



**MODUL TERAPI GEN
(IBP 641)**

**MODUL SESI KE-4
RNA Interference (RNAi)**

DISUSUN OLEH

Dr.Henny Saraswati, S.Si, M.Biomed

Universitas
Esa Unggul

UNIVERSITAS ESA UNGGUL

2021

RNA Interference (RNAi)

A. Kemampuan Akhir Yang Diharapkan

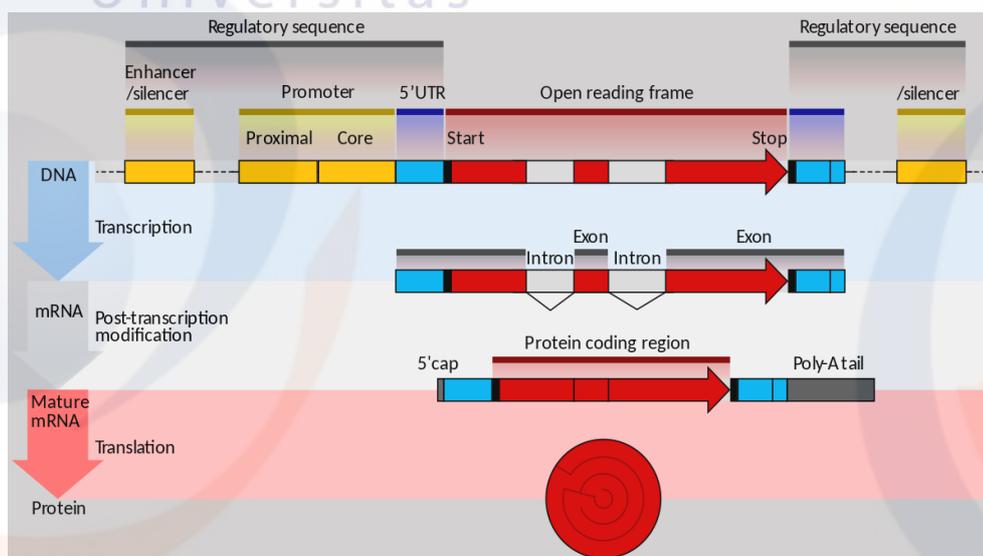
Setelah mempelajari modul ini, diharapkan mahasiswa mampu :

1. Menjelaskan pengertian RNA Interference (RNAi).
2. Menjelaskan mekanisme RNA Interference (RNAi).
3. Menjelaskan aplikasi RNAi.
4. Mengkaji potensi RNAi dalam terapi gen.

B. Uraian dan Contoh

1. Pengertian dan macam-macam RNAi

Makhluk hidup memiliki protein sebagai makromolekul dalam tubuhnya. Protein sangat penting dalam kehidupan organisme, sebagai sumber energi, pembentuk struktur sel, merupakan bahan pembentuk reseptor, sitokin dan lain-lain, serta fungsi-fungsi lain. Sehingga organisme selalu membutuhkan protein baik dari nutrisi yang dikonsumsi atau disintesis di dalam sel. Tentu semuanya pernah mengenal istilah dogma sentral atau *central dogma* (Gambar 1).

