

Micro-RNA dan Implikasinya pada Kanker

SITI BOEDINA KRESNO

Instalasi Patologi Klinik Rumah Sakit/Pusat Kanker Nasional Dharmais

Diterima tanggal, 19 Mei 2011, Disetujui, 23 Mei 2011

ABSTRACT

Micro-RNAs (miRNA) are a family of non-coding RNA that regulate gene expression at the post-transcriptional and translational level within the cellular signaling pathways. They can act as oncogenes or as tumor suppressor genes depending on their mRNA targets, function as modulator for translation and mRNA stability and have the potency to influence various pathways of cell proliferation, differentiation and apoptosis. Dysregulated miRNA expression may influence above mentioned cellular pathways leading to malignant transformation. In the past several years, various miRNA involved in cancer development has been recognized. Besides tissue miRNA, circulating miRNA can be identified and their levels measured in serum and other body fluids, raising the possibility that miRNAs may serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis, prognosis and monitoring of cancer.

Key words: *micro-RNA, cell-free-miRNA, post-transcriptional regulator.*

ABSTRAK

MikroRNA (miRNA) merupakan keluarga RNA yang tidak menyandi (non-coding RNA) yang berfungsi mengatur ekspresi gen pada jalur transduksi sinyal seluler. Ia dapat bersifat onkogen atau gen supresor tumor, tergantung mRNA sasarannya dan berfungsi sebagai modulator translasi dan stabilitas mRNA serta berpotensi mempengaruhi berbagai jalur proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel. Kelainan pada miRNA, baik ekspresi berlebihan maupun delesi, dapat berpengaruh pada berbagai proses seluler di atas dan berakibat transformasi ganas. Dalam beberapa tahun terakhir, berbagai jenis miRNA yang berperan pada keganasan telah dapat diidentifikasi, bahkan selain dalam jaringan tumor juga dapat diidentifikasi dan diukur kadarnya dalam serum dan cairan tubuh lain sebagai *circulating* miRNA, sehingga di kemudian hari dapat digunakan sebagai biomarker non-invasif untuk diagnosis maupun prognosis dan pemantauan kanker.

Kata kunci: *micro-RNA, cell-free-miRNA, regulator pasca-transkripsi*

PENDAHULUAN

Decade terakhir merupakan era baru dalam pemahaman tentang pengaturan gen pada perkembangan sel normal maupun pada berbagai penyakit, termasuk kanker. Telah diterima secara luas bahwa sel manusia normal mengekspresikan RNA (mRNA) yang merupakan cetakan (*template*) bagi translasi gen menjadi protein. Berbagai penelitian membuktikan bahwa sel normal, di samping mengekspresikan RNA (mRNA) yang menyandi seperti disebut di atas, juga mengekspresikan beribu-ribu molekul RNA fungsional yang tidak menyandi (*non-coding* RNA). RNA yang tidak menyandi ini ditranskripsikan dari sekuen RNA (yang karena merupakan molekul kecil disebut sebagai microRNA atau miRNA) dan terbukti mempunyai fungsi regulasi dalam sel normal. Walaupun baru sebagian kecil dari miRNA yang diketahui peran biologisnya, dari miRNA yang sudah teridentifikasi diketahui bahwa molekul-molekul itu berperan mengatur berbagai proses penting dalam pertumbuhan, diferensiasi, apoptosis, adhesi, dan proses seluler lain. Oleh karena itu, diduga memegang peran pada mekanisme terjadinya kanker. Dari berbagai penelitian, terbukti bahwa ekspresi abnormal miRNA dapat mempromosikan tumorigenesis, metastasis, dan berbagai sifat kanker yang lain. Penelitian bioinformatik dan *microarray* mengungkapkan bahwa satu miRNA tunggal dapat

KORESPONDENSI:

Prof.dr. Siti Boedina

Kresno, Sp PK(K)

Instalasi Patologi Klinik

RS. Kanker "Dharmais"

Email:

sbkresno@gmail.com

berikatan dengan 200 gen sasaran, dan bahwa gen sasaran ini dapat berupa faktor transkripsi, reseptor, faktor yang disekresikan maupun transporter. Diduga bahwa miRNA mengontrol ekspresi sekitar sepertiga dari seluruh mRNA manusia.^{1,2}

