

Jurnal Biotek

p-ISSN: 2581-1827 (print), e-ISSN: 2354-9106 (online)
Website: <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/biotek/index>

Regulasi Promoter Thymidine Kinase oleh Sp1 dan NF- κ B: Potensi Misinterpretasi Hasil Uji Lusiferase

Ferbian Milas Siswanto

Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Indonesia

*Correspondence email: ferbian.siswanto@atmajaya.ac.id

(Submitted: 29-04-2025, Revised: 22-08-2025, Accepted: 14-10-2025)

ABSTRAK

Uji lusiferase banyak digunakan di laboratorium biologi molekuler untuk menentukan efek faktor transkripsi terhadap ekspresi gen target. Hasil uji lusiferase sangat bergantung pada ekspresi dari plasmid kontrol. Oleh karena itu, plasmid kontrol dalam uji dual-lusiferase dirancang agar ekspresinya stabil dan tidak dipengaruhi oleh perlakuan eksperimental. Namun, asumsi ini belum diuji secara sistematis dalam konteks aktivasi oleh Sp1 dan NF- κ B. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa plasmid komersial kontrol pRL-TK (GenBank AF025846; Promega) tidak dipengaruhi aktivitasnya oleh Sp1 dan NF- κ B. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ko-transfeksi Sp1 atau RelA NF- κ B (250 ng) dengan pRL-TK (25 ng) dapat meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 95 dan 50 kali lipat. Analisis sekuens menunjukkan promotor ini memiliki 14 *Sp1-binding site* dan 1 *RelA-binding site*. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan pRL-TK atau plasmid kontrol lain yang mengandung promotor TK dapat menyebabkan bias dalam interpretasi data atau kesalahan normalisasi hasil uji. Selain itu, ko-transfeksi Sp1 atau RelA NF- κ B (250 ng) dan pRL-Null (25 ng) yang tidak mengandung promotor TK juga meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 10 dan 5 kali lipat. Dengan meningkatkan jumlah Sp1 dan RelA NF- κ B (0,5 μ g) dan menurunkan pRL-Null (12,5 ng) yang di transfeksi, aktivasi pRL-null oleh kedua faktor transkripsi ini dapat diminimalisir. Dapat disimpulkan bahwa penggunaan plasmid yang mengandung promotor TK sebaiknya tidak digunakan sebagai kontrol ekspresi dalam studi yang melibatkan Sp1 atau NF- κ B, kecuali disertai pengujian awal terhadap kemungkinan aktivasi non-spesifik.

Kata Kunci: lusiferase, pRL-Null, pRL-TK, RelA NF- κ B, Sp1, TK promotor.

ABSTRACT

*The luciferase assay is widely used in molecular biology laboratories to determine the effects of transcription factors on target gene expression levels. The results of luciferase assays are highly dependent on the expression of the control plasmid. Therefore, control plasmids in dual-luciferase assays are designed to exhibit stable expression that is not affected by experimental treatments. However, this assumption has not been systematically tested in the context of activation by Sp1 and NF- κ B. The aim of this study was to evaluate the effects of Sp1 and NF- κ B on the activity of the commercial control plasmid pRL-TK (GenBank AF025846; Promega). The results showed that co-transfection of Sp1 or RelA NF- κ B (250 ng) with pRL-TK (25 ng) induced *Rluc* expression by 95-fold and 50-fold, respectively. Sequence analysis revealed that this promoter contains fourteen Sp1-binding sites and one RelA-binding site. These findings indicate that the use of pRL-TK or other control plasmids containing the TK promoter may lead to biased data interpretation or errors in normalization. In addition, co-transfection of Sp1 or RelA NF- κ B (250 ng) with pRL-Null (25 ng),*



which does not contain the TK promoter, also increased Rluc expression by 10-fold and 4-fold, respectively. By increasing the amounts of Sp1 and RelA NF- κ B to 0.5 μ g and decreasing the amount of transfected pRL-Null to 12.5 ng, activation of pRL-Null by these two transcription factors could be minimized. It can be concluded that plasmids containing the TK promoter should not be used as expression controls in studies involving Sp1 or NF- κ B, unless accompanied by preliminary testing to assess potential non-specific activation.

Keywords: luciferase, pRL-Null, pRL-TK, RelA NF- κ B, Sp1, TK promoter.

