan telah banyak dilaporkan dalam penyakit kanser. Variasi penyambatan pada gen-gen mungkin berkaitan dan mempunyai impak yang besar pada kanser paru-paru (Schwerk et al. 2005). Perkara ini telah digambarkan dalam kajian kepentingan penyambatan dan fungsi pengatur apoptosis, *BCL-X*, yang dilakukan oleh Schwert et al. (2005). Exon pertama pengekodan gen *BCL-X* mengandungi sebuah tapak penyekatan penyambatan. Di dalam kajian lepas, pra-mRNA *BCL-X* disambungkan keseluruhan exon dan intron dan ditranslasikan kepada protein untuk menghasilkan protein *BCL-X* yang berupaya menyekat proses apoptosis (Reeve et al. 1996). Manakala disebaliknya, pra-mRNA yang disambungkan dengan sebahagian daripada exon dan ditranslasikan kepada protein *BCL-XL* yang akan merangsangkan proses proapoptosis dalam masa yang singkat (Groeger et al. 2004; Karczmarek-Borowska et al. 2006).

Selain daripada itu, penyambatan RNA bagi gen *CD44* juga dikaitkan dengan patogenesis kanser paru-paru. Gen *CD44* mengandungi 10 jujukan exon dalam genom manusia. Proses penyambatan dan penyambungan exon yang berlaku ke atas gen ini dengan kepanjangan yang berlainan berupaya menjanakan pelbagai jenis protein isoform *CD44*. Isoform *CD44* yang paling biasa ditemui adalah *CD44s*. Fungsi *CD44s* adalah berkaitan dengan pembentukan matriks pada sel. Pengurangan

pengekspresan CD44s telah dikaitkan dengan proses metastasis dan tahap keagresifan kanker (Naor et al. 2002). Malahan, dalam kajian yang dilakukan oleh Pirinen et al. (2000) menunjukkan bahawa pengekspresan protein CD44s boleh dijadikan sebagai penanda biologi molekul bagi kes NSCLC. Beliau mendapati bahawa peningkatan pengekspresan gen *CD44s* adalah berkorelasi dengan kadar perkembangan metastasis tumor.

Perubahan proses penyambatan yang berkaitan dengan polimorfisme genetik juga berhubungkait dengan tahap risiko kanker paru-paru. Beberapa kajian kes telah menemui kaitan antara siklin D1 (*CCND1*) polimorfisme *G870A* akan meningkatkan risiko kanker paru-paru (Gautschii et al. 2007). *CCND1* adalah protein yang mengawal fasa G1-S mitosis sel melalui interaksi antara kinase-kinase CDK (Gautschi et al 2007). Polimorfisme *G870A* tidak mempunyai sebarang penukaran urutan asid amino *CCND1*, akan tetapi ia mempunyai corak pembentukan protein kompleks yang berlainan dan tidak dapat dikenalpasti oleh molekul hiliran dibawahnya. Ini menyebabkan fasa G1-S mitosis sel berlaku dengan jangka masa yang panjang (Lu et al. 2006; Solomon et al. 2003; Li et al. 2008).

5.3.2 Kajian In Vivo Gen *SON*

Ekoran daripada analisis fungsi in vitro yang mendapati bahawa perencatan *SON* telah menurunkan viabiliti sel dengan meningkatkan proses apoptosis, peranan *SON* dalam pertumbuhan tumor telah dikaji secara in vivo dengan menggunakan model tikus kanker paru-paru. Tikus yang telah diimplan subkutin dengan tumor xenograf titisan sel A549 adenokarsinoma paru-paru telah dirawat dengan siSON4. Kajian model tikus menunjukkan perencatan pengekspresan gen *SON* berjaya merencatkan pertumbuhan tumor serta menghalang tisu kanker sel A549 menembusi lapisan epidermis model tikus. Perencatan *SON* telah menghalang proliferasi sel serta proses migrasi dan invasi sel tumor. Berdasarkan pemerhatian pada kajian ini, terdapat pembentukan saluran darah baru pada tumor yang dirawat dengan siRNA tanpa sasaran dan tumor kawalan. Ini menunjukkan proses angiogenesis berlaku pada tumor kedua-dua model kanker tikus. Angiogenesis berlaku untuk membolehkan

tumor mendapat bekalan nutrien yang diperlukannya untuk berkembang. Dengan itu, proses replikasi sel berjaya disekat dengan menggunakan siSON4.

Kini, molekul kecil RNA yang bebenang ganda dua, siRNA, mempunyai potensi yang tinggi sebagai terapi bio-farmaseutikal. Molekul siRNA hanya akan berinteraksi dengan mRNA sasaran secara spesifik, maka kandungan DNA kromosom tidak akan berubah. Ekoran daripada ketidakbolehan siRNA berinteraksi dengan DNA, dengan ini ia telah mengurangkan kekhuatiran yang siRNA akan membawa kesan sampingan atau berlakunya perubahan kandungan gen seperti mana yang berlaku pada terapi gen yang menasaskan DNA.

Kaedah konvensional perawatan penyakit dengan menggunakan ubat kimia telah mencapai kebuntuan. Ubat-ubat kimia yang dihasilkan hanya mempunyai kesan penindasan yang terhad pada sesetengah kelas reseptor, saluran ion serta enzim (Fougerolles et al. 2007). Selain daripada itu, ubat-ubat biologi terkini seperti antibodi monoklonal atau sitokin hanya menasaskan pada permukaan sel atau hadir pada saluran darah sahaja. Perkara-perkara yang dinyatakan di atas tidak berlaku pada ubat biologi siRNA kerana ia boleh menasaskan sebarang mRNA gen yang wujud di dalam sel tanpa mengira lokasi mRNA di dalam sel (Bumcrot et al. 2006; Kim & Rossi 2007)

5.3.3 Pengekspresan SON Pada Sampel Klinikal Tisu Mikroatur

Kanser paru-paru merupakan penyakit yang sukar diubati dan mempunyai peratus kematian yang tinggi. Pada sesetengah kes ia adalah jenis kanser yang sangat agresif sehingga menyebabkan kematian pada pesakit dalam jangka masa yang pendek. Keupayaan mengenalpasti korelasi pengekspresan gen dengan profil diagnostik klinikal boleh membantu dalam pembangunan algorithm diagnostik yang boleh memanfaatkan strategi pengurusan kes kanser paru-paru.

Dalam kajian klinikal dan pra-klinikal, teknik imunohistokimia digunakan ke atas sampel tisu segar yang diawet dalam blok formalin parafin untuk tujuan diagnostik. Salah satu sebab utama tisu mikroatur digunakan dalam kajian ini adalah kerana pelantar ini menawarkan kaedah validasi pengekspresan protein sasaran yang

kos efektif dan cepat kerana ia boleh menganalisa ekspresi protein dalam banyak sampel klinikal secara serentak dan cepat. Dalam kajian ini, *SON* didapati berkecenderungan mempunyai pengekspresan tinggi pada tahap awal kes kanser paru-paru. Namun suatu kekurangan yang didapati dalam kajian ini adalah tisu mikroatur yang diperolehi tidak memaparkan sebarang maklumat klinikal mengenai jangka hayat setiap pesakit.

Adalah diketahui bahawa pada tahap permulaan kanser, sel kanser harus mempunyai keupayaan untuk membahagi dan mengembang dengan kadar yang cepat tanpa dikesani oleh sel imun. Protein *SON* yang dikesan tahap pengekspresannya yang tinggi pada tahap awal kanser mempunyai peranan yang penting dalam kitaran sel pada peringkat awal perkembangan kanser. Berdasarkan kajian lepas didapati kehilangan heterozigositi biasa dikesan pada gen yang terlibat dalam proses kitaran sel seperti *EGFR*.

Pada kebelakangan ini, *EGFR* telah digunakan untuk membantu pengenalpastian jenis terapi yang akan digunakan bagi kanser paru-paru. Walaupun hampir 35% kes kanser paru-paru didapati mempunyai pengekspresan gen *EGFR* yang tinggi, namun masih terdapat juga sebilangan besar kes NSCLC tidak mempunyai pengekspresan gen *EGFR* tetapi masih aktif membahagi (Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004; Pao et al. 2011). Berkemungkinan masih terdapat gen-gen dan mekanisme pembahagian sel yang masih tidak diketahui. Pada kajian tisu mikroatur didapati hampir 90% tisu tumor kanser paru-paru mempunyai pengekspresan protein *SON* berbanding dengan tisu normal. Ini mungkin boleh dijadikan sebagai penjelasan bagi persoalan hanya 25% kes kanser mempunyai pengekspresan gen *EGFR*. Berdasarkan keputusan kajian mikroatur dan keputusan kajian-kajian lepas didapati bahawa proses perangsangan replikasi sel boleh berlaku melalui pelbagai jenis tapak jalan, dan tapak jalan *EGFR* merupakan salah satu daripadanya. Adalah didapati protein *SON* terletak dibahagian hilir atas *EGFR* dan *SON* berkemungkinan berperanan merangsangkan pereplikasian sel melalui tapak jalan *RAS*, namun ia masih perlu dibuktikan.

Bab VI

KESIMPULAN

Penyelidikan kanser semakin rancak pada dua dekad yang terdekat susulan daripada kemajuan pelbagai teknologi biologi molekul. Antara yang paling popular digunakan dalam penyelidikan kanser adalah teknik pengkulturan titisan sel kanser. Ini adalah kerana penyelidikan titisan sel kanser dari segi teknikal dan kos kajian masih dalam lingkungan yang terkawal dan kebolehan dilakukan pada makmal institusi pengajian tinggi maka ia merupakan pemilihan utama untuk kajian penskrinan gen terapi. Manakala penskrinan gen terapi dengan menggunakan haiwan adalah lebih mencabar dari segi teknikal dan jauh lebih mahal berbanding dengan menggunakan titisan sel kanser. Namun kajian *in vivo* merupakan suatu keperluan untuk menentukan kesahihan keputusan *in vitro*. Pada kajian haiwan, kesan sistemik gen serta interaksi mikro-persekitaran tumor haiwan yang kompleks boleh diperhatikan dengan lebih komprehensif.

Di dalam kajian patologi kanser paru-paru ini, ia bermula dengan menggunakan perisian komputer Oncomine dan telah mengenalpasti sebanyak 235 gen yang mempunyai pengekspresan signifikan. Kajian *In silico* ini diteruskan dengan membuat penyaringan GSEA dan pembinaan tapak jalan biologi menggunakan perisian PathwayStudio 7.0 berdasarkan 235 gen. Hasilnya mendapati bahawa gen-gen tersebut dapat menyaring pada 6 gen set gen set anti-apoptosis, gen set pengawalan negatif proses apoptosis, gen set pengawalan negatif program kematian sel, gen set pengawalan negatif proses pertumbuhan dan gen set pengawalan proses pertumbuhan. Manakala perisian PathwayStudio pula kategori

gen-gen tersebut kepada tapak jalan angiogenesis, tapak jalan aktiviti telomerase, tapak jalan anti-apoptosis serta tapak jalan metastasis.