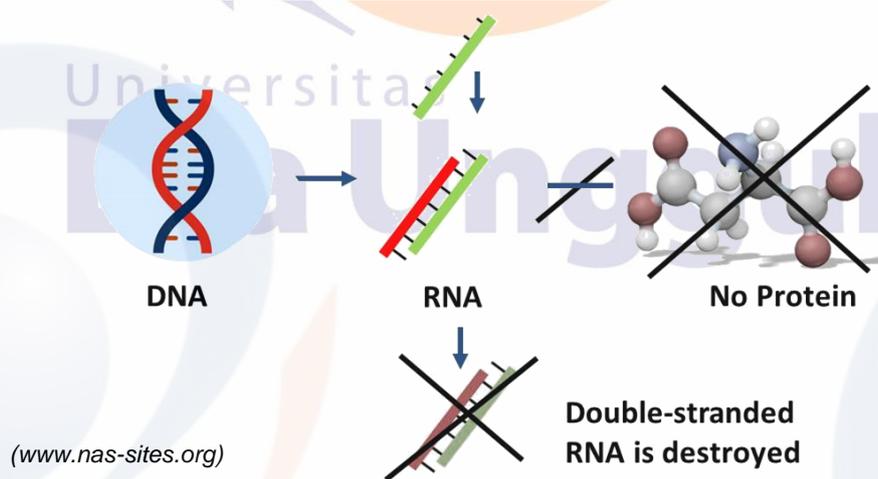


Gambar 1. Proses sintesis protein, dimulai dari proses transkripsi hingga translasi.

Teori ini membahas bagaimana protein dapat disintesis atau diproduksi di dalam sel. Dimulai dari transkripsi membentuk mRNA kemudian proses translasi membentuk protein. Namun, terdapat pertanyaan yang muncul, apakah proses sintesis protein selalu berjalan sempurna?

Ternyata jawabannya adalah tidak. Artinya tidak semua gen selalu akan diterjemahkan menjadi protein. Karena sel dalam organisme tertentu memiliki mekanisme *genetic switches*. Apa itu? Sesuai dengan namanya, mekanisme ini akan mengatur apakah gen akan diekspresikan menjadi protein atau tidak. Jadi seperti tombol saklar (*switches*).

Bagaimana mekanisme *genetic switches* itu? Ternyata pada organisme tertentu setelah proses transkripsi membentuk mRNA, terdapat juga RNA untai ganda yang berukuran pendek (sekitar 20-25 pb) yang terdapat di dalam sel. Molekul ini kemudian dapat menghambat ekspresi gen tertentu sehingga tidak terbentuk protein. Molekul ini disebut dengan *small interfering RNA (siRNA)* yang bersifat spesifik artinya hanya pada gen tertentu (Gambar 2). Mekanisme penghambatan pembentukan ini dinamakan *RNA interference (RNAi)* atau *Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS)*. Proses RNAi juga bisa dilakukan oleh *microRNA (miRNA)* yang juga berukuran pendek.



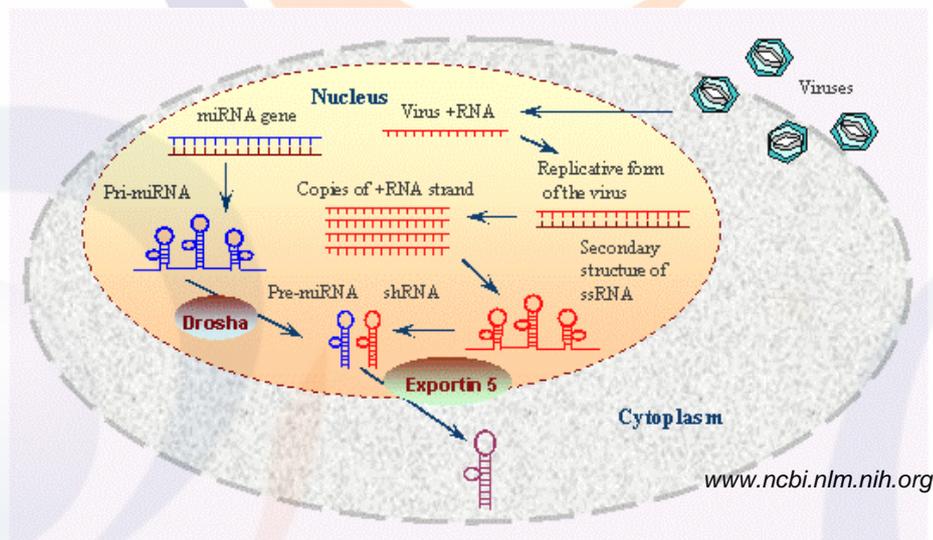
Gambar 2. Proses RNA interference (RNAi) yang disebabkan oleh siRNA atau miRNA.