How to cite: Siswanto, F. (2025). Regulasi Promoter Thymidine Kinase oleh Sp1 dan NF- κ B: Potensi Misinterpretasi Hasil Uji Lusiferase. Jurnal Biotek, 13(2), 252–262. <https://doi.org/10.24252/jb.v13i2.56431>

PENDAHULUAN

Specificity protein 1 (Sp1) dan *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi utama yang berperan luas dalam regulasi ekspresi gen. Sp1 berikatan dengan elemen promotor kaya GC dan mengatur ribuan gen yang terlibat dalam proses fundamental seperti (Chen et al., 2019), diferensiasi (Gilmour et al., 2019), apoptosis (Pan et al., 2024), angiogenesis (Su et al., 2017), respons imun (Dupuis-Maurin et al., 2015), dan stres oksidatif (Siswanto et al., 2021). Aktivitasnya tidak hanya bergantung pada interaksi dengan DNA, tetapi juga dimodulasi oleh berbagai modifikasi pascatranslasi yang memengaruhi stabilitas dan fungsi transkripsinya (X. Sun et al., 2024). Sementara itu, keluarga NF- κ B mengatur respons imun, inflamasi, serta metabolisme sel (Guo et al., 2024) melalui dimerisasi subunit-subunitnya, dengan RELA/p50 sebagai bentuk paling umum (Siswanto et al., 2022, 2023; Tamura et al., 2024). Keduanya sering menjadi fokus studi biologi molekuler karena keterlibatannya dalam proses fisiologis maupun patologis.

Untuk mempelajari peran faktor transkripsi, uji reporter lusiferase banyak digunakan karena mampu menilai aktivitas promotor gen target secara kuantitatif (Branchini et al., 2018). Uji ini umumnya dilakukan dengan ko-transfeksi plasmid promotor-gen target bersama plasmid kontrol, yang berfungsi menormalisasi variasi efisiensi transfeksi antar sampel. Plasmid kontrol idealnya memiliki ekspresi stabil dan tidak dipengaruhi oleh perlakuan eksperimental (Tudini et al., 2019). Salah satu plasmid yang banyak digunakan adalah pRL-TK (Promega, GenBank AF025846), yang membawa promotor *herpes simplex virus thymidine kinase* (TK) untuk mengendalikan ekspresi *Renilla luciferase* (Rluc) (Jiwaji et al., 2010).

Namun, penggunaan promotor TK berpotensi menimbulkan masalah jika aktivitasnya juga diaktivasi oleh faktor transkripsi yang sedang dipelajari.

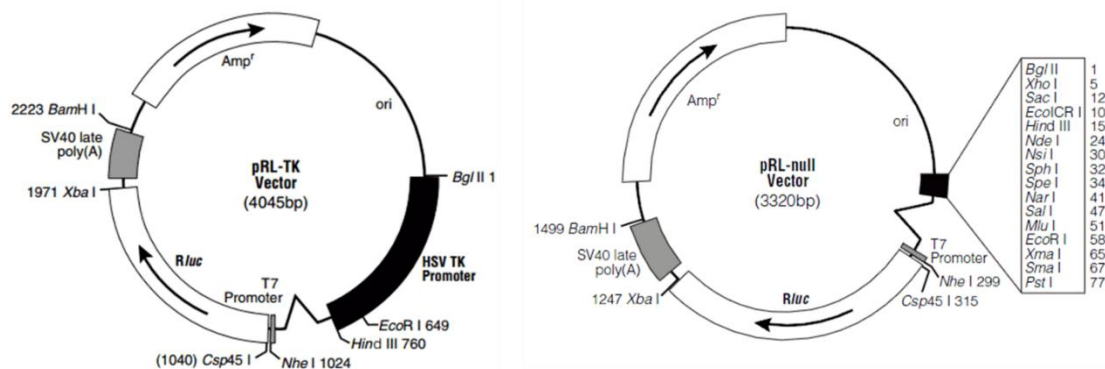
Transcriptional interference semacam ini dapat menyebabkan bias dalam interpretasi hasil atau kesalahan normalisasi data (Neefjes et al., 2021; Wu et al., 2015). Sejauh ini, belum banyak studi yang secara sistematis menguji apakah faktor transkripsi seperti Sp1 dan NF- κ B dapat memengaruhi ekspresi plasmid kontrol yang umum digunakan dalam uji dual-lusiferase. Hal ini penting untuk dilakukan sehingga studi mengenai peran Sp1 dan NF- κ B dalam aktivasi promotor pada gen tertentu menjadi valid dan bisa dipertanggungjawabkan hasilnya.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan apakah plasmid komersial kontrol pRL-TK dapat digunakan sebagai kontrol ekspresi yang reliabel untuk mempelajari fungsi transkripsi dari Sp1 dan NF- κ B dalam uji lusiferase.