Setelah mengenalpasti gen-gen sasaran, maka gen-gen tersebut diuji peranannya dalam keperluan kepatogenikkan kanser paru-paru dengan menggunakan teknik gangguan RNA (RNAi). Keputusan penskrinan menunjukkan kebanyakan gen yang memberikan keputusan positif merupakan gen-gen yang terlibat dalam aktiviti anti-apoptosis dan diikuti dengan gen-gen yang terlibat dalam aktiviti angiogenesis. Ini bermakna gen-gen yang mengawal aktiviti anti-apoptosis lebih dominan dalam mengawal patogenik kanser paru-paru.

Kajian diteruskan dengan melakukan penskrinan gen-gen yang meningkatkan sensitiviti titisan sel adenokarsinoma A549 terhadap cisplatin apabila pengekspresannya dipendamkan. Hasilnya mendapati bahawa sebanyak 13 gen memberikan keputusan penskrinan positif. Keputusan ini berlainan dengan penskrinan RNAi di mana kebanyakan gen yang memberikan keputusan positif penskrinan sensitiviti pada cisplatin merupakan gen-gen yang terlibat dalam aktiviti angiogenesis. Dengan itu, berkemungkinan aktiviti angiogenesis memainkan peranan yang dominan dalam menentukan sensitiviti kanser paru-paru pada cisplatin.

Susulan daripada perbandingan keputusan penskrinan RNAi dan penskrinan RNAi meningkatkan sensitiviti pada cisplatin, maka gen *SON* dipilih untuk mencerap tahap pengekspresan gen tersebut dalam sampel klinikal adenokarsinoma paru-paru dengan menggunakan kaedah mikroatur tisu. Pengekspresan gen *SON* pada tisu adalah tinggi apabila dibandingkan dengan tisu normal. Apabila memerhatikan corak pengekspresan gen *SON* merentasi tahap-tahap kanser paru-paru mendapati bahawa pengekspresan gen *SON* semakin meningkat apabila merentasi tahap kanser paru-paru yang semakin tinggi. Justru, gen *SON* berkemungkinan memainkan peranan yang penting dalam patogenik kanser paru-paru.

Ekoran daripada keputusan yang diperolehi pada kajian sampel tisu klinikal, uji kaji diteruskan untuk menentukan serta mengetahui bagaimana fungsi dan tapak jalan molekul gen *SON* mempengaruhi patogenik kanser paru-paru dengan menggunakan gabungan teknik RNAi dan analisis mikroatur. Berdasarkan analisis kajian mikro atur DNA, mendapati bahawa gen *SON* merupakan pengawal utama pelbagai proses biologi yang bergantung pada komponen mikrotubul yang terlibat dengan aktif dalam mekanisme kitaran sel. Tambahan pula analisis data mikroatur juga menunjukkan gen *SON* terlibat dalam pengawalan pemprosesan RNA di dalam kitaran sel serta tapak jalan NOTCH yang penting dalam menentukan patogenesis kanser.

Kajian diteruskan dengan mengkaji kesan perencatan gen *SON* ke atas pertumbuhan kanser dalam model tikus yang telah transplan tumor secara xenograf. Keputusan analisis mendapati bahawa kumpulan tikus yang dirawat dengan siSON4 membawa tumor yang berkekurangan saiz tumor banding dengan tumor kawalan yang tanpa rawatan. Malahan, keputusan kajian rawatan siSON4 menunjukkan tumor titisan sel A549 tidak dapat bertumbuh melepasi bahagian epidermis kulit berbanding dengan tumor sel A549 kawalan yang bertumbuh menembus epidermis kulit sehingga menghala ke arah saluran darah bawah kulit.

Berdasarkan keputusan kajian *in vitro*, *in vivo*, tisu klinikal serta mikroatur DNA, fungsi gen *SON* berkait terus dengan gen yang terlibat dalam kitaran sel dan tapak jalan NOTCH, maka ia berpotensi sebagai sasaran rawatan yang boleh dibangunkan. Ini adalah kerana ketidakstabilan genom dan kehilangan kawalan kitaran sel merupakan penanda utama kanser dan ia merupakan keperluan asas bagi berlainan jenis penyakit manusia. Penemuan ke atas fungsi *SON* dalam mekanisme mitosis seperti mengawal tapak jalan NOTCH, komponen sentrosom, gen-gen kritikal untuk pembentukan mikrotubul dan mekanisme pembaikan DNA menunjukkan bagaimana *SON* mengambil peranan dalam tumorigenesis dan patogenesis kanser.

Kajian ini telah menunjukkan bahawa proliferasi titisan sel kanser paru-paru, A549, adalah sensitif pada perencatan gen *SON* secara *in vitro* dan *in vivo*.

Walaupun kajian ini dapat mengenalpasti gen *SON* sebagai gen berpotensi untuk dibangunkan sebagai sasaran rawatan kanser paru-paru, namun terdapat beberapa limitasi pada kajian ini. Antara limitasi tersebut adalah kesan perencatan gen *SON* pada jenis kanser sel NSCLC yang lain tidak dikaji serta model xenograft tikus *nude mice* yang membawa kanser NSCLC yang berlainan juga tidak dapat dikaji. Oleh yang demikian adalah diharapkan kajian seterusnya boleh bertumpu pada limitasi yang dinyatakan. Malahan daripada itu, kajian seterusnya juga boleh dilakukan ke atas kesan sinergi perencatan pertumbuhan kanser sel NSCLC apabila pengekspresan gen *SON* direncat dan dalam masa yang sama kanser sel NSCLC dirawat dengan agen kemoterapi yang berlainan. Selain itu, kajian lanjut juga harus dilakukan untuk menguji sama ada perencatan gen *SON* akan menyebabkan kesan toksik pada titisan sel yang normal. Bukan sahaja itu, kajian juga harus dilakukan untuk menentukan bahawa perencatan gen *SON* berupaya untuk menghalang sistem metastasis. Dengan itu, teknik perencatan pengekspresan gen *SON* yang berjangka panjang harus digunakan untuk menilai kesan perencatan gen ke atas proses metastasis. Ini adalah kerana berdasarkan hasil kajian yang dilakukan dalam projek ini mendapati gen *SON* terlibat dalam aktiviti kitaran sel dimana dalam sistem metastasis yang lengkap keupayaan melakukan kitaran sel pada tempat invasif yang baru merupakan komponen utama menentukan kejayaan proses metastasis berlaku.

RUJUKAN

- Abbosh P. H., Montgomery J. S., & Starkey J. A. Dominant-negative histone H3 lysine 27 mutant derepresses silenced tumor suppressor genes and reverses the drug-resistant phenotype in cancer cells. *Cancer Res* 2006. 66: 5582–91.
- Abcam®. 2009. Definitive guide to Western blot.
- Achanzar W. E., Webber M. M., Waalkes M. P. Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells. *Prostate* 2002;52:236–44.
- Ahlquist P. (2002). "RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing". *Science* **296** (5571): 1270–1273.
- Akita H., Doki Y. and Miyata H. 2006. Clinical significance of the second cycle response to cisplatin-based chemotherapy as preoperative treatment for esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 93: 401 – 409.
- Albanell J., Lonardo F. & Rusch V. 1997. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1609 – 1615.
- Albertella M.R, Lau A. & O'Connor M.J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. *DNA Repair (Amst)* 2005. 4:583–93.
- Allan L. A. & Clarke P. R. 2007. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell.* 26: 301–310.
- Alok T., Huen M. S., Sy S. M., Leung K. M., Ching Y. P. & Chen J. 2010. SON is spliceosome-associated factor required for mitotic progression. *Cell Cyle.* 9(13): 2679 – 2685.
- Ambion. 2005. *Illumina RNA Amplification Kit User Manual*. Texas: Ambion Inc.
- American Cancer Society. Cancer facts and figures 2014. Atlanta: American Cancer Society. 2014.
- Anderson V., Kern J. A., Slebos R. J. & Top B. 1994. C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 93(2): 516.
- Ando K., Ozaki T., Yamamoto H., Furuya K., Hosoda M. & Hayashi S. 2004. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 279: 25549–25561.

- Andrews P. A., Murphy M. P. & Howell S. B. 1987. Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 19: 149 – 154.
- Andrews P. A., Velury S., Mann S. C. & Howell S. B. 1988. *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 48: 68 – 73.
- Andrews P., Mann S., Velury S. & Howell S. 1988. Cisplatin uptake mediated cisplatin-resistance in human ovarian carcinoma cells. in book: *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*. Boston, MA: Martinus Nijhoff Publishing p. 248 – 254.
- Andrews R. J., Bringas J. R. & Muto R. P. 1993. Effects of mannitol on cerebral blood flow, blood pressure, blood viscosity, hematocrit, sodium, and potassium. *Surg. Neurol.* 39: 218 – 222.
- Angeletti C. A., Lucchi M. & Fontanini G. 1996. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIAN2). Impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer.* 78: 409 – 415.
- Apolinario R. M., van der Valk P. & Jong J. S. 1997. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 15: 2456 – 2466.
- Arinaga M, Shimizu S. & Gotoh K. 2000. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann. Thorac. Surg.* 70: 401 – 406.
- Asada N, Tsuchiya H, & Tomita K. 1999. De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line. *Anticancer Res.* 19:5131–5137.
- Augenlicht L.H. & Kobrin D. (1982). "Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor" *Cancer Research.* 42 (3): 1088–1093.
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L. & Akhtar N. 2003. Angiogenesis assays: A critical overview. *Clin. Chem.* 49: 32–40.
- Austin J. H., Garg K. & Aberle D. Radiologic implications of the 2011 classification of adenocarcinoma of the lung. *Radiology* 2013. 266: 62–71.
- Bagasra O. & Prilliman K.R. (2004). "RNA interference: the molecular immune system". *J. Mol. Histol.* 35 (6): 545–553.
- Bammler T., Beyer R.P., Consortium, Members of the Toxicogenomics Research; Kerr X.; Jing L.X., Lapidus S., Lasarev D.A., Paules R.S. and Li J.L. (2005).

- "Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms". *Nat Methods* 2 (5): 351–356.
- Bandala E., Espinosa M. & Maldonado V. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem. Pharmacol.* 2006. 62: 13 – 19.
- Barriger R. B., Barriger R. B., Fakiris A. J., Hanna N., Yu M. & Mantravadi P. Dose-volume analysis of radiation pneumonitis in non-small-cell lung cancer patients treated with concurrent cisplatin and etoposide with or without consolidation docetaxel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 1381-1386.
- Baselga J., Pfister D. & Cooper M. R. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 2000. 18: 904 – 914.
- Basu, A., & Krishnamurthy, S., Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J. Nucleic Acids*, 2010.
- Battifora H. 1986. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 55:244-248.
- Baulcombe D (2007). "Molecular biology. Amplified silencing". *Science* 315 (5809): 199–200.
- Beale P. J, Rogers P., Boxall F., Sharp S. Y, Kelland L. R. BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2000. 82:436–40.
- Belinsky S. A., Nikula K. J. & Palmisano W.A. 1998. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11891 – 11896.
- Belinsky S. A. 2004. Gene promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Natural Review Cancer* 2004. 4(9): 707 - 711.
- Bennett W. P., Hussain S. P. & Vahakangas K. H. 1999. Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J. Pathol.* 187: 8 – 18.
- Berdichewskii W., Turner, B. M., and Franchi, L. 1987. Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. Cell Sci.* 87, 269–282.
- Bernasconi N. L., Wormhoudt T. A. & Laird-Offringa I. A. 2000. Post-transcriptional deregulation of myc genes in lung cancer cell lines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23: 560 – 565.