Fungsi dari mekanisme RNA interference pada beberapa tumbuhan dan invertebrata adalah sebagai perlindungan terhadap infeksi. Namun, pada organisme lain dikenal pula sebagai mekanisme untuk pengaturan ekspresi gen. Hal inilah yang dikenal dengan *genetic switches* tadi.

Lalu bagaimana siRNA dan miRNA ini dibentuk di dalam sel? **Small interfering RNA (siRNA)** berasal dari virus atau sengaja dimasukkan ke dalam sel oleh peneliti dalam proses riset. Sedangkan **microRNA (miRNA)** dihasilkan dari transkripsi gen miRNA pada genom. Molekul-molekul ini mengalami proses berjenjang di dalam nukleus,

Hasil transkripsi gen miRNA akan menghasilkan **pri-miRNA** yang beruntai tunggal. Tetapi karena terdapat beberapa sekuen yang berkomplemen, maka RNA untai tunggal ini akan membentuk seperti bentukan jepit rambut (*hairpin*). Perlu diperhatikan bahwa pada bentukan hairpin ini juga terdapat loop pada sekuen-sekuen yang tidak berkomplemen.

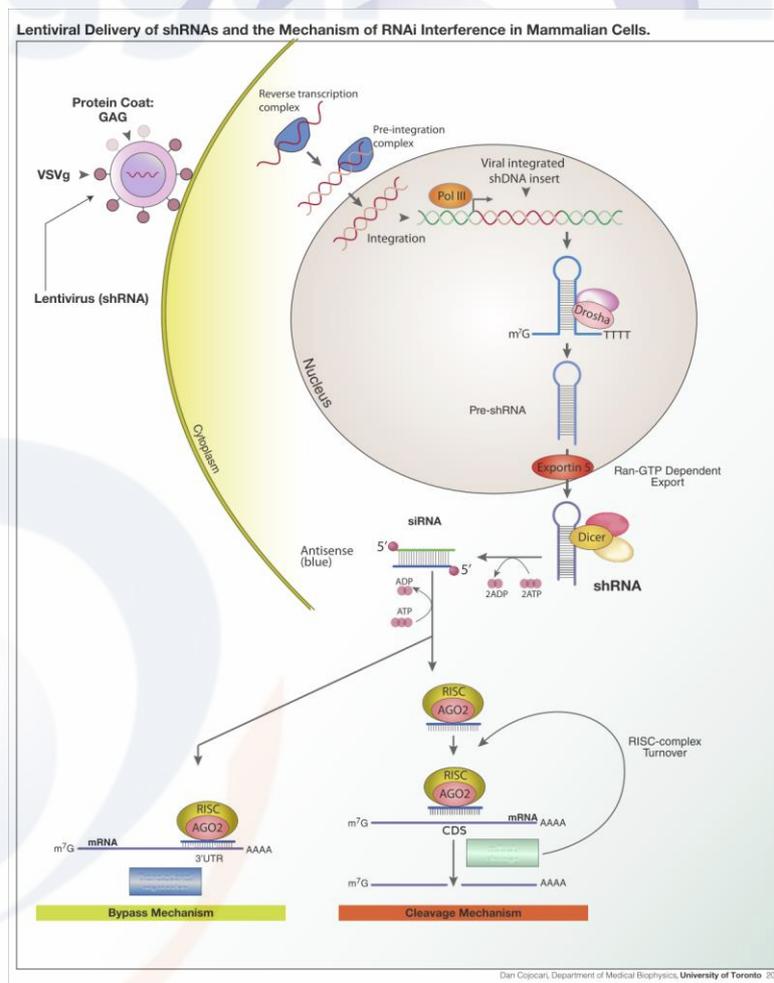
Molekul pri-miRNA ini memiliki hasil modifikasi paska transkripsi seperti *capping* pada ujung 5' dan poliadenilasi pada ujung 3'. Enzim **Drosha** (**endonuklease**) kemudian memotong hasil modifikasi ini sehingga terbentuklah pre-miRNA (Gambar 3).



Gambar 3. Proses pembentukan dsRNA yang nanti akan diolah lebih lanjut untuk menghasilkan siRNA.