Dengan penemuan miRNA ini maka muncul pemahaman baru tentang molekul-molekul yang mengatur ekspresi gen. Para peneliti menggolongkan miRNA sebagai kelompok regulator gen yang baru dan dari hasil penelitian tentang fungsi miRNA, molekul-molekul ini dimasukkan dalam kelompok molekul yang berfungsi dalam jalur transduksi sinyal seluler.³ Diduga bahwa miRNA berfungsi sebagai modulator translasi dan stabilitas mRNA, walaupun sebagian besar mRNA sasaran masih harus diteliti. Telah diketahui bahwa genom manusia menyandi sedikitnya 1000 miRNA yang berlokasi di semua kromosom, kecuali kromosom Y dan diduga bahwa molekul-molekul ini berpotensi mempengaruhi berbagai jalur proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel.⁴ MiRNA memegang peran penting pada pengaturan siklus sel punca embrionik, dan mengontrol komitmen sel punca untuk berdiferensiasi ke arah jalur lineage sel tertentu.^{5,6} Dengan potensinya mempengaruhi berbagai proses seluler di atas, dapat diduga bahwa perubahan atau disregulasi ekspresi miRNA dapat berperan dalam perubahan sel punca menjadi sel punca kanker dan berperan pada tumorigenesis, termasuk leukemogenesis.^{2,7} Berbagai pola peningkatan ekspresi miRNA dihubungkan dengan subset sitogenetik dan subset molekuler leukemia mielositik akut. Penelitian dalam hal ini mengungkapkan bahwa beberapa miRNA dapat berfungsi sebagai onkogen dan sebagian lagi berfungsi sebagai gen supresor. Pemahaman tentang miRNA juga telah membuka jalan bagi penentuan prognosis di samping parameter yang ada hingga saat ini, maupun pendekatan terapi dengan cara memodifikasi ekspresi miRNA seperti yang telah dilakukan dalam berbagai percobaan.⁷ Dalam makalah ini akan dibahas pengertian saat ini tentang miRNA dan peranannya dalam perkembangan sel dan keganasan.

DEFINISI DAN BIOGENESIS

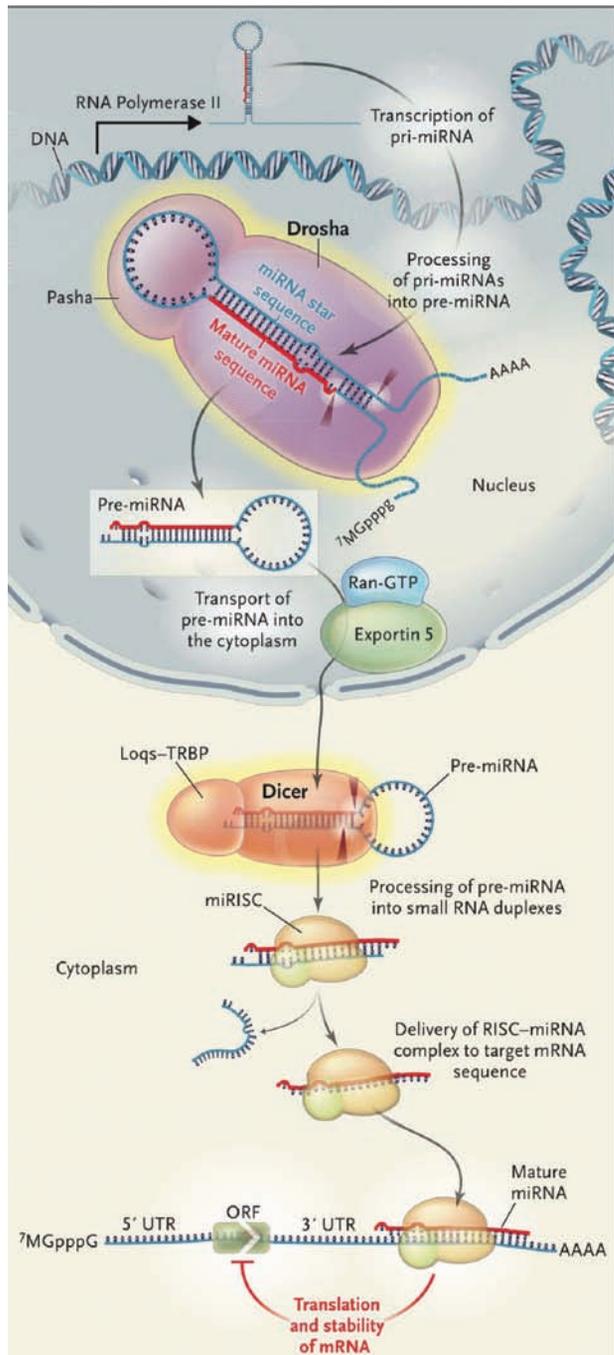
MicroRNA pertama kali ditemukan pada penelitian Lee (1993) saat melakukan sekuen gen lin-4. Pada penelitian itu diketahui bahwa gen tersebut terlibat dalam menentukan waktu dan progresi siklus hidup nematoda serta perkembangan larva. Eksperimen Lee ini mengungkapkan bahwa lin-4 tidak menyandi protein, tetapi memproduksi sepasang RNA kecil yang mengatur translasi lin-14 secara negatif melalui interaksi anti-sens antara RNA-RNA, dan peran penting interaksi RNA-RNA ini. Kemudian juga dibuktikan dengan penelitian-penelitian lain yang dilakukan kemudian. Istilah miRNA