- Berube M., Talbot M. & Collin C. 2005. Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin. *Int. J. Oncol.* 26: 405 – 413.
- Bernstein E, Caudy A, Hammond S. and Hannon G (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference". *Nature* **409** (6818): 363–366.
- Berger W., Elbling L. & Micksche M. 2000. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer.* 88: 293 – 300.
- Bhattacharjee A., Richards W. G. & Staunton J. 2001. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13790–13795.
- Betticher D. C., Heighway J. & Hasleton P. S. 1996. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 73: 294 – 300.
- Biorad®. 2010. Quick Start™ Bradford Protein Assay – Instruction Manual. Rev A – 4110065.
- Bischoff K. B. 1975. Some fundamental considerations of the applications of pharmacokinetics to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep.* 59: 777 – 793.
- Boopathy N. S. & Kathiresan K. Anticancer drugs from marine flora: an overview. *J Oncol.* 2011. 2010: 1-18.
- Booton R., Ward T., Ashcroft L., Morris J., Heighway J., Thatcher N.. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2007. 2: 902–906.
- Bose Girigoswami K., Bhaumik G. & Ghosh R. 2005. Induced resistance in cells exposed to repeated low doses of H₂O₂ involves enhanced activity of antioxidant enzymes. *Cell Biol. Int.* 29: 761 – 767.
- Boucher Y., Baxter L. T. & Jain R. K. 1990. Interstitial pressure gradients in tissue isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res.* 50: 4478 – 4484.
- Brabender J., Danenberg K. D. & Metzger R. 2001. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin. Cancer Res.* 7: 1850 – 1855.
- Bradford CR, Zhu S, Poore J, et al., Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Cooperative Study Group. p53 Mutation as a prognostic marker in

- advanced laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:605–9.
- Brambilla E., Negoescu A. & Gazzeri S. 1996. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am. J. Pathol.* 149: 1941 – 1952.
- Bray F., Sankila R., Ferlay J. & Parkin D. M. 2004. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer.* 38: 99-166.
- Brito D. A. & Rieder C. L. 2006. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* 16: 1194–1200.
- Brito D. A. & Rieder C. L. 2009. The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poiSONs differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66: 437–447.
- Britten RA, Kuny S, Perdue S. Modification of non-conservative double-strand break (DSB) rejoining activity after the induction of cisplatin resistance in human tumour cells. *Br J Cancer* 1999;79: 843–9.
- Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V. & Sah D. W. 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* 2: 711–719.
- Burbee D. G., Forgacs E. & Zechbauer-Muller S. 2001. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 691 – 699.
- Byun S. S., Kim S. W., Choi H., Lee C. & Lee E. 2005. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *B. J. U. Int.* 95: 1086 – 1090.
- Cabelguenne A., Lorient M. A., & Stucker I. 2001. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* 93: 725 – 730.
- Cagle P. T., El-Naggar A. K. & Xu H-J. 1997. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J. Pathol.* 150: 393 – 400.
- Cao W., Zuo J. & Fang F. 1999. Role of glutathione S-transferase pi in tumor drug resistance. *Zhong guo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 21: 402 – 406.
- Calegari F., Haubensack W., Yang D., Huttner W. B., & Buchholz F. Tissue specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 14236 - 14240.

- Caputi M., De Luca L. & Papaccio G. 1997. Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur. J. Histochem.* 41: 133 – 138.
- Castanotto, Daniela, Rossi and John J. (22 January 2009). "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics". *Nature* **457** (7228): 426–433.
- Chang N. S., Mattison J., Cao H., & Lee C. 1998. Cloning and characterization of novel transforming growth factor-beta-1-induced TIAF1 protein that inhibits tumor necrosis factor cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253(3): 743-749.
- Chang J., Chiang M., Lin S., & Chang N. S. 2012. TIAF1 self-aggregation in peritumor capsule formation, spontaneous activation of SMAD-responsive promoter in p53-deficient environment and cell death. *Cell death Dis.* 3: e302.
- Chanvorachote P, Nimmannit U, Stehlik C, et al. Nitric oxide regulates cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis through S-nitrosylation and inhibition of Bcl-2 ubiquitination. *Cancer Res* 2006. 66:6353-60.
- Chen H. H., Yan J. J., Chen W. C., Kuo M. T., Lai Y. H. & Lai W. W. Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer.* 2012. 75: 228–234.
- Cheng J. Q., Jiang X. & Fraser M. 2002. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist Updat* 5:131–146.
- Cheng H., Amos C. I., Xu W. & Spitz M. R. 2013. Is there a genetic basis for lung susceptibility? *Recent Results Cancer Res.* 151: 3.
- Chih L. L., Kelli D. M., Yasodha N., Robert B., Torsten O. N., Maggie C. C., Dmitry A. Turbin., Robert J. M., Matt R. & John P. T. 2005. TMA-Combiner, a simple software tool to permit analysis of replicate cores on tissue microarrays. *Modern Path.* 18: 1641-1648.
- Cobo M., Isla D., Massuti B., Montes A., Sanchez J. M. & Provencio M. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin. Oncol.* 2007. 25: 2747–2754.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J. L., Bell, J. C. & Duncan, P. I. 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* 15, 265–275.
- Cox G., Jones J. L. & Andi A. 2001. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Thorax.* 56: 561 – 566.

- Crawford D.R & Davies K.J. 1994. Adaptive response and oxidative stress. *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl 10): 25 – 28.
- Cullen K. J., Newkirk K. A., Schumaker L. M., Aldosari N., Rone J. D. & Haddad B. R. 2003. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res.* 63: 8097 – 8102.
- Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr V.A, Egwuagu C. & Reed E. 1992 ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 84:1512–1517.
- Dabholkar M., Bradshaw L. & Parker R. J. 1992. Cisplatin–DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ Health Perspect* 98:53–59.
- Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994;94:703–8.
- D’Amico T.A., Aloia T.A. & Moore M. B. 2000. Molecular biologic substaging of stage I lung cancer according to gender and histology. *Ann. Thorac. Surg.* 69: 882 – 886.
- D’Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA signaling pathway: disruption in cisplatin-sensitive ovarian cancers. *Cell Cycle* 2003;2:290–2.
- Dammann R., Takahashi T. & Pfeifer G. P. 2001. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene.* 20: 3563 – 3567.
- Davies M., Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. 2000. Decreased accumulation of [14C] carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J. Cell Physiol.* 183:108–116
- De Graaf T. W., de Jong S, de Vries EG, Mulder NH. Expression of proteins correlated with the unique cisplatin-sensitivity of testicular cancer. *Anticancer Res* 1997;17:369–75.
- Dharmacon™. 2009. RNAi, Gene Expression & Gene Editing – Reverse Transfection Optimization Plates protocol. No. V1-0115.
- Di Nicolantonio F, Mercer S.J. & Knight L.A. 2005. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer.* 5: 78.
- Ding L., Getz G. & Wheeler D. A. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008. 455:1069-1075.

- Dickson J. A. & Calderwood S. K. 1979. Effects of hyperglycemia and hyperthermia on the pH, glycolysis, and respiration of the Yoshida sarcoma in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 63: 1371 – 1381.
- Dempke W, Voigt W, Grothey A. & Schmoll H.J. Preferential repair of the N-ras gene in K 562 cells after exposure to cisplatin. *Anticancer Drugs* 1999;10:545–9.
- Dong Z, & Wang J. Hypoxia selection of death-resistant cells. A role for Bcl-X(L). *J Biol Chem* 2004;279:9215–21.
- Donze O. & Picard D. 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30: e46
- Dosaka-Akita H., Hu S. X. & Fujino M. 1997. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 79: 1329 – 1337.
- Driscoll B., Wu L. & Buckley S. 1997. Cyclin D1 antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth. *Am J. Physiol.* 273: 941 – 949.
- Dutt A., Ramos A. H. & Hammerman P. S. Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2011. 6: e20351.
- Ebadi M. & Iversen P. L. 1994. Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Gen Pharmacol.* 25: 1297 – 1310.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001. 6836: 494-498.
- Emara M. M., Ivanov P., Hickman T., & Anderson P. 2010. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J. Biol. Chem.* 285(14): 10959 – 10968.
- Endo T., Yoshikawa M. & Ebara M. 2004. Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents. *J. Gastroenterol.* 39: 1196 – 1201.
- Engelman J. A., Zejnullahu K. & Mitsudomi T. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007. 316: 1039-1043.
- Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B. and Herman J. G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research.* 61(8): 3225 - 3229.
- Ettinger D. S., Akerley W., Bepler G., Blum M. G., Chang A. & Cheney R. T. Non small cell lung cancer. *J Natl. Compr. Canc. Netw.* 2010; 8: 740-801.

- Eun-Young A., Russell C. D., Miao-Chia L., Tuyet A. N., Shinobu M., Anita B., Shatakshi P., Xiang-Dong F. & Dong-Er Z. 2011. SON Controls Cell-Cycle Progression by Coordinated Regulation of RNA Splicing. *Mol. Cell* 42: 185 – 198.
- Ezzati, M., Henley, S.J. & Lopez, A.D.; Thun, M.J. 2005. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int. J. Cancer*, 116: 963–971.
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S. and Mello C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* **391** (6669): 806–811.
- Fokkema E., Groen H. J., Helder M. N., de Vries E. G. & Meijer C. 2002. JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum–DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1989 – 1996.
- Fontanini G., Lucchi M. & Vignati S. 1997. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 881 – 886.
- Fontanini G., Vignati S. & Lucchi M. 1997. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br. J. Cancer.* 75: 1295 – 1301.
- Fougerolles A. de., Vornlocher H. P., Maraganore J. & Lieberman J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 443–453.
- Forgacs E., Biesterveld E. J. and Sekido Y. 1998. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene.* 17(12): 1557 - 1562.
- Fong K. M., Biesterveld E. J. & Virmani A. 1997. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res.* 57: 2256 – 2267.
- Fong K., Sekido Y. & Minna J. D. 2001. The molecular basis of lung carcinogenesis. NJ: Humana Press. 379–405.
- Fracasso M. E., Apostoli P., Benoni G., Bonetti A., Griso C. & Leone R. 1987. Kinetics of platinum in cancer patients treated with cisplatin at different doses. *Drugs Exp. Clin. Res.* 13: 367 – 372.