METODE PENELITIAN

Plasmid

Plasmid yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Promega (Madison, WI, USA) secara komersial dengan kode GenBank AF025846 (pRL-TK) dan AF025844 (pRL-Null). Plasmid pRL-TK mengandung gen Rluc yang digerakkan oleh promotor timidin kinase virus herpes simpleks (HSVTK) yang aktif secara konstitutif, sedangkan plasmid pRL-Null tidak mengandung promotor. Peta plasmid yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta plasmid pRL-TK dan pRL-null.

(Available at: <https://worldwide.promega.com/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2231>)

Ket: pRL-TK= plasmid Renilla-Thymidine Kinase; pRL-null= plasmid Renilla-Null (*empty vector*)

Kloning

Untuk konstruksi plasmid, seluruh wilayah pengkode protein Sp1 manusia (NM_138473.2) diisolasi dengan PCR menggunakan primer 5'-CTGAATTCCCATGAGCGACCAAGATCACTCCAT-3' (Fw) dan 5'-

TAACTCGAGGTATGGCCCATATGTCTCTGGCC-3' (Rv), kemudian dipotong oleh enzim restriksi EcoRI dan XhoI dan diligasi ke dalam vektor pCMV-Myc (Clontech Laboratories, Inc., CA, USA). Untuk RelA NF- κ B manusia (NM_021975.4), cDNA gen pengkode protein diisolasi dengan PCR menggunakan primer 5'-AAACTCGAGCCATGGACGAACTGTTCCCCCTCATCT-3' (Fw) dan 5'-ATTATATTGCGGCCGCTTAGGAGCTGATCTGACTCAGCAGG-3' (Rv), dipotong menggunakan enzim restriksi XhoI dan NotI, dan kemudian diligasi ke dalam vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Kultur Sel

Pada penelitian ini digunakan sel lini karsinoma hepatoseluler (Hep3B). Sel sebanyak 8×10^4 sel/sumuran dikultur pada pelat 24-sumur yang berisi Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) yang mengandung 10% fetal bovine serum (FBS, Kibbutz, Israel), 100 unit/mL penisilin dan 100 μ g/mL streptomisin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) pada suhu 37°C dalam 5% CO₂.

Transfeksi Vektor ke dalam Sel

Sel Hep3B ditransfeksi dengan vektor Mock, pCMV-Sp1 (250 atau 500 ng) atau pcDNA3.1-RelA NF- κ B (250 atau 500 ng), dan pRL-TK (25 ng) atau pRL-null (25 atau 12,5 ng) sebagai kontrol internal dengan reagen transfeksi GenePORTER TM2 (Gene Therapy Systems). Empat puluh delapan jam pascatransfeksi, aktivitas lusiferase Renilla diuji dengan luminometer (Lumat LB9507; Berthold) menggunakan Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) sesuai dengan protokol pabrik.

Analisis Data

Seluruh data disajikan sebagai rata-rata $\pm$ simpangan baku. Proses analisis data dilakukan menggunakan aplikasi SPSS versi 22. Nilai *P* ditentukan oleh *one-way ANOVA* dan *Tukey's posthoc test*. Perbedaan dianggap signifikan jika $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) atau $p < 0,001$ (***).