dikumukakan pada 2001, dan pada tahun itu pula miRNA diidentifikasi dan di-klon pada berbagai spesies, termasuk mamalia. Genom manusia menyandi sedikitnya 1000 miRNA yang terletak pada semua kromosom, kecuali kromosom Y, dan dibuktikan bahwa miRNA memegang peran penting pada berbagai jalur proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel.^{2,4}

MicroRNA merupakan keluarga RNA yang tidak menyandi (*non-coding* RNA) yang tersusun atas 19-24 nukleotida yang mengatur stabilitas dan translasi mRNA. MiRNA secara khas mengikatkan diri (*hybridize*) pada regio 3' dari mRNA yang tidak ter-translasi dan menyebabkan represi dan atau degradasi pascatranskripsi mRNA bersangkutan dalam sel yang berproliferasi. Data penelitian terakhir menunjukkan secara lebih spesifik bahwa miRNA mengatur ekspresi gen melalui pengikatan pada elemen pengenalan (*recognition elements*) regio 3' dari mRNA yang tidak ter-translasi.⁷ Jadi, singkatnya miRNA terlibat dalam tingkat pascatranslasi dengan mendegradasikan atau memblokir translasi mRNA sasaran yang berakibat modifikasi ekspresi gen.⁴

MicroRNA dibentuk dari miRNA primer (sering juga disebut pri-miRNA) yang ditranskripsikan oleh RNA polymerase II dengan ekor *cap* dan *poly A*. MicroRNA primer dipecah oleh ribonuklease III Drosha dan protein pengikat DNA untaian ganda (*double stranded DNA*) Pasha/DCGR8 menjadi struktur pre-miRNA berbentuk seperti jepit rambut (*hair-pin*) yang besarnya 70-100 nukleotida, kemudian diekspor ke sitoplasma oleh exportin 5/Ran GTP. Selanjutnya, Dicer (enzim ribonuclease III) memproses pre-miRNA menjadi dupleks miRNA yang besarnya 19-24 nukleotida. Dicer juga mengawali pembentukan *RNA-induced silencing complex* yang bertanggung jawab atas terjadinya *gene silencing* dengan cara mengikat dupleks miRNA. MicroRNA dapat ditranskripsikan sebagai unit tunggal atau sebagai cluster. MicroRNA yang ditranskripsikan sebagai *cluster* disebut sebagai "polycistronic miRNA".^{1,4} (lihat gambar 1, dikutip dari Slack.¹)

Seperti disebutkan di atas, Dicer bersama-sama dengan partnernya Loqs-TRBP melaksanakan pemotongan kedua pada pre-miRNA untuk menghasilkan dupleks mi-RNA matang (*mature miRNA*). Dupleks ini kemudian masuk ke dalam kompleks protein ketiga yang disebut *RNA-induced silencing complex* (RISC), yang menghasilkan dan mengarahkan miRNA matang ke sasarannya. MiRNA matang kemudian berikatan pada regio 3'UTR dan regio penyandi mRNA sasaran. Secara khusus, sasaran miRNA sebagian besar merupakan pasangan basa dalam untaian (sekuen) kecil. Untaian ini terdiri atas 7 nukleotida pada ujung 5' miRNA yang sekuen-nya cocok atau merupakan sekuen komplementer (*matching sequences, sequence complementarity*) dari mRNA. Derajat keco-