- Friboulet L., Olaussen K.A., Pignon J.P., Shepard F.A., Tsao M.S. & Graziano S. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013. 368: 1101–1110.
- Frohlich D. A., McCabe M. T., Arnold R. S. & Day M. L. 2008. The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis, *Oncogene* 27: 4335–4362
- Fuessel S., Herrmann J. & Ning S. 2006. Chemosensitization of bladder cancer cells by surviving-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA. *Cancer Lett.* 232: 243-254.
- Furuta T., Ueda T., Aune G., Sarasin A., Kraemer K. H. & Pommier Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res.* 2002. 62: 4899–4902.
- Garber M. E., Troyanskaya O. G. & Schluens K. 2001. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13784–13789.
- Gascoigne K. E. & Taylor S. S. 2008. Cancer cells display profound intra and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 14: 111–122.
- Gautschii I., Radovic S., Doric M. & Serdarevic F. 2007. Non-small cell lung carcinoma: cyclin D1, bcl-2, p53, Ki-67 and HER-2 proteins expression in resected tumors. *Bosn. J. Med. Sci.* 7(3): 205-211.
- Geradts J., Fong K. M. & Zimmerman P. V. 1999. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.* 5: 791 – 800.
- Girard L., Zochbauer-Muller S. & Virmani A. K. 2000. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.* 60: 4894 – 4906.
- Glaysheer S., Yiannakis D., Gabriel F.G., Johnson P., Polak M.E. & Knight L.A. Resistance gene expression determines the in vitro chemosensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer* 2009.9: 1–17.
- Goldie J.H. & Coldman A.J. 1985. A model for tumor response to chemotherapy: an integration of the stem cell and somatic mutation hypotheses. *Cancer Invest.* 3: 553 – 564.
- Gonzalez V. M., Fuertes M. A., Alonso C. & Perez J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001;59:657–63.

- Goodrum F. D. & Ornelles D. A. 1997. The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J. Virol.* 71: 548-556.
- Goodwin A. M. 2007. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc. Res.* 74: 172–183.
- Govindan R., Ding L. & Griffith M. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 2012. 150:1121-1134.
- Graham C.H., Kobayashi H., Stankiewicz K.S., Man S., Kapitan S.J. and Kerbel R.S. 1994. Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 975 – 982.
- Greenblatt M. S., Bennett W. P. & Hollstein M. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855 – 4878.
- Gregory R., Chendrimada T., Cooch N. and Shiekhattar R. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing". *Cell* **123** (4): 631–640.
- Groeger K., Manion M., Geldt D., Kim K. & Hockenbery M. 2004. Bcl-XL mutations suppress cellular sensitivity to antimycin A. *J. Biol.* 279(3): 2159-2165.
- Guichard M., Lespinasse F., Trotter M., Durand R. & Chaplin D. 1991. The effect of hydralazine on blood flow and misonidazole toxicity in human tumour xenografts. *Radiother. Oncol.* 20: 117 – 123.
- Ha G. H., Baek K. H., Kim H. S., Jeong S. J., Kim C. M. & McKeon F. 2007. p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res.* 67: 7155–7164.
- Hacia J.G., Fan J.B., Ryder O., Jin L., Edgemon K., Ghandour G., Mayer R.A., Sun B., Hsie L., Robbins C.M., Brody L.C., Wang D., Lander E.S., Lipshutz R., Fodor S.P. and Collins F.S. (1999). "Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays". *Nat Genet* **22** (2): 164–167.
- Hall M. D., Okabe M., Shen D. W., Liang X. J. & Gottesman M. M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. 48: 495–535.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57 – 70.

- Han J., Pyatibratov M., Tolkatches D., & Kostyukova A. S. 2010. Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization. *Arch. Biochem. Biophys.* 495(1): 74-81.
- Hara H., Yamashita K. & Shinada J. 2001. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 34: 219 – 226.
- Harley M. E., Allan L. A., Sanderson H. S. & Clarke P. R. 2010. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J.* 29: 2407–2420.
- Hecht S. S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1194 – 1210.
- Herman J. G. 2004. Epigenetis in lung cancer: focus on progression and early lesions. *Chest.* 125(5): 119 - 124.
- Higashimoto M., Kanzaki A. & Shimakawa T. 2003. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase in human esophageal carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 11: 337 – 341.
- Hiyama K., Hiyama E. & Ishioka S. 1995. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 895 – 902.
- Hildebrandt M. A., Gu J. & Wu X. Pharmacogenomics of platinum based chemotherapy in NSCLC. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2009. 5: 745–755.
- Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxalipatin. *Mol Pharmacol* 2006;70:1390–4.
- Houldsworth J, Xiao H. & Murty V.V, 1998. Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 16: 2345–2349.
- Hong S.Y., Eun-Hee H., Su-Jae L., Jeong H.B., & Hwang S.G. 2013. Depletion of hepatoma-derived growth factor-related protein-3 induces apoptotic sensitization of radioresistant A549 cells via reactive oxygen species-dependent p53 activation. *Biochem. & Biophys. Research Comm.* 439: 333-339.
- Hsieh E. T., Shepherd F.A. & Tsao M. S. 2000. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 29: 151 – 157.
- Huang P. Y., Liang X. M., Lin S. X., Luo R. Z., Hou J. H. & Zhang L. 2004. Correlation analysis among expression of ERCC-1, metallothionein, p53 and

- platinum resistance and prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* 23: 845 – 850.
- Huang C. P., Fofana M., Chan J., Chang C. J. & Howell S. B. Copper transporter 2 regulates intracellular copper and sensitivity to cisplatin. *Metallomics* 2014. 6: 654–661.
- Imielinski M., Berger A. H. & Hammerman P. S. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012. 150: 1107–1120.
- Ishida S., Lee J., Thiele D. J. & Herskowitz I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14298 – 14302.
- Ishikawa T., Wright C. D. & Ishizuka H. 1994. GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 269: 29085 – 29093.
- Isonishi S, Saitou M, Yasuda M, Tanaka T. Mitochondria in platinum resistant cells. *Hum Cell* 2001;14:203–10.
- Jain R. K. 1991. Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumours. *Int. J. Radiat. Biol.* 60: 85 – 100.
- Jemal A, Thomas A, & and Murray T. Cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 52: 23 – 47.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011, 61: 69–90.
- Ji L., Fang B. & Yen N. 1999. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res.* 59: 3333 – 3339.
- Ji H., Li D. & Chen L. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* 2006. 9: 485-495.
- Jin G., Kim M. J. & Jeon H. S. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung cancer.* 2010. 69: 279-283.
- John T., Kallioniemi P., Urs W., Juha K. & Guido S. 2001. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics*, 10: 657-662.

- Johnson S. W., Shen D., Pastan I., Gottesman M. M. & Hamilton T. C. 1996. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum–DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 226: 133 – 139.
- Kalayda G. V., Wagner C. H. & Jaehde U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J. Inorg. Biochem.* 2012. 116: 1–10.
- Kandioler-Eckersberger D., Kappel S. & Mittlböck M. 1999. The TP53 genotype but not immunohistochemical result is predictive of response to cisplatin based neoadjuvant therapy in stage III non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 117: 744 – 750.
- Kang S, Ju W, Kim JW, et al. Association between excision repair cross-complementation group 1 polymorphism and clinical outcome of platinum-based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp Mol Med* 2006;38:320–4.
- Karczmarek-Borowska, Manion M., Maquire B. & Hockenbery D. 2006. Bcl-x dimerization by three-dimensional domain swapping. *J. Mol. Biol.* 356(2): 367-381.
- Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A & Heuer D. 2010. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463: 818-822.
- Karnoub A. E. & Weinberg R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. 9: 517-531.
- Kartalou M. & Essigmann J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen* 2001. 478: 23–43.
- Kase H., Kodama S., Nagai E. & Tanaka K. 1998. Glutathione S-transferase pi immunostaining of cisplatin-resistant ovarian cancer cells in ascites. *Acta Cytol.* 42: 1397 – 1402.
- Katano K., Safaei R., Samimi G., Holzer A., Rochdi M. & Howell S. B. 2003. The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 64: 466 – 473.
- Khan J., Huang, S., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., & Spector, D. L. 1994. In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A) – RNA. *J. Cell Biol.* 126, 877–899.
- Kigawa J, Sato S. & Shimada M. 2001. p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Hum. Cell* 14:165–171.

- Kim D. H. & Rossi J. J. 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 8: 173–184.
- Kobayashi T., Fujii T., Jo Y., Kinugawa K. & Fujisawa M. 2004. Possible mechanism responsible for the acquisition of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) by cultured human testicular seminoma cells. *J. Urol.* 171: 1929 – 1933.
- Koberle B, Grimaldi KA, Suters A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JR. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 1997;70:551–5.
- Kondo M., Ji L. & Kamibayashi C. 2001. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene* 20: 6258 – 6262.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, & Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 4:844-847.
- Koukourakis M. I., Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003;89:877–85.
- Kozin S. V., Shkarin P. & Gerweck L. E. 2001. The cell transmembrane pH gradient in tumors enhances cytotoxicity of specific weak acid chemotherapeutics. *Cancer Res.* 61: 4740 – 4743.
- Kubokura H., Tenjin T. & Akiyama H. 2001. Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann. Thorac Cardiovasc. Surg.* 7: 197 – 203.
- Kuin A, Aalders M, Lamfers M, et al. Potentiation of anti-cancer drug activity at low intratumoral pH induced by the mitochondrial inhibitor *m*-iodobenzylguanidine (MIBG) and its analogue benzylguanidine (BG). *Br J Cancer* 1999;79:793–801.
- Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S. and Greene J.J. (1987). "Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences". *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (23)
- Kuo M. T., Chen H. H., Song I. S., Savaraj N. & Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007. 26: 71–83.

- Kuwahara D, Tsutsumi K, Kobayashi T, Hyoudou M, Koizuka I. 2002. Inhibition of caspase-9 activity in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 105:152–7.
- Larsen J. E & Minna J. D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin. Chest Med.* 2011. 32: 703-740.
- Larson CA, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol* 2009;75:324–30.
- Larson C. A., Adams P. L., Jandial D. D., Blair B. G., Safaei R. & Howell S. B. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* 2010. 80: 448–454.
- Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., Namath A.F., Gentile C., Hwang S.Y., Brown P.O. and Davis R.W. (1997). "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis". *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (24): 13057–13062.
- Laurencot C. M. & Kennedy K. A. 1995. Influence of pH on the cytotoxicity of cisplatin in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Oncol. Res.* 7: 371 – 379.
- Lee, E.; Oh, E., Lee, J., Sul, D. & Lee, J. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol. Sci.* 2004. 81, 121–132.
- Lee Y., Nakahara K., Pham J., Kim K., He Z., Sontheimer E. and Carthew R. (2004). "Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways". *Cell* **117** (1): 69–81.
- Leonhardt H. & Grigoleit H. G. 1977. Effects of pentoxifylline on red blood cell deformability and blood viscosity under hyperosmolar conditions. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 299: 197 – 200.
- Lerman M. I. & Minna J.D. 2000. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res.* 60: 6116 – 6133.
- Li R., An S. J., Zhang G., Mok T. S. & Wu Y. L. 2008. Expression of cyclin D1 splice variants is differentially associated with outcome in non-small cell lung cancer patients. *39(12): 1792-1801.*
- Lim E., Goldstraw P., & Nicholson A. G. Proceedings of the IASLC International Workshop on Advances in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. 2007. *J Thorac Oncol* 2008. 3: 1194–1201.