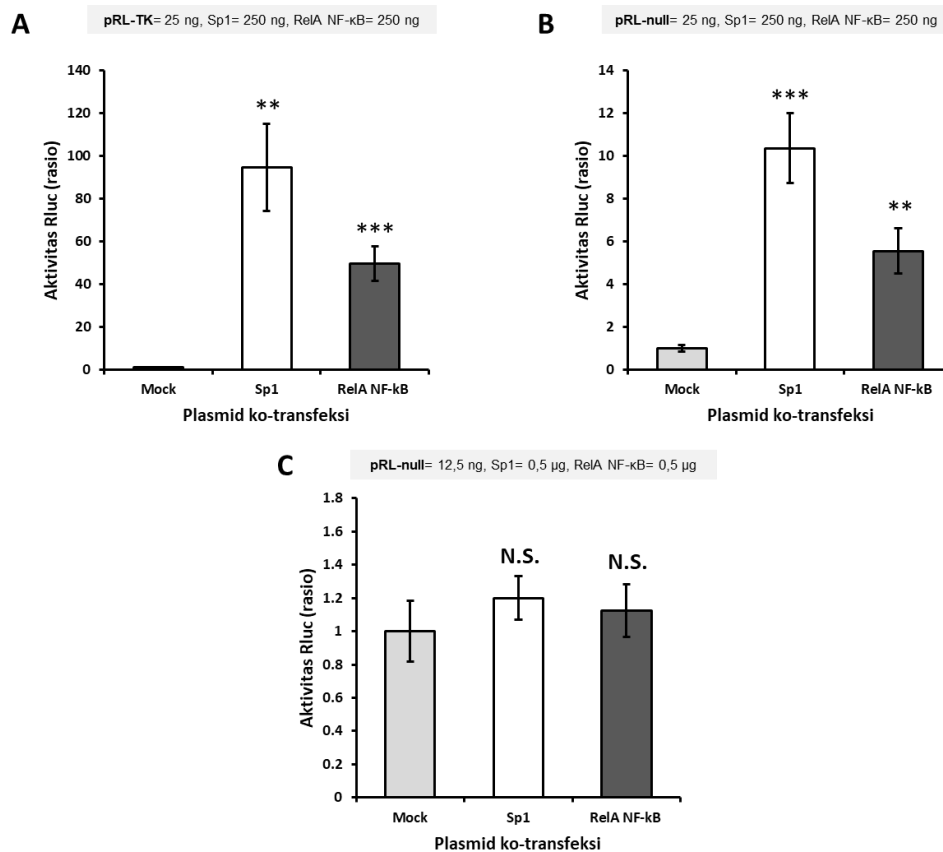
HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas lusiferase diukur menggunakan lisat sel Hep3B yang di transfeksi bersama dengan plasmid eksperimental pCMV-Sp1 dan pcDNA3.1-RelA NF- κ B dan plasmid kontrol pRL-TK untuk menguji reliabilitas pRL-TK sebagai plasmid kontrol. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas gen reporter dari pRL-TK secara signifikan

meningkat pada kelompok sel yang diberi ko-transfeksi Sp1 dan RelA NF- κ B. Faktor transkripsi Sp1 (250 ng) meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 95 kali lipat ($p < 0,01$) dan RelA NF- κ B (250 ng) secara signifikan meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 50 kali lipat ($p < 0,001$) (Gambar 2A). Hal ini menunjukkan bahwa pRL-TK dapat diaktivasi oleh Sp1 dan RelA NF- κ B, sehingga tidak baik untuk digunakan sebagai plasmid kontrol.

Untuk menguji apakah dengan menghilangkan promotor timidin kinase dapat menjadikannya sebagai kandidat plasmid kontrol yang baik, kami menguji efek Sp1 dan RelA NF- κ B dengan plasmid kontrol pRL-Null. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas gen reporter dari pRL-null juga secara signifikan meningkat pada kelompok sel yang diberi ko-transfeksi Sp1 dan RelA NF- κ B. Faktor transkripsi Sp1 (250 ng) meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 10 kali lipat ($p < 0,001$) dan RelA NF- κ B (250 ng) secara signifikan meningkatkan ekspresi *Rluc* hingga 5 kali lipat ($p < 0,01$) (Gambar 2B). Hal ini menunjukkan bahwa pRL-null masih dapat diaktivasi oleh Sp1 dan RelA NF- κ B, namun sekitar 90% respons aktivitas *Rluc* terhadap Sp1 dan RelA NF- κ B dapat dikurangi dengan menghilangkan promotor timidin kinase. Meskipun promotor TK tidak terdapat pada pRL-null, vektor ini masih mengandung elemen dasar dalam *backbone* plasmid yang mungkin dapat diaktivasi oleh Sp1 dan RelA NF- κ B. Oleh karena itu, sekitar 10% aktivitas residual aktivasi tetap muncul akibat aktivasi pada elemen minimal atau situs alternatif, sementara 90% respons hilang karena promotor TK adalah target utama dari Sp1 dan RelA.

Sebagai langkah optimasi prosedur uji lusiferase dalam mempelajari fungsi Sp1 dan RelA NF- κ B, dilakukan beberapa percobaan dengan variasi konsentrasi plasmid eksperimental dan plasmid kontrol pRL-null untuk meminimalisir efek *false negative result* yang mungkin dihasilkan. Pada sel Hep3B yang ditransfeksi bersama dengan plasmid eksperimental konsentrasi 2 kali lipat (0,5 μ g) dan setengah dari konsentrasi plasmid kontrol pRL-null (12,5 ng), hasil penelitian ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok Mock, Sp1 dan NF- κ B ($p > 0,05$) (Gambar 2C). Hasil ini mengindikasikan bahwa pRL-null dapat digunakan sebagai plasmid kontrol untuk mempelajari fungsi transkripsi dari Sp1 dan RelA NF- κ B dengan kalibrasi pada konsentrasi yang ditransfeksikan pada sel.