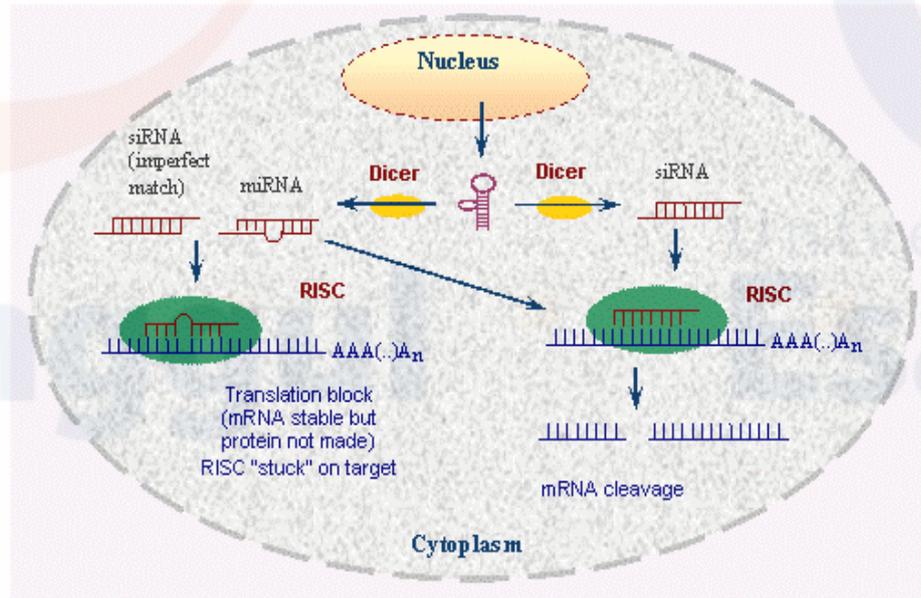
Molekul pre-miRNA ini kemudian dikeluarkan dari inti sel menuju ke sitoplasma dengan bantuan protein yang disebut dengan **Exportin 5**. Perlu diingat, bahwa bentuk pre-miRNA ini adalah untai tunggal yang kemudian membentuk *hairpin loop*, sehingga bentuk ini kita sebut sebagai untai ganda RNA (dsRNA)

Pembentukan *small interfering RNA* (siRNA) juga mirip dengan pembentukan pre-miRNA. Untai (+) dari RNA virus yang masuk ke dalam sel akan mengalami replikasi sehingga jumlah RNA menjadi banyak. Kemudian untai tunggal dari RNA ini akan membentuk *hairpin loop*. Sama seperti pri-miRNA, molekul ini akan mengalami pemotongan pada ujung 5' dan 3' oleh enzim Drosha sehingga sehingga akan menghasilkan *pre-short hairpin RNA* (pre-shRNA),. Molekul ini kemudian akan dikeluarkan dari inti sel menuju ke sitplasma menggunakan bantuan dari protein **Exportin 5** menjadi shRNA (Gambar 3 dan 4).



Gambar 4. Proses pembentukan siRNA pada sel (sumber: Dan Cojocari pada Wikipedia).