Gambar 1: Drosha dan Dicer, pemrosesan dan fungsi microRNA (miRNA).¹

cokan kecil yang disyaratkan ini memberikan fleksibilitas yang besar. Karena itu, miRNA diduga dapat mengatur sepertiga dari semua gen penyandi dalam sel manusia. Karena itu pula, tidak heran kalau ada *cross-talk* yang nyata antara miRNA dengan faktor pengatur siklus sel, dan bahwa sel kanker sering memodifikasi fungsi regulasi miRNA tersebut untuk keuntungan proliferasinya sendiri.⁵

Seperti telah disebut di atas, miRNA mengenali sasarannya berdasarkan sekuen komplementer. Sebagian miRNA matang komplementer dengan satu atau lebih mRNA. Pada manusia, situs komplementer ini biasanya terletak pada regio 3' mRNA sasaran yang tidak ter-translasi. Agar supaya menjadi efektif, miRNA matang membentuk kompleks dengan *RNA-induced silencing complex*. MiRNA yang terinkorporasi dalam *silencing complex* tersebut dapat berikatan dengan mRNA sasaran melalui pasangan basa (*base pairing*). *Base pairing* ini selanjutnya menyebabkan inhibisi translasi protein dan atau degradasi mRNA. Konsekuensinya adalah kadar protein gen sasaran berkurang, tetapi di lain pihak kadar mRNA sendiri dapat berkurang atau tidak.⁸

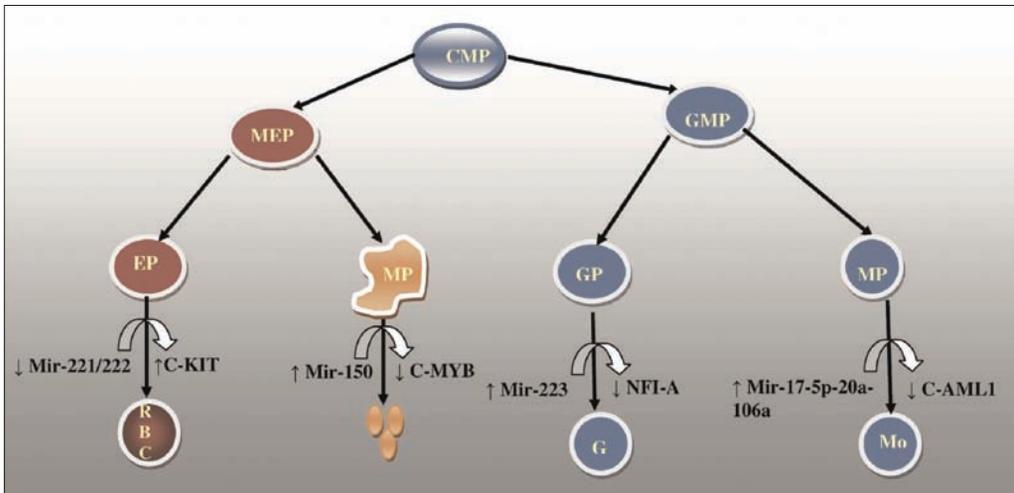
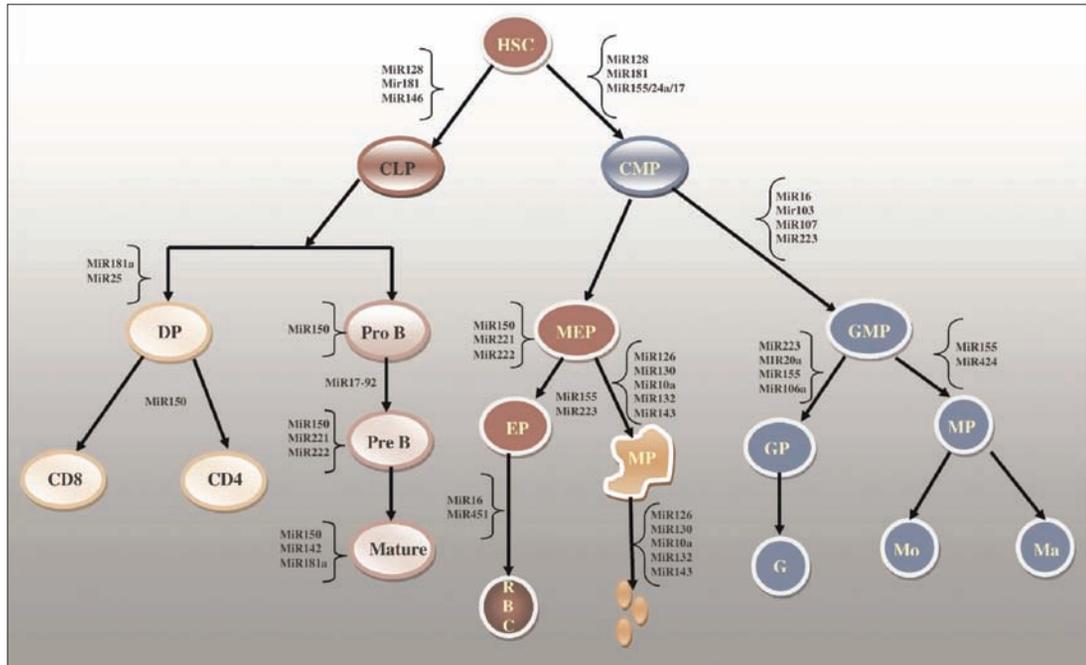
MICRO-RNA PADA HEMATOPOESIS NORMAL