Gambar 2. Efek Sp1 dan RelA NF-κB terhadap ekspresi gen *Renilla luciferase* (Rluc) dalam pRL-TK dan pRL-null. (A) Hep3B ditransformasi dengan pRL-TK (25 ng), dan ko-transfeksi dengan mock (250 ng), Sp1 (250 ng), atau RelA (250 ng). (B) Hep3B ditransformasi dengan pRL-null (25 ng), dan ko-transfeksi dengan mock (250 ng), Sp1 (250 ng), atau RelA (250 ng). (C) Hep3B ditransformasi dengan pRL-null (12,5 ng), dan ko-transfeksi dengan mock (0,5 μg), Sp1 (0,5 μg), atau RelA (0,5 μg). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N.S. *not significant* ($p > 0,05$); analisis menggunakan *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan *Tukey's posthoc test*

Data ini menunjukkan potensi misinterpretasi yang sangat tinggi dalam penggunaan plasmid promotor kontrol untuk mengoreksi kemungkinan variasi dalam efisiensi transfeksi selama studi aktivasi promotor. Data ini secara tidak langsung menunjukkan bahwa aktivitas promotor TK sangat dipengaruhi oleh Sp1 dan RelA-NF-κB. Untuk mengetahui mekanisme yang terlibat, dilakukan analisis *binding site* potensial pada sekuens promotor TK. Sekuens promotor HSV-TK pada plasmid pRL-TK disajikan pada Gambar 3. Dari sekuens tersebut, dilakukan analisis prediksi *binding motif* dengan menggunakan JASPAR (<https://jaspar.elixir.no/>).

JASPAR menentukan potensi ikatan faktor transkripsi pada sekuens DNA menggunakan pendekatan berbasis *position frequency matrix* (PFM) yang dikonversi menjadi *position weight matrix* (PWM). Matriks ini merepresentasikan

frekuensi nukleotida A, C, G, dan T pada setiap posisi motif hasil data eksperimen, sehingga dapat dihitung skor kecocokan antara sekuens input dengan motif faktor transkripsi tertentu. Ambang batas skor yang digunakan untuk PMW adalah $\geq 0,8$. Selain itu, JASPAR juga mempertimbangkan nilai *information content* (IC) yang menggambarkan tingkat konservasi posisi tertentu dalam motif serta *p-value* (< 0.05) yang menilai signifikansi statistik kecocokan dibandingkan dengan distribusi acak. Dengan demikian, penilaian potensi ikatan TF tidak hanya berdasarkan kesamaan sekuens, tetapi juga melibatkan bobot kuantitatif, spesifisitas motif, dan probabilitas terjadinya kecocokan secara kebetulan (Rauluseviciute et al., 2024).

Hasil menunjukkan bahwa promotor ini memiliki 14 *Sp1-binding site* dan 1 *RelA-binding site* (Tabel 1). Mengingat ambang batas skor PMW yang digunakan oleh JASPAR adalah ≥ 0.8 , situs ikatan Sp1 (misalnya skor 13.90 pada situs CCCCCGCCCTC dan skor 12.69 pada situs GGGCGCGCG) menunjukkan afinitas prediksi yang sangat kuat, sehingga berpotensi menjadi elemen pengatur utama bagi aktivitas transkripsi gen target. Selain itu, satu prediksi ikatan RelA dengan skor 8.51 pada lokasi 562–572 juga relatif tinggi dan menunjukkan kemungkinan adanya regulasi bersama antara NF- κ B dan Sp1 di wilayah tersebut. Menariknya, lokasi prediksi NF- κ B berdekatan dengan beberapa motif Sp1, sehingga dapat mengindikasikan adanya potensi interaksi atau sinergi regulasi antara kedua faktor transkripsi ini.