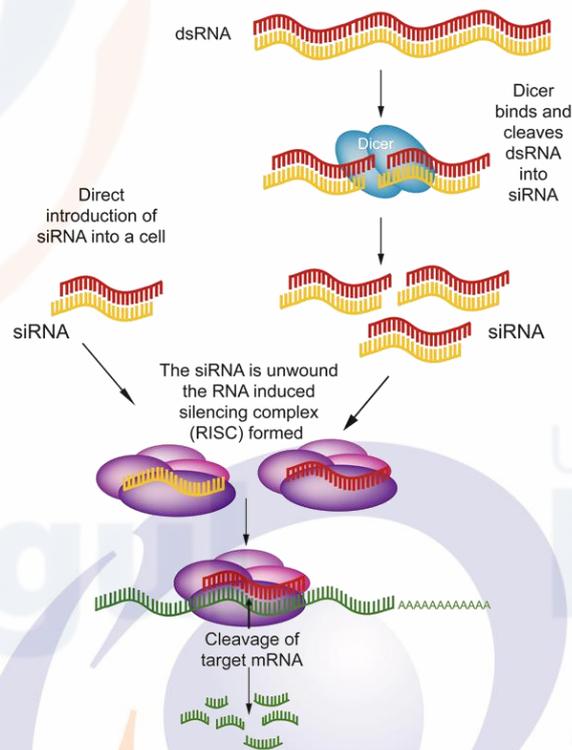
Setelah pre-miRNA dan sh-RNA keluar sitoplasma, maka masing-masing molekul ini akan berikatan dengan enzim **Dicer** yang berupa **endonuklease**. Enzim ini akan memotong pre-miRNA menjadi miRNA dan memotong sh-RNA menjadi si-RNA (Gambar 5).



Gambar 5. Proses *RNA Interference* dengan mi-RNA dan si-RNA (sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov).

Molekul-molekul ini kemudian bergabung bersama protein lain membentuk kompleks yang disebut **RNA-induced silencing complex (RISC)**. salah satu protein/enzim dalam RISC yaitu **argonaute** akan membuka untai ganda dari miRNA atau siRNA sehingga menjadi untai tunggal (Gambar 6). Setelah itu miRNA atau siRNA akan menuntun protein RISC sampai mRNA target. setelah itu enzim **argonaute** akan memotong-motong mRNA target (Gambar 6).

Terdapat 2 kemungkinan yang terjadi ketika miRNA berikatan dengan mRNA target (Gambar 5). **Pertama** adalah adanya beberapa sekuen miRNA yang tidak komplemen dengan mRNA target (*mismatch*). Pada proses ini protein RISC akan tetap berada di mRNA target. Hal akan menghambat ribosom melakukan proses translasi, sehingga tidak terbentuk protein. Kedua, semua sekuen dari miRNA berkomplemen dengan mRNA target, sehingga tidak terjadi proses translasi.



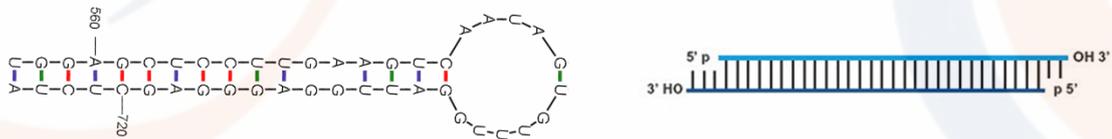
Gambar 6. Proses RNAi yang terjadi di dalam sel.

Berbeda dengan miRNA, pada siRNA akan secara spesifik melekat pada mRNA target. Artinya, semua sekuen siRNA akan berkomplemen dengan mRNA target.

Bagaimana siRNA ini ditemukan oleh para peneliti? Penelitian mengenai siRNA dimulai cukup lama dan akhirnya salah satu publikasi oleh Andrew Fire dan Craig C.Mello di Nature mengungkapkan bahwa ketika cacing nematoda (*Caenorhabditis elegans*) diberikan dsRNA yang menghambat pergerakan otot, terlihat bahwa terjadi kelumpuhan pada organisme tersebut (Fire et al, 1989). Hal ini kemudian dihubungkan dengan penelitian mengenai RNAi sebelumnya. Dari penelitian ini diketahui bahwa dsRNA menjadi sumber molekul yang efektif untuk proses RNA interference. Oleh karena penemuan ini merupakan penemuan yang sangat penting, maka mereka dianugerahi Nobel untuk Fisiologi dan Kedokteran tahun 2006.