Faktor transkripsi mengatur berbagai ekspresi gen dan pada gilirannya mengontrol diferensiasi dan komitmen sel punca hemopoetik untuk menjadi *lineage* tertentu.⁶ Berdasarkan pengertian saat ini, diduga bahwa ekspresi miRNA sebagian kecil adalah spesifik jaringan, sedangkan sebagian besar yang lain diekspresikan pada banyak jaringan.⁹ Beberapa miRNA seperti miRNA 142, 181, dan 223 lebih banyak diekspresikan pada jaringan hemo-poetik. Melalui modifikasi pasca-transkripsi dan pascatranslasi, miRNA tersebut mengubah ekspresi faktor transkripsi dan kemudian mengatur lebih lanjut (*fine tune*) jalur regulasi hematopoiesis.^{4,10}

MiRNA terlibat dalam berbagai tahap diferensiasi mieloid, mulai stadium dini diferensiasi sel progenitor hingga stadium terminal diferensiasi. MiRNA 17, 24, 146, 155, 128, dan 181 diduga terlibat dalam mempertahankan stadium awal fenotip sel punca progenitor, mengatur transisi sel progenitor multipoten menjadi *common myeloid progenitor* dan *common lymphoid progenitor*. Sedangkan miRNA 146 dan miRNA 155/24a/17 masing-masing menghambat diferensiasi progenitor multipoten menjadi *common lymphoid progenitor* dan *common myeloid progenitor*. (gambar 2 dikutip dari Bhagavathi⁴). MicroRNA 16, 103, dan 107 terbukti mem-blok komitmen progenitor myeloid menjadi granulosit dan makrofag. MiRNA 223 meningkatkan granulopoiesis dengan mem-blok faktor transkripsi NF1-A (gambar 3 dikutip dari Bhagavathi⁴), yang diketahui merupakan regulator negatif dari granulopoiesis. Di lain pihak, miRNA 223 ini juga mempromosikan granulopoiesis dengan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi CEPBA yang merupakan regulator positif granulopoiesis.

CLP common lymphoid progenitor; CMP common myeloid progenitor; DP double positive; EP erythroid progenitor; G granulocyte; GMP granulocyte macrophage progenitor; GP granulocyte progenitor; HSC hematopoietic stem cell; MEP macrophage erythroid progenitor;

Gambar 2: Peran berbagai miRNA dan faktor transkripsi pada hematopoiesis normal. (dikutip dari Bhagavathi 4)



Gambar 3: Peran miRNA dan faktor transkripsi pada hematopoiesis normal (dikutip dari Bhagavathi-4)

MP monocyte/macrophage progenitor.