1	aaatgagtct	tccgacctcg	cggggggccgc	ttaagcgggtg	gttaggggttt	gtctgacgcg
61	gggggagggg	gaaggaacga	aacactctca	tccggaggcg	gctcgggggt	tggtcttggt
121	ggccacgggc	acgcagaaga	gcgccgcgat	cctcttaagc	acccccccgc	cctccgtgga
181	ggcgggggtt	tggtcggcgg	gtggttaactg	gcggggccgct	gactcggggcg	ggtcgcgcgc
241	cccagagtgt	gaccttttgc	gtctgtctgc	agaccccccg	gcggcgccgc	cgcgggcgcg
301	acgggctcgc	tgggtcctag	gtcccatggg	gaccgtatac	gtggacaggc	tctggagcat
361	ccgcacgact	gcggtgatat	taccggagac	cttctgcggg	acgagccggg	tcacgcgggt
421	gacgcggagc	gtccgttggg	cgacaaacac	caggacgggg	cacaggtaca	ctatcttgtc
481	acccggaggc	gcgagggact	gcaggagctt	cagggagtgg	cgcagctgct	tcacccccgt
541	ggcccggttc	tcgcgtttgc	tggcggtgtc	cccggagaaa	atatatttgc	atgtctttag
601	ttctatgatg	acacaaaccc	cgcccagcgt	cttgctattg	gcgaattcga	acacgcagat
661	gcagtcgggg	cggcgcggtc	ccagggtccac	ttcgcatatt	aaggtagcgc	gtgtggcctc
721	gaacaccgag	cgaccctgca	gcgaccgcgt	taa		

Gambar 3. Sekuens promotor HSV-TK pada plasmid pRL-TK (GenBank AF025846)

Dalam konteks penggunaan uji reporter lusiferase, temuan pada penelitian ini memiliki implikasi penting. Plasmid pRL-TK sering digunakan sebagai kontrol internal dalam uji reporter lusiferase untuk normalisasi variasi yang disebabkan oleh efisiensi transfeksi dan penanganan sampel. Asumsi yang mendasari penggunaan

ini adalah bahwa ekspresi lusiferase Renilla dari pRL-TK bersifat konstitutif dan tidak dipengaruhi oleh faktor eksperimen yang diuji (Branchini et al., 2018).

Tabel 1. Analisis *Binding Sites* Sp1 dan RelA NF - κ B pada Promoter HSV - TK

No	Faktor Transkripsi	Lokasi	Rantai	Motif	Skor
1	Sp1	457-465	Sense	GGGGCACAG	4.72
2	Sp1	517-525	Sense	GTGGCGCAG	4.72
3	Sp1	68-76	Sense	GGGGAAGGA	5.62
4	Sp1	292-300	Sense	CCGGCGGCG	5.88
5	Sp1	61-70	Sense	GGGGGAGGGG	6.72
6	Sp1	278-286	Sense	CGGGCGGCG	5.95
7	Sp1	560-569	Sense	CTGGCGGTGT	7.61
8	Sp1	179-188	Sense	GAGGCGGGGG	7.80
9	Sp1	105-114	Sense	GGGGTTTGGT	8.23
10	Sp1	185-194	Sense	GGGGTTTGGT	8.23
11	Sp1	670-679	Sense	CCGGCGCGGT	8.64
12	Sp1	617-627	Sense	ACCCCGCCCAG	9.82
13	Sp1	667-675	Sense	GGGGCGGCG	12.69
14	Sp1	164-174	Sense	CCCCCGCCCTC	13.90
15	RelA NF- κ B	562-572	Sense	GGCGGTGTCCC	8.51

Namun, penelitian kami menunjukkan bahwa asumsi ini tidak selalu valid. Stimulasi oleh Sp1 dan NF- κ B dapat meningkatkan aktivitas lusiferase Renilla dari pRL-TK, yang berpotensi mengarah pada kesalahan interpretasi hasil uji reporter. Misalnya, jika faktor eksperimen yang diuji juga memengaruhi aktivitas Sp1 atau NF- κ B, maka perubahan aktivitas lusiferase yang teramati mungkin menjadi negatif, karena selain mempengaruhi reporter *firefly*, faktor tersebut juga meningkatkan aktivitas promotor TK pada pRL-TK sebagai *internal control*. Penggunaan pRL-Null sebagai kontrol menjadi sangat penting dalam situasi ini. Dengan tidak adanya promotor TK, plasmid ini memberikan *baseline* aktivitas lusiferase yang tidak dipengaruhi oleh Sp1 dan NF- κ B. Dengan demikian, perubahan aktivitas lusiferase yang teramati pada plasmid reporter eksperimen dapat dinormalisasi dengan lebih akurat, sehingga mengurangi risiko kesalahan interpretasi.