- Lin X., Okuda T., Holzer A. & Howell S. B. 2002. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* 62: 1154 – 1159.
- Ling W., Wang X. W., Sun J. J., Li L. Y., Li Xi. & Song X. R. 2015. Knockdown of Med19 suppresses proliferation and enhances chemo-sensitivity to cisplatin in NSCLC cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16(3): 875 – 880.
- Linardou H., Dahabreh I. J., & Kanaloupiti D. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2008. 9: 962-972.
- Lingfei K., Ping zhang Y. & Zheng guo L. 1998. A study on p16, pRb, cdk4 and cyclinD1 expression in non-small cell lung cancers. *Cancer Lett.* 130: 93 – 101.
- Liu Q., Rand T., Kalidas S., Du F., Kim H., Smith D. and Wang X. (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway". *Science* 301 (5641): 1921–1925.
- Liu P., Morrison C. & Wang L. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole exome sequencing. *Carcinogenesis* 2012. 33:1270-1276.
- Lord R.V., Brabender J., Gandara D., Alberola V., Camps C. & Domine M. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002. 8: 2286–2291.
- Lowe G. D. 1981. Defibrinating agents: effects on blood rheology, blood flow and vascular diseases in controlled studies. *Bibl. Haematol.* 247 – 251.
- Lu C., Spitz M. R., Zhao H., Dong Q., Truong M. & Chang J. Y. Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2006. 106: 441–447.
- Lung cancer (2011) NICE guideline CG121.
- Lutz R. J., Galbraith W. M., Dedrick R. L., Shrager R. & Mellett L. B.. A model for the kinetics of distribution of actinomycin-D in the beagle dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977. 200: 469 – 478.
- Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B. W., Harris P. L. & Harber D. A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350(21): 2129-2139.

- Macrae I, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks A, Cande W, Adams P. and Doudna J (2006). "Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer". *Science* **311** (5758): 195–198.
- Maimon C. R., Elina K. & Huang R. Pharmacogenomics of Cisplatin sensitivity in Non-small cell lung cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014. 12: 198 – 209.
- Manda G., Nechifor M. T., & Neagu T. M. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr. Chem. Biol.* 2009. 3: 342–366.
- Mandic R, Schamberger CJ, Muller JF, et al. Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin Cancer Res* 2005;11:6845–52.
- Mann S. C., Andrews P. A. & Howell S. B. 1988. Comparison of lipid content, surface membrane fluidity, and temperature dependence of cisdiamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res*, 8: 1211 – 1215.
- Mann S. C., Andrews P. A. & Howell S. B. 1990. Short-term cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 25: 236 – 240.
- Mao, L., Lee, J.S., Kurie, J.M., Fan, Y.H., Lippman, S.M., Lee, J.J., Ro, J.Y., Broxson, A., Yu, R., Morice, R.C., Kemp, B.L., Khuri, F.R., Walsh, G.L., Hittelman, W.N. & Hong, W.K. 1997. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (12): 857-8562.
- Mao C., Qiu L. X. & Liao R. Y. KRAS mutations and resistance to EGFR, TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung cancer*. 2010. 69: 272-278.
- Mapleson W. W. 1963. An electric analogue for uptake and exchange of inert gases and other agents. *J. Appl. Physiol.* 18: 197 - 204.
- Marquez R. T. & Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.* 2012. 2(2): 214-221.
- Maskos U. & Southern E.M. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ." *Nucleic Acids Res.* **20** (7): 1679–84. 11 Apr 1992.
- Masters J. R., Thomas R., & Hall A. G. 1996. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur. J. Cancer.* 32A: 1248 – 1253.

- Materna V., Liedert B., Thomale J. & Lage H. 2005. Protection of platinum–DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int. J. Cancer* 115: 393 – 402.
- Mattern J., Koomagi R. & Volm M. 1996. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br. J. Cancer*. 73: 931 – 934.
- McKeage M.J. 1995. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf.* 13:228 – 244.
- Medeiros R., Pereira D. & Afonso N. 2003. Platinum/paclitaxelbased chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 156 – 161.
- Meijera C, van Luyn M.J, Nienhuis E.F, Blom N., Mulder N.H & de Vries E.G. Ultrastructural morphology and localisation of cisplatin-induced platinum–DNA adducts in a cisplatin-sensitive and -resistant human small cell lung cancer cell line using electron microscopy. *Biochem. Pharmacol.* 2001;61:573–8.
- Melvik J. E., Dornish J. M. & Pettersen E. O. 1992. The binding of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) to extracellular and intracellular compounds in relation to drug uptake and cytotoxicity in vitro. *Br. J. Cancer* 66: 260 – 265.
- Mermoud, J. E., Cohen, P. T. & Lamond, A. I. 1994. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* 13, 5679–5688.
- Merlo A., Herman J. G. & Mao L. 1995. 59CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med.* 1: 686 – 692.
- Miller V. A., Hirsch F. R. & Johnson D. H. Systemic therapy of advanced bronchioloalveolar cell carcinoma: challenges and opportunities. *J. Clin. Oncol.* 2005. 23: 3288–3293.
- Min J., Stegner A. L., Alexander H. & Alexander S. 2004. Overexpression of sphingosine-1-phosphate lyase or inhibition of sphingosine kinase in *Dictyostelium discoideum* results in a selective increase in sensitivity to platinum-based chemotherapy drugs. *Eukaryot. Cell* 3: 795 – 805.
- Minagawa Y, Kigawa J. & Itamochi H. 1999. Cisplatin-resistant HeLa cells are resistant to apoptosis via p53-dependent and –independent pathways. *Jpn J Cancer Res.* 90:1373–9.

- Mitsudomi T., Hamajima N. & Ogawa M. 2000. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* 6: 4055 – 4063.
- Mittelstrass, K., Sauter, W., Rosenberger, A., Illig, T., Timofeeva, M., Klopp, N., Dienemann, H., Meese, E., Sybrecht, G. & Woelke, G. Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (MDM2) gene. *BMC Cancer*. 2008, 8: 113.
- Miyashita H., Nitta Y. & Mori S. 2003. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin. *Oral Oncol.* 39: 157 – 162.
- Mok T., Wu Y. L. & Zhang L. A small step towards personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Discov. Med.* 2009. 8: 227-231.
- Mogi A. & Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotech.* 2011. 2011: 583929.
- Moore, M.J., Wang, Q., Kennedy, C.J., & Silver, P.A. 2010. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 142: 625–636.
- Moran G., Stokes C., Thewes S., Hube B., Coleman D.C. and Sullivan D. (2004). "Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*". *Microbiology* **150**: 3363–3382.
- Mori T, Okamoto H, Takahashi N, Ueda R, Okamoto T. Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines. *FEBS Lett* 2000;465:124–8.
- Moyer A. M., Sun Z., Batzler A. J., Li L., Schaid D. J. & Yang P. Glutathione pathway genetic polymorphisms and lung cancer survival after platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010. 19: 811–821.
- Muizelaar J. P., Wei E. P., Kontos H. A. & Becker D. P. 1983. Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction and vasodilation in response to blood viscosity changes. *J. Neurosurg.* 59: 822 – 828.
- Murakami T, Shibuya I. & Ise T. 2001. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *Int. J. Cancer* 93:869–74.
- Nagalla T., Xu H, Spitz M. R., Amos C. I. & Shete S. 2013. Complex segregation analysis reveals a multigene model for lung cancer. *Hum. Genet.* 116(12): 121.

- Nagatani G, Nomoto M, Takano H, et al. Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:1592–7.
- Nakamura M., Nakatani K. & Uzawa K. 2005. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line H-1R. *Oncol. Rep.* 14: 1281 – 1286.
- Nakayama K., Miyazaki K., Kanzaki A., Fukumoto M. & Takebayashi Y. 2001. Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* 8: 1285 – 1287.
- Naor T., Okamoto I., Tsuiki H., Saya H. & Wong A. 2010. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am. J. Pathol.* 160(2): 441-447.
- Napoli C. & Jorgensen R. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. 1990. *Plant Cell.* 2: 279 -289.
- Nathan S. S., DiResta G. R. & Casas-Ganem J. E. 2005. Elevated physiologic tumor pressure promotes proliferation and chemosensitivity in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 11: 2389 – 2397.
- National Cancer Institute. Non-small cell lung cancer treatment. <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/nonsmall-cell-lung/healthprofessional/page10>>; 2014 [accessed 13.08.12].
- Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1127–31.
- Niklinska W., Burzykowski T. & Chyczewski L. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis. *Lung Cancer.* 34(Suppl 2): 59–64.
- Noguchi S., Miyauchi K, & Nishizawa Y. 1988. Augmentation of anticancer effect with angiotensin II in intraarterial infusion chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer.* 62: 467 – 473.
- Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, Mimata H. Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2005;14:993–7.
- Nyce J.W. 1997. Drug-induced DNA hypermethylation: a potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. *Mutat. Res.* 386: 153 – 161.

- Nykanen A., Haley B. & Zamore P. D. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309 – 313
- O'Byrne K. J., Koukourakis M. I. & Giatromanolaki A, 2000. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*. 82: 1427 – 1432.
- O'Byrne K. J., Cox G. & Swinson D. 2001. Towards a biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34(Suppl 2):S83 – 89.
- Offersen B. V., Pfeiffer P. & Hamilton-Dutoit S. 2001. Patterns of angiogenesis in non-small-cell lung carcinoma. *Cancer*. 91: 1500 – 1509.
- Ohsaki Y., Tanno S. & Fujita Y. 2000. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol. Rep.* 7: 603 – 607.
- Ohtsuka K., Ohnishi H. & Fujiwara M. Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas: tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component. *Cancer*. 2007. 109: 741-750.
- Okamura K., Ishizuka A., Siomi H. and Siomi M. (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways". *Genes Dev* **18** (14): 1655–1666.
- Olaussen K.A., Dunant A., Fouret P., Brambilla E., Andre F. & Haddad V. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 2006. 355: 983–991.
- Olopade OI, Wei M. FANCF methylation contributes to chemoselectivity in ovarian cancer. *Cancer Cell* 2003;3:417–20.
- Ookawa K., Shiseki M. & Takahashi R. 1993. Reconstitution of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene*. 8: 2175 – 2181.
- Oltersdorf M., Tilman H. & Dunant A. 2005. "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." *Nature* 435.7042: 677-681.
- Otta G., Nollet F., Kools., & van Roy F. 2004. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299(3): 551-572.