MiRNA 150 diekspresikan pada sel B dan sel T matang serta mengatur faktor transkripsi C-MYB yang terlibat dalam perkembangan multistep limfosit. Ekspresi ektopik miRNA dalam sel punca hematopoetik menyebabkan berkurangnya secara nyata pool sel B matur dengan cara menghambat pematangan pro-B menjadi pre-B (lihat gambar 2). MiRNA 181 memegang peran penting pada perkembangan sel T.

Seperti tampak pada gambar 3, penurunan miRNA 221/222 secara progresif berakibat peningkatan protein kit dan menyebabkan ekspansi sel eritroid. MiRNA 150 menekan c-Myb dan meningkatkan megakariopoesis. MiRNA 223 meningkatkan granulopoiesis dengan memblok faktor transkripsi NFI-A. Peran inhibisi dari

miRNA 17-5P-20A-106A pada monositopoiesis terjadi dengan menargetkan AML1.⁴

MICRO-RNA PADA PERKEMBANGAN SEL PUNCA

Ciri penting sel punca adalah bahwa sel-sel tersebut memiliki kemampuan *self-renewal* dan diferensiasi. Mekanisme *self-renewal* dan diferensiasi pada sel punca sangat rumit. Penelitian-penelitian terakhir tentang gen penyandi protein telah membuktikan bahwa miRNA yang merupakan kelompok terbesar regulator pasca-transkripsi mempunyai peran penting pada berbagai proses biologik, dan berperan penting pada *self-renewal* serta diferensiasi sel punca. Diketahui bahwa sel punca bisa bersifat pluripoten yang berarti dapat menghasilkan sel-sel semua *lineage* embrional, dapat bersifat multipoten yang berarti

menghasilkan sel-sel berbagai (multipel) *lineage*, dan juga dapat bersifat unipoten yang berarti hanya menghasilkan satu *lineage*. Walaupun berpotensi seperti itu, semua sel punca mampu menekan (*silence*) program *self-renewal* pada saat diferensiasi. Program *self-renewal* merupakan integrasi antara stimulus eksternal dengan stimulus internal yang menghasilkan sel yang berproliferasi sambil mempertahankan potensi *self-renewal*-nya. Ada 2 ciri program *self-renewal*, yaitu *self-reinforcing transcriptional network* dan *specialized cell cycle profile*. Micro-RNA dapat berperan dalam *re-inforce* atau menghambat program *self-renewal* sel punca dan dengan demikian mengatur arah jalur diferensiasi sel.¹¹

Gangguan fungsi enzim Dicer mempengaruhi proses yang terjadi dalam sel punca dan sangat mengganggu kemampuan untuk diferensiasi. Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa banyak miRNA khusus yang secara fisiologis diperlukan oleh sel punca, misalnya miR-124 terbukti mengatur *alternative splicing* maupun jejaring transkripsi untuk meningkatkan diferensiasi sel neuron. Beberapa jenis mi-RNA secara spesifik diekspresikan pada sel punca dan mengontrol proses *self-renewal* sel punca dan diferensiasinya melalui pengaturan secara negatif ekspresi gen-gen kunci dalam sel punca. Sebagai contoh, pada manusia terdapat 8 lokus miRNA, yaitu miR-302b, miR302b*, miR-302c, miR-302*, hsc-3, miR-302a*, miR-302d, dan miR-373*, yang terletak dalam regio 700-bp kromosom 4, dan 4 lokus miRNA lainnya, yaitu miR-371, miR-372, miR-373 dan miR-373*, terletak dalam regio 1050-bp kromosom 19. Hal-hal ini menimbulkan dugaan bahwa miRNA spesifik sel punca terlibat dalam mengontrol dan mengatur *self-renewal* serta diferensiasi sel punca.² Penelitian lain juga telah membuktikan bahwa miR-302 secara simultan menghambat atau menekan jalur cyclin E-CDK2 dan cyclin DCCK4/6 sehingga mampu mencegah >70% transisi G1-S pada siklus sel. Salah satu

cara yang dilakukannya adalah mempromosikan fungsi gen supresor tumor p16ink4a sehingga menghambat proliferasi.¹² Yang unik dari ekspresi miRNA pada sel punca adalah keterlibatannya dalam memelihara *stemness* dan dalam hal ini diduga kelompok (*cluster*) miR-520 memegang peran penting.¹³