Mekanisme peningkatan aktivitas pRL-TK oleh Sp1 dan NF- κ B kemungkinan melibatkan interaksi langsung antara kedua faktor transkripsi ini dengan elemen cis-acting pada promotor TK. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa promotor TK mengandung beberapa elemen penting, termasuk kotak TATA, GC-box (situs pengikatan Sp1), dan situs pengikatan CTF (Shifera & Hardin, 2010). Interaksi Sp1 dan NF- κ B dengan elemen-elemen ini dapat meningkatkan transkripsi gen lusiferase Renilla.

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa aktivitas lusiferase Renilla dari pRL-TK dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti *proliferator activator receptor alpha* (PPAR α), *apolipoprotein A1 regulatory protein-1* (ARP-1), *hepatocyte nuclear factor-4* (HNF-4), *glucocorticoid receptor* (GR), interferon, prostaglandin, dan Nur77 (Shifera & Hardin, 2010), sehingga penggunaan pRL-TK sebagai plasmid kontrol perlu diperhatikan dan dikalibrasi sebaik mungkin. Selain itu, validasi hasil uji reporter lusiferase perlu dilakukan dengan metode lain, seperti analisis quantitative PCR (qPCR) atau Western blot, untuk memastikan bahwa perubahan aktivitas lusiferase yang teramati mencerminkan perubahan ekspresi gen target yang sebenarnya (Mendez & Keestra-Gounder, 2020; C. Sun et al., 2022).

Keterbatasan penelitian ini adalah pengujian hanya dilakukan pada sistem ko-transfeksi transien dengan overekspresi Sp1 dan RelA, sehingga hasilnya mungkin berbeda pada jenis sel lain atau sistem stabil yang lebih menyerupai kondisi fisiologis. Identifikasi situs pengikatan Sp1 dan RelA masih bersifat prediktif berbasis sekuens tanpa validasi langsung melalui mutagenesis atau ChIP, sehingga mekanisme aktivasi belum dapat dipastikan. Sehingga, generalisasi temuan bahwa promotor TK tidak layak digunakan sebagai plasmid kontrol dalam studi yang melibatkan Sp1 atau NF- κ B perlu dikonfirmasi lebih lanjut melalui uji lintas sel, pendekatan mekanistik, dan perbandingan dengan alternatif plasmid kontrol lain.

KESIMPULAN

Promotor TK pada plasmid pRL-TK bersifat responsif terhadap Sp1 dan NF- κ B, sehingga penggunaannya sebagai kontrol internal dalam uji reporter berpotensi menghasilkan bias interpretasi, khususnya pada sistem yang melibatkan kedua faktor transkripsi tersebut. Selain itu, penggunaan plasmid tanpa promotor seperti pRL-null pun perlu dilakukan kalibrasi konsentrasi masing-masing plasmid untuk meminimalisir kesalahan interpretasi hasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Branchini, B. R., Southworth, T. L., Fontaine, D. M., Kohrt, D., Florentine, C. M., & Grossel, M. J. (2018). A Firefly Luciferase Dual Color Bioluminescence Reporter Assay Using Two Substrates To Simultaneously Monitor Two Gene Expression Events. *Scientific Reports*, 8(1), 5990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24278-2>
- Chen, Y.-T., Tsai, H.-P., Wu, C.-C., Chen, C.-Y., Chai, C.-Y., & Kwan, A.-L. (2019). High-level Sp1 is Associated with Proliferation, Invasion, and Poor Prognosis in Astrocytoma. *Pathology & Oncology Research*, 25(3), 1003–1013. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0422-8>
- Dupuis-Maurin, V., Brinza, L., Baguet, J., Plantamura, E., Schicklin, S., Chambion, S., Macari, C., Tomkowiak, M., Deniaud, E., Leverrier, Y., Marvel, J., & Michallet, M.-C. (2015). Overexpression of the Transcription Factor Sp1 Activates the OAS-RNase L-RIG-I Pathway. *PLOS ONE*, 10(3), e0118551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118551>
- Gilmour, J., O'Connor, L., Middleton, C. P., Keane, P., Gillemans, N., Cazier, J.-B., Philipsen, S., & Bonifer, C. (2019). Robust hematopoietic specification requires the ubiquitous Sp1 and Sp3 transcription factors. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0282-9>
- Guo, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T., & Zhang, J. (2024). NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>
- Jiwaji, M., Daly, R., Pansare, K., McLean, P., Yang, J., Kolch, W., & Pitt, A. R. (2010). The Renilla luciferase gene as a reference gene for normalization of gene expression in transiently transfected cells. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-103>
- Mendez, J. M., & Keestra-Gounder, A. M. (2020). NF- κ B-dependent Luciferase Activation and Quantification of Gene Expression in Salmonella Infected Tissue Culture Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 155. <https://doi.org/10.3791/60567>
- Neefjes, M., Housmans, B. A. C., van den Akker, G. G. H., van Rhijn, L. W., Welting, T. J. M., & van der Kraan, P. M. (2021). Reporter gene comparison demonstrates interference of complex body fluids with secreted luciferase activity. *Scientific Reports*, 11(1), 1359. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80451-6>
- Pan, J., Li, Y., Gao, W., Jiang, Q., Geng, L., Ding, J., Li, S., & Li, J. (2024). Transcription factor Sp1 transcriptionally enhances GSDME expression for pyroptosis. *Cell Death & Disease*, 15(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06455-6>
- Rauluseviciute, I., Riudavets-Puig, R., Blanc-Mathieu, R., Castro-Mondragon, J. A., Ferenc, K., Kumar, V., Lemma, R. B., Lucas, J., Chèneby, J., Baranasic, D., Khan, A., Fornes, O., Gundersen, S., Johansen, M., Hovig, E., Lenhard, B., Sandelin, A., Wasserman, W. W., Parcy, F., & Mathelier, A. (2024). JASPAR 2024: 20th anniversary of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D174–D182.