- Otterson G. A., Khleif S. N. & Chen W. 1995. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 29deoxycytidine. *Oncogene*. 11:1211 – 1216.
- Ou X., Campau S. & Slusher R. 1996. Mechanism of all-trans-retinoic acid mediated L-myc gene regulation in small cell lung cancer. *Oncogene* 13: 1893 – 1899.
- Paez A., Bell D. W., Okimoto R. A., Brannigan B. W. & Haber D. A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. 350(12): 2129-2139.
- Pak J, Fire A (2007). "Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*". *Science* **315** (5809): 241–244.
- Pao W, Parker T. & Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011. 12: 175-180.
- Park, I.W., Wistuba, I.I., Maitra, A., Milchgrub, S., Virmani, A.K., Minna, J.D., Gazdar, A.F. 1999. Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (21): 1863-1868.
- Parker R. J., Gill I. & Tarone R. 1991. Platinum–DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry. *Carcinogenesis* 12:1253–1258.
- Parker G., Eckert D. & Bass B. 2006. "RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA". *RNA* **12** (5): 807–818.
- Pastorino U., Andreola S. & Tagliabue E. 1997. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J. Clin. Oncol.* 15: 2858 – 2865.
- Pease A.C., Solas D., Sullivan E.J., Cronin M.T., Holmes C.P. and Fodor S.P. (1994) "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis". *PNAS* **91** (11): 5022–5026.
- Peklak-Scott C., Smitherman P. K., Townsend A. J. & Morrow C. S. Role of glutathione S-transferase P1–1 in the cellular detoxification of cisplatin. *Mol. Cancer Ther.* 2008. 7: 3247–3255.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 1996;56: 556–62.
- Perego P., Romanelli S. & Carenini N. 1998. Ovarian cancer cisplatin resistant cell lines: multiple changes including collateral sensitivity to Taxol. *Ann. Oncol.* 9: 423 – 430.

- Perkins N. D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2012. 12: 121-132.
- Pfeiffer P., Clausen P.P. & Andersen K. 1996. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185HER-2 in patients with systemically untreated non-small-cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br. J. Cancer* 74: 86 – 91.
- Pillai R.S., Bhattacharyya S.N. and Filipowicz W. (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?". *Trends Cell Biol* 17 (3): 118–126.
- Poirier M. C., Egorin M. J., Fichtinger-Schepman A. M., Yuspa S. H. & Reed E. 1988. DNA adducts of cisplatin and carboplatin in tissues of cancer patients. IARC Sci Publ.; pp. 313–20.
- Pollack J.R., Perou C.M., Alizadeh A.A. and Eisen M.B., Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999). "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays". *Nat Genet* 23 (1): 41–46.
- Pompella A., De Tata V., Paolicchi A. & Zunino F. 2006. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 71: 231– 238.
- Pope C. A., Burnett R. T., Turner M. C., Cohen A., Krewski D. & Jerrett M. Lung cancer and cardiovascular disease mortality associated with ambient air pollution and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationships. *Environ. Health Perspect.* 2011. 119(11): 1616-1621.
- Popovic P., Wong P., Goel R., Evans W. K., Howell S. B. & Stewart D.J. 1993. Pressure-tuning infrared spectra of cisplatin sensitive and resistant human ovarian cancer cells exposed to cisplatin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 34: 404.
- Popovic P., Wong P. T. T. & Kates M. 1994. Membrane fluidity and lipids in cisplatin resistant cells with low cisplatin uptake. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 35: 440.
- Prenzel N., Fischer O. M. & Streit S. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer* 2001. 8: 11-31.
- Prescott D. M., Charles H. C. & Poulson J. M. 2000. The relationship between intracellular and extracellular pH in spontaneous canine tumors. *Clin. Cancer Res.* 6: 2501 – 2505.

- Presteria T., Zhang Y., Spencer S.R., Wilczak C.A. and Talalay P. 1993. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Adv Enzyme Regul.* 33: 281 – 296.
- Prinen J., Zhu D. & Bourguignon L. 2000. Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. *J Cell Physiol.* 183(2): 182-195.
- Qiao G., Wu Y. L., & Weisheng Z. 2002. Polymorphisms of the Glutathione S-transferase u and CYP1A1 genes related to the prognosis of non-small cell Lung cancer, *Chinese Journal of Cancer.* (9): 356.
- Qiu S., Adema C. & Lane T. (2005). "A computational study of off-target effects of RNA interference". *Nucleic Acids Res* **33** (6): 1834–1847.
- Rabik C. A. & Dolan M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007. 33: 9–23.
- Rachwal, W.J., Bongiorno, P.F., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Ethier, S.P. & Beer, D.G. 1995. Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br. J. Cancer.* 72(1): 56-64.
- Raghuand N., He X. & van Sluis R. 1999. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br. J. Cancer* 80: 1005 – 1011.
- Raghuand N. & Gillies R. J. 2000. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist. Updat.* 3: 39 – 47.
- Rashmil S. & Sunil B. 2013. Tissue Microarray – Construction and Quality Assurance. Dlm. *IHC Guidebook.* Hlm. 145-151. Dako Denmark A/S.
- Raso M. G. Feed O. & Wistuba I. I. Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *J. Thorac. Oncol.* 2007. 2: S128-135.
- Reed E, Ozols RF, Tarone R, Yuspa SH, Poirier MC. Platinum–DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:5024–8.
- Reed E. Platinum–DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1998;24:331–44.
- Reed E, Ostchega Y, Steinberg SM, et al. Evaluation of platinum–DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1990;50:2256–60.

- Reeve G., Xerri L., Hassoun J., Reed J., & Birnbaum D. 1996. Predominant expression of the long isoform of Bcl-x in human lymphomas. *Br. J. Haematol.* 92(4): 900-906.
- Reissmann P. T., Koga H. & Takahashi R. 1993. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene.* 8: 1913 – 1919.
- Richardson M. E. & Siemann D. W. 1994. Thiol-related mechanisms of resistance in a murine tumor model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29: 387 – 392.
- Richardson G. E. & Johnson B. E. 1993. The biology of lung cancer. *Semin. Oncol.* 20: 105 – 127.
- Richardson A, Kaye SB. Drug resistance in ovarian cancer: the emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance. *Drug Resist Updat* 2005;8:311–21.
- Rieder C. L. & Maiato H. 2004. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 7: 637–651.
- Riely G. J., Kris M. G. & Rosenbaum D. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2008. 14: 5731-5734.
- Rusch, V., Baselga, J., Cordon-Cardo, C., Orazem, J., Zaman, M., Hoda, S., McIntosh, J., Kurie, J. & Dmitrovsky, E. 1993. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res.* 53 (10 Suppl.): 2379-2385.
- Rosell R., Lord R.V., Taron M. & Reguart N. 2002. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 38: 217–227.
- Rosell R, Taron M, Barnadas A, Scagliotti G, Sarries C, & Roig B. 2003. Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Control.* 10:297–305.
- Rosell R, Taron M, & Ariza A. 2004. Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer. *Semin. Oncol.* 31:20–27.
- Safaei R., Katano K. & Samimi G. 2004. Cross-resistance to cisplatin in cells with acquired resistance to copper. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53: 239 – 246.
- Safaei R. & Howell S. B. 2005. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 53: 13 – 23.

- Saitoh, N. Spahr, C. S., Patterson, S. D., Bubulya, P., Neuwald, A. F. & Spector, D. L. 2004. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol. Biol. Cell* 15, 3876–3890.
- Samet, J.M.; Avila-Tang, E.; Boffetta, P.; Hannan, L.M.; Olivo-Marston, S.; Michael J. Thun, M.J. & Rudin, C.M. 2009. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin. Cancer Res.* 15, 5626–5645.
- Samimi G., Varki N. M., Wilczynski S., Safaei R., Alberts D. S. & Howell S. B. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2003. 9: 5853–5859.
- Samimi G., Safaei R. & Katano K. 2004. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 10: 4661 – 4669.
- Schena M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270 (5235): 467-70.
- Schmutz S., Frank M., & Kemler R. 2004. Protocadherins. *Curr Opin. Cell Biol.* 14(5): 557-562.
- Schomber, T., Kalberer, C.P., Wodnar-Filipowicz, A. & Skoda, R.C. 2004. Gene silencing by lentivirus-mediated delivery of siRNA in human CD34+ cells. *Blood*. 103 (12): 4511-4513.
- Schwartz V., Puglisi F, Barbone F, Tell G, Aprile G, Pertoldi B, Raiti C, Kelley MR, Damante G, Sobrero A, Beltrami CA, & Di Loreto C. 2002. Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage I-III breast carcinomas. *Oncol. Rep.* 9: 11-7.
- Schwerk J., Kurdow R., Zoefelt S., Boehle A. S. & Kalthoff H. 2005. Apoptosis by gemcitabine in Non-small cell lung cancer cell line KNS62 is induced downstream of caspase 8 and is profoundly blocked by Bcl-x over-expression. *Langenbecks Arch. Surg.* 390(3): 243-248.
- Sekido Y., Bader S. & Latif F. 1996. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4120 – 4125.
- Sekido Y., Fong K.M. & Minna J. D. 1998. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1378: 21 – 59.
- Sharma H, Sen S, Lo Muzio L, Mariggio A, Singh N. Antisense mediated downregulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes

head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 2005;4:720–7.

Shen, C., & Reske, S.N. 2004. Adenovirus-delivered siRNA. *Methods Mol. Biol.* 252: 523-532.

Shigematsu H., Lin L., & Takahashi T. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005. 97: 339-346.

Siddik Z. H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 22: 7265 – 7279.

Siegel R, Ma J, Zou Z and Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* 2014. 64: 9–29.

Sijen T., Steiner F., Thijssen K. and Plasterk R (2007). "Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class". *Science* **315** (5809): 244–247.

Siomi, Haruhiko, & Mikiko C. 2009. "On the road to reading the RNA-interference code". *Nature* **457** (7228): 396–404.

Siprashvili Z., Sozzi G. & Barnes L. D. 1997. Replacement of FHIT in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:13771 – 13776.

Shi J., Orth J. D. & Mitchison T. 2008. Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res.* 68: 3269–3276.

Slebos R. J., Hruban R. H. & Dalesio O. 1991. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 1024 – 1027.

Sohail M., Doran G., Riedermann J., Macaulay V. & Southern E. M. 2003. A simple and cost effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Res.* 31: e (2003).

Solomon C., Pratt M. & Niu M. 2003. Bcl-2 controls caspase activation following a p53-dependent cyclin D1-induced death signal.

Song I. S., Savaraj N., Siddik Z. H., Liu P. M., Wei Y. J. & Wu C. J. Role of human copper transporter Ctrl in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol. Cancer Ther.* 2004. 3: 1543–1549.

Soria J. C., Lee H. Y. and Lee J. I. 2002. Lack of PTEN expression in non small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical Cancer Research*. 8(5): 1178 - 1183.