Cluster miR yang lain pada sel punca adalah miR-125a yang berfungsi mengontrol besarnya populasi sel punca dengan mengatur apoptosis. Salah satu cara di antaranya adalah menekan ekspresi gen pro-apoptotik Bak-1.¹⁴

MICRO-RNA DAN PERANANNYA PADA KEGANASAN

Makin lama makin banyak literatur yang mengungkapkan peran miRNA pada berbagai keganasan, termasuk keganasan hematologik. Dugaan ini muncul karena adanya beberapa bukti sebagai berikut: 1) miRNA yang paling dahulu diidentifikasi pada *C-elegans* dan *Drosophila* terbukti mengontrol proliferasi dan apoptosis sel, dan disregulasi miRNA ini dapat mengakibatkan penyakit proliferasi seperti kanker; 2) Saat miRNA manusia ditemukan, ternyata banyak gen miRNA terletak pada situs fragil genom atau regio yang biasanya diamplifikasi atau didelesi pada kanker; 3) tumor ganas dan *cell line* tumor diketahui menunjukkan disregulasi ekspresi miRNA yang lebih tersebar luas dibanding jaringan normal.⁸

Penelitian tentang miRNA saat ini difokuskan pada mempelajari fungsinya. Dampak miRNA pada patologi dan fisiologi sel ternyata sangat kompleks karena: 1) aktivitasnya berlangsung dalam bentuk "satu-terhadap-banyak" (*one-to-many*), yaitu tiap miRNA dapat mengontrol translasi berpuluh bahkan beberapa ratus mRNA yang berbeda, dan 2) setiap mRNA dapat dikontrol oleh lebih dari satu miRNA.⁹

Micro-RNA memiliki potensi sebagai onkogen maupun sebagai gen supresor tumor, tergantung

Tabel 1: Berbagai MicroRNA dan peranannya pada keganasan hematologi⁴

MiRNA	Lokus gen	Peran leukemogenesis	Sasaran faktor transkripsi	Efek/fungsi
204	9q21	Ditekan pada AML dengan mutasi NPM1 dan AML dengan kariotip normal	Target HOXA-10	Supresor
181a	1q31	Ditekan pada AML dan CLL	Target TCL1, CD69, BCL2	Supresor
155	21q21	Meningkat pada CLL dan limfoma Burkitt	Proliferasi limfosit	Onkogen
15-a,161	13q14(CLL)	Ditekan pada CLL, meningkat pada APL	Target BCL2	Supresor
29b	7q32	Ditekan pada AML dan CLL	Target MCL1 dan TCL1	Onkogen
21	FRA17b	Meningkat pada CLL	Target PTEN dan BCL2	Onkogen
143/145	5q32	Ditekan pada CLL	Target ERKS	Supresor
125b	11q24	Translokasi pada B-ALL		Supresor
382	17p13.1	Meningkat pada AML	Target TP53	Onkogen
10A	17q21	Meningkat pada AML	Target HOX1A	Onkogen
128A	2q21	Meningkat pada ALL		Onkogen
196A	17q21-22	Meningkat pada ALL	Target HOXB	Onkogen
32	12p12.1-p11.1	Meningkat pada mieloma sel plasma	Target RAS	Supresor

sasarannya. Kalau mRNA yang menjadi sasarannya adalah supresor tumor maka miRNA berfungsi sebagai onkogen sedangkan kalau mRNA sasarannya adalah onkogen maka ia berfungsi sebagai supresor.¹⁵ Tabel 1 menunjukkan peranan berbagai miRNA pada keganasan hematologik.⁴

Sudah diketahui bahwa prognosis AML bergantung pada berbagai kelainan sitogenetik dan molekuler. Walaupun demikian, dalam kelompok prognostik sitogenetik dan molekuler yang sama terbukti masih tetap ada perbedaan dalam *outcome* klinik. Berbagai bukti penelitian menunjukkan bahwa petanda miRNA spesifik terkait dengan subtype AML tertentu dan berperan dalam menentukan *outcome* di atas. Sama halnya dengan AML, profil ekspresi miRNA spesifik juga terdapat pada ALL dan berbeda untuk subtype ALL yang satu dengan yang lain, sehingga profil ekspresi miRNA di kemudian hari dapat digunakan untuk menentukan diagnosis dan prognosis keganasan hematologi.⁴