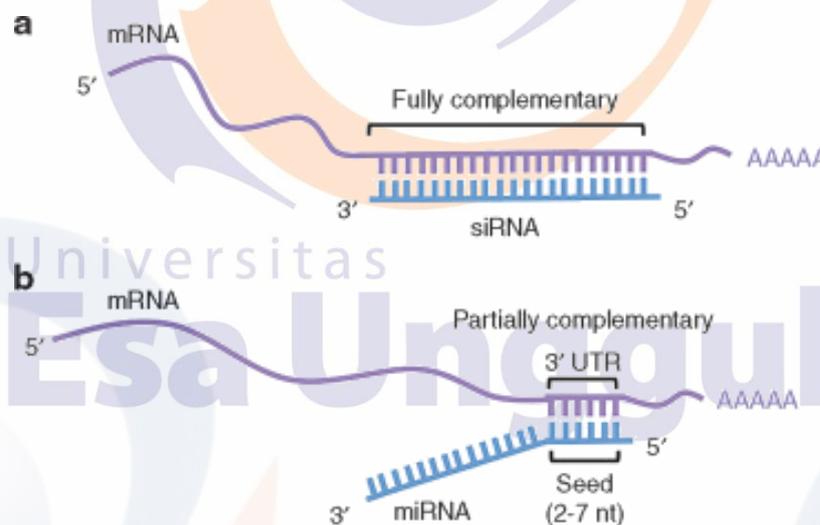
Jika molekul miRNA dan siRNA sama-sama bisa melakukan *RNA interference*, maka apa perbedaan dari keduanya? Perbedaan lainnya adalah

mengenai pembentukan untai gandanya. Pada siRNA untai gandanya berasal dari virus atau dsRNA yang secara sengaja dimasukkan ke dalam sel oleh peneliti. Sedangkan pada miRNA, untai gandanya berasal dari proses pelipatan mRNA, sehingga juga akan terbentuk struktur *hairpin* (Gambar 7).



Gambar 7. Perbandingan struktur miRNA (kiri) dengan siRNA (kanan).

Perbedaan lain adalah mengenai mRNA target. Molekul miRNA bisa menempel pada di beberapa tempat pada mRNA target. Sekuen miRNA yang berpasangan dengan mRNA target bisa hanya sebagian sehingga disebut *partially complementary*. Sedangkan pada siRNA, keseluruhan sekuennya akan berpasangan dengan mRNA target sehingga disebut dengan *fully complementary* (Gambar 8).



Gambar 7. Proses penempelan siRNA dan miRNA pada mRNA target.

Keseluruhan sekuen siRNA akan berikatan dengan mRNA target sehingga disebut *fully complementary* (a), sedangkan pada miRNA beberapa sekuen yang dapat berikatan dengan mRNA target sehingga disebut *partially complementary* (b).

2. Aplikasi RNAi

Mekanisme RNAi sangat bermanfaat baik di bidang kesehatan maupun pertanian. Dalam penelitian biomedis, mekanisme ini banyak digunakan untuk melihat peran gen tertentu pada suatu organisme. Hal ini dapat dilakukan dengan menghentikan ekspresi gen target menggunakan mekanisme RNAi dan kemudian melihat konsekuensi dari penghentian ekspresi gen ini. Setelah diketahui peran gen tertentu, hal ini dapat berguna untuk pengembangan terapi gen untuk penyakit tertentu.

Sampai saat modul ini dibuat, baru terdapat satu terapi gen berbasis RNAi yang diizinkan oleh badan pengawas obat Amerika Serikat (FDA) untuk diterapkan pada pasien. Terapi gen tersebut adalah Patisiran yang digunakan untuk mengobati penyakit langka yang disebut *Hereditary Transthyretin Amyloidosis*. Penyakit ini dapat mengakibatkan gangguan pada saraf dan dapat mengakibatkan kematian (Adams et al, 2018). Patisiran menargetkan pada bagian 3'UTR (*untranslated region*) dari mRNA Transthyretin. Hal ini akan mengakibatkan ekspresi gen Transthyretin terhambat. Karena penyakit *Hereditary Transthyretin Amyloidosis* disebabkan karena mutasi gen Transthyretin, maka terapi dengan RNAi dapat menyembuhkan penyakit ini.