- Soti C. and Csermely P. 2006. Pharmacological modulation of the heat shock response. *Handb Exp. Pharmacol.* 417 – 436.
- Sozzi G., Veronese M.L. & Negrini M. 1996. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17 – 26.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatinresistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 2003;10:808–22.
- Sriram K. B., Larsen J. E. & Yang I. A. Genomic medicine in non-small cell lung cancer: paving the path to personalized care. *Respirology* 2011. 16: 257-263.
- Stephanie K., Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W. & Buerger H. 2003. Demystified...tissue microarray technology. *Mol. Pathol.* 56:198-204.
- Stephens P., Hunter C., & Bignell G. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 2004. 431: 525-526.
- Stewart D. J., Grewaal D. & Popovic P. 1995. Effect of cations on cisplatin uptake and efficacy in lung cancer cell lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 36: 399.
- Stewart D. J., Molepo J. M. & Green R. M. 1995. Factors affecting platinum concentrations in human surgical tumour specimens after cisplatin. *Br. J. Cancer.* 71: 598 – 604.
- Stewart D. J., Grewaal D., Molepo J. M., Popovic P. & Goel R. 1996. Effect of metabolic inhibitors and cations on cisplatin efflux from lung cancer cell lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 37: 174.
- Stewart D. J., Raaphorst G.P., Yau J. and Beaubien A.R. 1996. Active vs. passive resistance, dose–response relationships, high dose chemotherapy, and resistance modulation: a hypothesis. *Invest New Drugs.* 14: 115 – 130.
- Stewart D., Molepo M., Mikhael N., Montpetit V. & Goel R. 1998. Factors associated with tumor cisplatin content. In: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 39: 2236.
- Stewart D.J., Tomiak E., Shamji F.M., Maziak D.E. & MacLeod P. 2004. Phase II study of alternating chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 44: 241 – 249.
- Stewart D., Chiritescu G., Dahrouge S., Banerjee S. & Tomiak E. Chemotherapy dose–response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms. *Cancer Treat. Rev.* 2007. 33: 101 – 137.

- Stewart D. J. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. 75: 173–234.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:13–30.
- Subramanian J. & Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol.* 2008. 9: 676-682.
- Sui, G., Soohoo, C., Affar, el, B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C. & Shi, Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (8): 5515-5520.
- Surowiak P., Materna V. & Kaplenko I. 2005. Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Arch.* 447: 626 – 633.
- Sun CL, Chao CC. Cross-resistance to death ligand-induced apoptosis in cisplatin-selected HeLa cells associated with overexpression of DDB2 and subsequent induction of cFLIP. *Mol Pharmacol* 2005;67:1307–14.
- Sun N., Sun X., Chen B., Cheng H., Feng J. & Cheng L. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010. 65: 437–446.
- Suzuki M., Hori K., Abe I., Saito S. & Sato H. 1981. A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 663 – 669.
- Sweeney C., Nazar-Stewart V., Stapleton P. L., Eaton D. L. & Vaughan T. L. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003. 12: 527–533.
- Takahashi K., Seki T. & Nishikawa K. 1985. Antitumor activity and toxicity of serum protein-bound platinum formed from cisplatin. *Jpn J. Cancer Res.* 76: 68 – 74.
- Takahashi T., Nau M. M. & Chiba I. 1989. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science.* 246: 491 – 494.
- Takenaka T., Yoshino I., Kouso H., Ohba T., Yohena T. & Osoegawa A. Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 2007. 121: 895–900.

- Tamura M., Ohta Y. & Kajita T. 2001. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 8: 1097 – 1102.
- Taniguchi K., Wada M. & Kohno K. 1996. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 56: 4124 – 4129.
- Teicher B. A., Lazo J. S. & Sartorelli A. C. 1981. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* 41: 73 – 81.
- Terrano D. T., Upreti M. & Chambers T. C. 2010. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 30: 640–656.
- Thunnissen E, Beasley M. B & Borczuk A. C. Reproducibility of histopathological subtypes and invasion in pulmonary adenocarcinoma. An international interobserver study. *Mod. Pathol.* 2012. 25:1574–1583.
- Tomizawa Y., Sekido Y. & Kondo M. 2001. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13954 – 13959.
- Tomizawa K., Suda K. & Onozato R. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* 2011. 74: 139-144.
- Toyooka S., Maruyama R. and Toyooka K. O. 2003. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non small cell lung cancer. *International Journal of Cancer.* 103(2): 153 - 157.
- Toyozumi Y, Arima N, Izumaru S, Kato S, Morimatsu M, Nakashima T. Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human laryngeal squamous cell carcinoma, HEP-2 cells. *Int J Oncol* 2004;25:721–8.
- Travis W. D., Garg K., & Franklin W. A. 2005. Evolving concepts in the pathology and computed tomography imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma. *J Clin Oncol.* 23: 3279–3287.
- Travis W. D., Brambilla E. & Noguchi M. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011. 6:244–285.
- Trenz K, Lugowski S, Jahrsdorfer U, Jainta S, Vogel W, Speit G. Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1

- mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics. *Mutat Res* 2003;544:279–88.
- Trimarchi J. M. & Lees J. A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 2002. 3:11-20.
- Tsai C. M., Chang K. T. & Perng R. P. 1993. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 897 – 901.
- Turner N. & Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2010. 10: 116-129.
- Turner M. C., Krewski D., Pope C. A., Chen Y., Gapstur S. M. & Thun M. J. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 2011. 184: 1374-1381.
- Tyczynski, J.E., Bray, F., Aareleid, T., Dalmás, M., Kurtinaitis, J., Plesko, I., Pompe-Kirn, V., Stengrevics, A. & Parkin, D.M. 2004. Lung cancer mortality patterns in selected Central, Eastern and Southern European countries. *Int. J. Cancer.* 109: 598–610.
- Upadhyay A. K., Singh S., Chhipa R. R., Vijayakumar M. V., Ajay A. K. & Bhat M. K. 2006. Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216: 177 – 185.
- Van Cleave & Cooley M. 2004. Tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Lyon, IARC Press. 9-124.
- van der Straaten T, Mullenders L. & Guchelaar H. J. Pharmacogenetics of cancer and DNA repair enzymes. In: Vengrova S, editor. DNA repair and human health [internet]. Richardson: Intech; 2011. p. 597–612.
- von Tempelhoff G. F., Heilmann L., Hommel G. & Pollow K. 2003. Impact of rheological variables in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 29: 499 – 513.
- Vantieghem A., Xu Y., Assefa Z., Piette J., Vandenheede J. R. & Merlevede W. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 37718–37731.
- Vermeulen A., Behlen L., Reynolds A., Wolfson A., Marshall W., Karpilow J. and Khvorova A. (2005). "The contributions of dsRNA structure to dicer specificity and efficiency". *RNA* 11 (5): 674–682.

- Vermorken J. B., van der Vijgh W. J., Klein I., Hart A. A., Gall H. E. & Pinedo H. M. 1984. Pharmacokinetics of free and total platinum species after short term infusion of cisplatin. *Cancer Treat. Rep.* 68: 505 – 513.
- Vineis P., Hoek G., Krzyzanowski M., Vigna-Taglianti F., Veglia F. & Airoldi L. Air pollution and risk of lung cancer in a prospective study in Europe. *Int J Cancer* 2006. 119: 169-174.
- Vogler T., Meike S. & Pak J. 2008. "Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy." *Cell Death & Differentiation* 16.3: 360-367.
- Volm M. & Koomagi R. Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 2000. 7: 95 – 98.
- Wahl M.L, Owen J.A. & Burd R. 2002. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 2002. 1:617–28.
- Wakelee, H.A.; Chang, E.T.; Gomez, S.L.; Keegan, T.H.; Feskanich, D.; Clarke, C.A.; Holmberg, L.; Yong, L.C.; Kolonel, L.N.; Gould, M.K.; West, D.W. Lung cancer incidence in never smokers. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 472–478.
- Wang W., Ke S. & Chen G. 2004. Effect of lung resistance-related protein on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 12: 1365 – 1370.
- Wang L., Wei J., Qian X., Yin H., Zhao Y. & Yu L. 2008. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer.* 8: 97.
- Wachters F. M., Wong L. S., Timens W., Kampinga H. H. & Groen H. J. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. *Lung Cancer* 2005. 50: 211–219.
- Webb SD, Sherratt JA, Fish RG. Mathematical modelling of tumour acidity: regulation of intracellular pH. *J Theor Biol* 1999. 196:237–50.
- Wei S. Z., Zhan P., Shi M. Q., Shi Y., Qian Q. & Yu L. K. Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinumbased chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Med. Oncol.* 2011. 28: 315–321.
- Wei H. B., Hu J., Shang L. H., Zhang Y. Y., Lu F. F. & Wei M. A meta-analytic review of ERCC1/MDR1 polymorphism and chemosensitivity to platinum in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J. (Engl)* 2012;125:2902–7.

- Weijzen L., Jundt F., Mathas T. & Stein H. 2002. Activated Notch 1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 99(9): 3398-3403.
- Weiner, D.B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A. & Kern, J.A. 1990. Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res*. 50 (2): 421-425.
- White L. K., Wright W. E. & Shay J. W. 2001. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol*. 19: 114 – 120.
- Williams J, Lucas PC, Griffith KA, et al. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol Oncol* 2005;96:287–95.
- Wistuba, I.I., Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J.D. & Gazdar, A.F. 1999. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*. 18 (3): 643-650.
- Wistuba I., Behrens C. & Virmani A. K. 2000. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 60: 1949 – 1960.
- Wistuba I. I., Gazdar A. F. & Minna J. D. 2001. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin. Oncol*. 28 (2 Suppl 4): 3 – 13.
- Wong X., & Li W. 2007. "RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult Drosophila". *Science*. 312 (5772): 452–454.
- Wu X., Lu C., Ye Y., Chang J., Yang H. & Lin J. 2008. Germline genetic variations in drug action pathways predict clinical outcomes in advanced lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Pharmacogenet. Genomics*. 18: 955–965.
- Wu L., Ma C. A., Zhao Y. & Jain A. 2011. Aurora B interacts with NIP-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression. *J. Biol. Chem*. 286: 2236–2244.
- Wu Q., Maniatis T. & Lin J. 1999. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell*. 97(6): 779-790.
- Wynn, S. L., Olsen, J., Dyck, J. A., Wang, H. Y., & Fu, X. D. 2000. Organization and conservation of the *GART/SON/DONSON* locus in mouse and human genomes. *Genomics* 68, 57–62.