- <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1059>
- Shifera, A. S., & Hardin, J. A. (2010). Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Analytical Biochemistry*, 396(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.043>
- Siswanto, F. M., Oguro, A., & Imaoka, S. (2021). Sp1 is a substrate of Keap1 and regulates the activity of CRL4A(WDR23) ubiquitin ligase toward Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100704. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100704>
- Siswanto, F. M., Okukawa, K., Tamura, A., Oguro, A., & Imaoka, S. (2023). Hydrogen peroxide activates APE1/Ref-1 via NF- κ B and Parkin: a role in liver cancer resistance to oxidative stress. *Free Radical Research*, 57(3), 223–238. <https://doi.org/10.1080/10715762.2023.2229509>
- Siswanto, F. M., Tamura, A., Sakuma, R., & Imaoka, S. (2022). Yeast β -glucan Increases Etoposide Sensitivity in Lung Cancer Cell Line A549 by Suppressing Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 via the Noncanonical Nuclear Factor Kappa B Pathway. *Molecular Pharmacology*, 101(4), 257–273. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000475>
- Su, F., Geng, J., Li, X., Qiao, C., Luo, L., Feng, J., Dong, X., & Lv, M. (2017). SP1 promotes tumor angiogenesis and invasion by activating VEGF expression in an acquired trastuzumab-resistant ovarian cancer model. *Oncology Reports*, 38(5), 2677–2684. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5998>
- Sun, C., Li, C., Liu, W., & Schiöth, H. B. (2022). Generation of Endogenous Promoter-Driven Luciferase Reporter System Using CRISPR/Cas9 for Investigating Transcriptional Regulation of the Core Clock Gene BMAL1. *Biomedicines*, 10(12), 3108. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123108>
- Sun, X., Xiao, C., Wang, X., Wu, S., Yang, Z., Sui, B., & Song, Y. (2024). Role of post-translational modifications of Sp1 in cancer: state of the art. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1412461>
- Tamura, A., Milas Siswanto, F., Yoshimura, T., Oguro, A., & Imaoka, S. (2024). Hydrogen Peroxide Induces Ethanol-inducible CYP2E1 via the NF- κ B-classical Pathway: CYP2E1 mRNA Levels are not High in Alcoholic Hepatitis. *Current Drug Metabolism*, 25(5), 307–316. <https://doi.org/10.2174/0113892002305174240805064406>
- Tudini, E., Burke, L. J., Whiley, P. J., Sevcik, J., Spurdle, A. B., & Brown, M. A. (2019). Caution: Plasmid DNA topology affects luciferase assay reproducibility and outcomes. *BioTechniques*, 67(3), 94–96. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0060>
- Wu, G.-Q., Wang, X., Zhou, H.-Y., Chai, K.-Q., Xue, Q., Zheng, A.-H., Zhu, X.-M., Xiao, J.-Y., Ying, X.-H., Wang, F.-W., Rui, T., Xu, L.-Y., Zhang, Y.-K., Liao, Y.-J., Xie, D., Lu, L.-Q., & Huang, D.-S. (2015). Evidence for transcriptional interference in a dual-luciferase reporter system. *Scientific Reports*, 5(1), 17675. <https://doi.org/10.1038/srep17675>