Terapi penyakit kanker seringkali juga menimbulkan permasalahan di antaranya toksisitas obat terhadap sel-sel sehat. Kanker sendiri diketahui juga dapat diakibatkan oleh ekspresi berlebih dari gen tertentu. Untuk menghasilkan obat kanker yang spesifik terhadap sel kanker saja bisa dilakukan riset mengenai bahan obat yang bekerja pada gen yang over ekspresi. Oleh karena itu diperlukan pengetahuan bagaimana jika dilakukan penghambatan ekspresi gen ini.

Beberapa hal yang menjadi tantangan untuk menghasilkan terapi gen bagi penyakit adalah : (a) mekanisme *gene delivery* yang mampu mengantarkan siRNA menuju ke sel yang tepat, (b) mekanisme untuk memastikan bahwa siRNA dapat menuju gen yang tepat, (c) efek samping terapi gen dengan siRNA yang mungkin timbul.

Mekanisme RNAi juga dapat digunakan untuk terapi terhadap infeksi virus. Seperti telah kita ketahui bahwa siklus hidup virus sangat tergantung dari perangkat sintesis protein pada sel hidup. Antivirus yang ditemukan bekerja pada

penghambatan beberapa tahapan pada siklus virus. Beberapa gen virus yang berperan dalam perkembangbiakan virus juga dapat dihambat. Sehingga virus tidak dapat memperbanyak diri dan akhirnya proses infeksi dapat dihambat, mempercepat kesembuhan. Penghambatan gen virus bisa dilakukan dengan mekanisme RNAi. Terapi dengan pendekatan ini mulai banyak diteliti untuk infeksi HIV dan Hepatitis C.

Pengobatan suatu penyakit terkadang menimbulkan resistensi. Seperti contohnya resistensi terhadap radioterapi dan kemoterapi pada kanker. Hal ini tentu mempersulit penyembuhan. Perlu diketahui peran gen dalam proses resistensi ini. Hal ini bisa dilakukan dengan mekanisme RNAi.

Selain untuk bidang biomedis dan kesehatan, mekanisme RNAi juga dapat digunakan dalam bidang pertanian. Hampir sama dengan bidang kesehatan, pada bidang pertanian mekanisme RNAi dapat digunakan untuk mengetahui peran gen tertentu untuk kerentanan atau resistensi terhadap patogen. Mekanisme RNAi dapat digunakan untuk menghasilkan varietas tanaman yang tahan terhadap penyakit tertentu.

Mekanisme RNAi juga dapat digunakan untuk menghasilkan varietas tanaman steril yang dibutuhkan dalam industri benih. Metode ini sudah dilakukan untuk tanaman tembakau. Tidak kalah pentingnya adalah peran RNAi untuk studi mengenai fungsi gen tertentu dalam sel tanaman. Metode RNAi ini lebih efisien dan spesifik dalam studi ini.

C. Latihan

- a. Apa yang dimaksud dengan RNAi?
- b. Metode RNAi bisa dilakukan menggunakan....dan....
- c. Spesies apakah yang digunakan oleh Andrew Fire dan Craig C. Mello dalam penelitian mengenai RNAi?

D. Kunci Jawaban

- a. Penghambatan ekspresi gen tertentu menggunakan molekul RNA berukuran kecil (20-25 pb).

- b. Molekul siRNA dan miRNA.
- c. *Caenorhabditis elegans*.

E. Daftar Pustaka

1. <https://medlineplus.gov/genesandgenetherapy.html>
2. <https://www.genome.gov/27532724/>
3. Gene Therapy - Developments and Future Perspectives (2001), Prof. Chunsheng Kang (Ed.), ISBN: 978-953-307-617-1, InTech.
4. Adams, D et al. 2018. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *NEJM*. 379 (1): 11-21.
5. Wu, H et al. 2018. Epigenetic Regulation in B-cell Maturation and Its Dysregulation in Autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* 14. 1-9.
6. Levanova, A. and M.M Poranen. 2018. RNA Interference as A Prospective Tool for The Control of Human Viral Infection. *Front. Microbiol.* 9. 2151.

Universitas
Esa Unggul