- Xu Z. Y., Loignon M0, Han F. Y., Panasci L & Aloyz R. Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. *J Pharmacol. Exp. Ther* 2005;314:495–505.
- Xian J., Clark K. J. & Fordham R. 2001. Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the *Dutt1/Robo1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 15062 – 15066.
- Xinarianos G., Scott F. M. & Liloglou T. 2000. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer* 28: 37 – 42.
- Yang X, Xing H, Gao Q, et al. Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 97:413–21.
- Yarden Y. & Sliwkowski M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. 2: 127-137.
- Yashima K., Litzky L. A. & Kaiser L. 1997. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res.* 57: 2373 – 2377.
- Yeakley, J. M., Tronchere, H., Olsen, J., Dyck, J. A., Wang, H. Y. & Fu, X. D. 1999. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Biol.* 145, 447–455.
- Yeh J. J., Hsu N. Y., Hsu W. H., Tsai C. H., Lin C. C. & Liang J. A. 2005. Comparison of chemotherapy response with P-glycoprotein, multidrug resistance related protein-1, and lung resistance-related protein expression in untreated small cell lung cancer. *Lung* 183: 177 – 183.
- Yin J. Y., Huang Q., Zhao Y. C., Zhou H. H. & Liu Z. Q. 2012. Meta-analysis on pharmacogenetics of platinum-based chemotherapy in non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *PLoS One*. 7: e38150.
- Yip P. Y., Yu B., & Cooper W. A. Patterns of DNA mutations and ALK rearrangement in resected node negative lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2013. 8:408-414.
- Yu D., Wang S. S., & Dulski K. M. 1994. c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis associated properties. *Cancer Res.* 54: 3260 – 3266.
- Yu D., Shi J., Sun T., Du X., Liu L. & Zhang X. Pharmacogenetic role of ERCC1 genetic variants in treatment response of platinum-based chemotherapy

- among advanced non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biol.* 2012. 33: 877–884.
- Yu J. J., Bicher A, Ma YK, Bostick-Bruton F, Reed E. Absence of evidence for allelic loss or allelic gain for ERCC1 or for XPD in human ovarian cancer cells and tissues. *Cancer Lett* 2000;151:127– 32.
- Yu L, Wang Z. Difference in expression of Bcl-2 and Bcl-xl genes in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human in ovarian cancer cell lines. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004;24:151–3.
- Yuan A., Yu C. J. & Kuo S. H. 2001. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 19: 432 – 441.
- Zainal A. O & Nor Saleha I. T. National Cancer Registry Report Malaysia Cancer Statistics – Data and Figure 2007. 2007. National Cancer Registry, Ministry of Health Malaysia.
- Zamore P., Tuschl T., Sharp P. and Bartel D. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals". *Cell* **101** (1): 25–33.
- Zhang Q., Wu J.X., Wei Y.P., Hao J.Q., Huang S.Y., & Dong L. 2012. Effect of XPA expression on the chemotherapy sensitivity of A549/DDP cells. *Chin. J. Cell Mol. Immunol.* 28:1182–1184.
- Zhao Y. and Srivastava D. (2007). "A developmental view of microRNA function". *Trends Biochem. Sci.* **32** (4): 189–197.
- Zhen W, Link Jr CJ, O'Connor PM, et al. Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Mol Cell Biol* 1992;12:3689–98.
- Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2007;73:298–307.
- Zochbauer-Muller S. & Minna J. D. 2000. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 681 – 708.
- Zochbauer-Muller S., Fong K. M., Virmani A. K., Geradts J., Gazdar A. F. and Minna J. D. 2001. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non small cell lung cancers. *Cancer Research.* 61(1): 249 - 253.
- Zwelling LA, Kohn KW. 1979. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II). *Cancer Treat. Rep.* 63:1439–44.

LAMPIRAN A

Artikel diterbitkan di Asia Pacific Cancer (21), (2011) pg72-74

Identify novel therapeutic target and chemosensitizer loci of non-small cell lung cancer by using synthetic lethal screen

Pang Jyh Chyang¹ & Roslan Harun¹

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), UKM Medical Centre, Jalan Ya'acob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

Phone : +603-91456321

*Corresponding author: pjchyang@gmail.com

Abstract

Purpose: The objective of this study was to use Oncomine to identify genes that possible implication to non small cell lung cancer pathogenesis and development. **Methods:** A meta-analysis was performed on several microarray studies on non small cell lung cancer found in Oncomine database. The meta-analysis included 5 studies with a total of 111 microarrays. Identified targeted genes were further verified by using RNA silencing and its potential to enhance cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer. **Results:** A total of 586 genes were identified up-regulated with significance of 30% and p-value < 0.05. The 586 genes were then analyzed of its druggable ability in Oncomine web interface analysis software of chemical substances and small molecules analysis. The narrowed down significance genes are now 326 genes. These genes were further annotated their function by using gene ontology classification analysis in Oncomine. It was found that majority of the significance genes are involves in anti-apoptotic activity, approximately 46% of total 326 genes. Other genes are involved in angiogenesis (8%), telomerase activity (12%), cell cycle (23%) and oxidative gene (13%). The classified genes were then input into pathway studio 6.0 for pathway analysis. Pathways were built by using gene name. Genes of interest were selected for silencing RNA, gene functional analysis. A total of 80 genes were selected for the functional analysis on A549 cell lines. Out of 80 genes that have been silenced only 6 genes give effect on A549 cell viability. The 80 genes were then further investigated its role in chemosensitivity. A total of 12 genes, after been silenced, are found to response to cisplatin treatment. The proliferation rate of A549 cell lines are reduced ranging from 36% to 86% when cells were treated with combination of siRNAs and cisplatin. Genes that cause reduction of proliferation rate of A549 when treated with siRNAs alone are PCDH11, SON, API5, CFLAR, PSMA6 and ATP6AP2. Meanwhile genes that implicate sensitiveness to cisplatin when silenced are PLXDC1, FLT1, MCL1, FGF2, EPAS1, JAG1, TERF2, API5, TNFSF12, CFLAR, SON, and ATP65. Besides that there are genes, when depleted, caused cell proliferation increased. **Conclusions:** The identified genes could be keys in elucidating how the pathogenesis and development of NSCLC occur.

Keywords: Lung cancer, silencing RNA, chemosensitivity

LAMPIRAN B

Artikel diterbitkan di *Respirology* (16) 2011, pg 30

DREV1 INHIBITION PROMOTES PROLIFERATION AND INVASION OF LUNG ADENOCARCINOMA (A549) THROUGH ACTIVATION OF PI3K AND MAPKK PATHWAYS

P Jyh CHYANG¹, N Shukriyah M HAZIR^{1,2}, J HADI¹, I ROSE⁴, R HARUN^{1,3}

¹UKM Medical Molecular Biology Institute, Kuala Lumpur, Malaysia,

²Institute of Medical Science Technology, University Kuala Lumpur, Kuala Lumpur, Malaysia,

³Department of Medicine, UKM Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia, and

⁴Department of Pathology, UKM Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia

Introduction We have previously identified 13-gene signature associated with survival in advanced non-small cell lung cancers (NSCLCs). Decreased expression of one of the genes, DREV1, was associated with shorter survival. The exact mechanism how reduction of DREV1 leads to shorter survival is still not known. **Objective** To determine the how inhibition of DREV1 contributes to reduced survival of patients with NSCLCs. **Methods** Quantitative Real Time PCR (qPCR) and Tissue Microarray Immuno-histochemistry (TMA-IHC) were performed to validate the expression of DREV1. Silencing of DREV1 was done using DHARMACON™ Smart-Pooled Small Interfering RNA (Thermo Scientific) on the A549 lung adenocarcinoma cell line. Cell viability and apoptosis were measured using CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (PROMEGA) and Caspase-Glo® 3/7 Assay (PROMEGA) respectively. The effect of DREV1 inhibition on cell invasion was studied using QCM 24-well Collagen-Based Cell Invasion Assay-Colorimetric (CHEMICON). The downstream genes and signal cascades were interrogated using Illumina HumanRef-8 v3.0 Expression Bead-Chips. **Results** qRT-PCR confirmed that the expression of DREV1 was significantly lower in the short survival group (n = 8) compared to the long survival group (n = 8). TMA-IHC (n = 220) showed the DREV1 expression was significantly reduced in advanced stages of NSCLC (Stage III and IV) compared to the early stages (Stage I and II) (p=0.002). Patients with reduced expression of DREV1 had significantly lower overall median survival. Silencing of DREV1 significantly increased cell proliferation, reduced apoptosis through reduction in Caspase 3 and 7 activities and increased cell invasion. Microarray gene expression analysis revealed that silencing of DREV1 activated MAPK3, ITGB1, PIK3R1, PTK2B and PAK1 which may be involved in cell proliferation, migration and cell invasion. Using the Geneset Enrichment Analysis (GSEA), PIK3 and MAPKK signaling pathways were found to be enriched following silencing of DREV1. Positive regulation of migration, regulation of anti-apoptosis and focal adhesion were among the significant biological processes. **Conclusions** Low expression of DREV1 is associated with reduced survival of patients with NSCLCs. DREV1 inhibition promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells possibly through activations of PI3K and MAPKK pathways.

LAMPIRAN C

Manuskrip dihantar ke Cancer Treatment and Research communications journal

Molecular profiling to reveal the silencing effect of SON gene expression that attenuated Non-small cell lung cancer cells proliferation

Pang Jyh Chyang^{1*}, Roslan Harun² & Rahman A. Jamal¹

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), UKM Medical Centre, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.

²KPJ Ampang Puteri Specialist Hospital, 1, Jalan Memanda 9, Taman Dato Ahmad Razali, 68000 Ampang, Selangor.

*Correspondence: pjchyang@gmail.com

Abstract

Introduction: Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the top major cause deaths for cancer patient. Although patients respond initially to chemotherapy, almost all will develop recurrence after several months.

Purpose: The objective of this study was to study the biological role of gene SON in implication to non-small cell lung cancer pathogenesis and development.

Methods: The gene SON was genetically silenced with siSON. We used RNAi-microarray approach to compare the mRNA expression in the treated cancer cell lines and untreated cell lines.

Results: The RNAi-microarray approach identified gen SON involved in the molecular cell cycle and Notch pathway. The microarray result shown that 336 genes were affected with the decrease expression of gene SON. RT-PCR of gene SON and MDM2 verified the microarray data with decrease of gene expression 903.6FC (p=0.12) and 66.5FC (0.23) respectively. The synthetic lethal SON were further tested and found that chemosensitivity of lung cancer cell line were increased with the attenuated expression of gene SON.

Conclusions: The identified genes could be keys in elucidating how the pathogenesis and development of NSCLC occur.

LAMPIRAN D

Manuskrip dihantar ke Nuclear Medicine and Biology journal

Evaluation protein SON expression in clinical tissue and In vivo anticancer effect of synthetic lethal gene SON

Pang Jyh Chyang^{1*}, Roslan Harun² & Rahman A. Jamal¹

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), UKM Medical Centre, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.

²KPJ Ampang Puteri Specialist Hospital, 1, Jalan Memanda 9, Taman Dato Ahmad Razali, 68000 Ampang, Selangor.

*Correspondence: pjchyang@gmail.com

Abstract

Introduction: Usually, Lung cancer cases were detected in the advanced stage where treatment is no longer to have an impact on the disease. Hence, indirectly contribute to the high mortality rate of lung cancer cases. In previous study, gene *SON* was found effectively attenuated A549 cells proliferation and interfere the cell cycle pathway of the cell.

Purpose: The objective of this study was to evaluate the expression motif of gen *SON* in clinical tissue and the anticancer effect of synthetic lethal gen *SON*.

Methods: A tissue microarray blocks with cores of NSCLC tissues from 208 patients were sectioned and stained immunohistochemical against p-SON antibody. A549 cells line were subcutaneous xenograft transplanted into 12 nude mice. The nude mice transplanted with lung tumor were divided into four groups randomly before treated with synthetic lethal SON and control synthetic lethal.

Results: Expression levels of SON protein in NSCLC were significantly associated with tumour grade and pathologic stage. Treatment of lung adenocarcinoma xenografts with siSON resulted in 53% reduction in tumour growth ($1.0 \pm 0.6\text{cm}^3$, $p = 0.0016$) when compared with control.

Conclusions: Gen *SON* could be potential novel therapeutic target for lung cancer that inducing inhibition of tumour growth.