Seperti halnya pada keganasan hematologi, miRNA juga berperan penting pada tumor padat dan sebagian besar dampak miRNA terjadi pada jalur transduksi sinyal, misalnya jalur Wnt, VEGF, TGF- β dan lain-lain, dan banyak miRNA yang menunjukkan spesifisitas kanker tertentu.^{9,16}

Seperti telah disebut di atas, miRNA mempunyai potensi sebagai supresor atau sebagai onkogen, tergantung mRNA sasarannya. Keluarga let-7 merupakan golongan miRNA yang diketahui mengatur ekspresi proto-onkogen RAS. Ekspresi berlebihan protein RAS pada jaringan kanker paru berkorelasi dengan penurunan ekspresi miRNA let-7, sehingga diduga let-7 berfungsi sebagai supresor tumor.^{8,17} Micro-RNA lain yang juga berfungsi sebagai supresor dengan menghambat proliferasi adalah miR-148b. MiR-148b sering tidak diekspresikan pada kanker lambung yang berakibat terjadinya proliferasi tak terkendali.¹⁵ Hannafon dan kawan-kawan mempelajari berbagai miRNA yang berperan pada perubahan dini ekspresi mRNA yang mempromosikan kanker payudara. Tujuan penelitiannya adalah mengidentifikasi perubahan miRNA yang dapat digunakan untuk diagnosis dini kanker payudara pada fase pre-invasif. Mereka mendapatkan bahwa miR-93, miR-183, miR-181b, miR-182, dan miR-7 yang bersifat onkogenik mengatur ekspresi mRNA EGR1, CBX7, HOXA9 (yang bersifat supresor tumor). Sedangkan miR-195, miR-10b, let7c, miR-17, dan miR-125b yang bersifat supresor mengatur ekspresi mRNA EZH2, CCND1, ADAM9, dan MEMO1 yang sifatnya onkogenik. Disregulasi dari berbagai miRNA tersebut di atas mengakibatkan perubahan ekspresi mRNA atau gen-gen tersebut pada stadium dini, khususnya delesi miR-125b dan amplifikasi miR-182 dan miR-183 merupakan kontributor utama perkembangan dini kanker payudara.¹⁸

Di antara miRNA yang jumlahnya sangat banyak, ada yang akhir-akhir ini menarik perhatian cukup besar karena ia dikonservasi dan bertahan selama evolusi perkembangan sel. MiRNA itu dikenal sebagai miR-10 dan terletak dalam cluster Hox yang merupakan regulator perkembangan. Ia merupakan regulator biogenesis ribosom dan produksi protein secara global. Dalam sistem hemopoetik, miR-10 diekspresikan pada sel CD34+, dan kadar miR-10 dalam sel punca hemopoetik lebih banyak dibanding dalam limfosit darah perifer. MiR-10a, miR-10b, dan miR-100 diekspresikan berlebihan pada AML yang mengandung mutasi NPM1, sehingga diduga keluarga miR ini mempunyai hubungan kausal dengan mutasi NPM1. Disregulasi miR-10 juga dijumpai pada berbagai jenis kanker lain seperti kanker hati, pankreas, kolon, dan payudara. Kadar miR-10 menentukan besarnya kemungkinan sel untuk transformasi onkogenik.³

MICRO-RNA DAN PERANANNYA PADA PROGNOSIS KEGANASAN

Seperti telah diuraikan di atas, miRNA mempunyai peran penting pada perkembangan keganasan. Berbagai penelitian telah mengungkapkan bahwa perubahan ekspresi miRNA dapat dideteksi pada berbagai jenis keganasan dan dapat dikaitkan dengan prognosis, baik bersama dengan faktor prognostik lain maupun secara independen.^{7,17,19} Volinia dan kawan-kawan telah mempelajari jejaring miRNA pada dua jenis leukemia, yaitu AML dan CLL, serta mendapatkan bahwa profil miRNA pada kedua jenis leukemia ini berkaitan erat dengan prognosis.⁹ Salah satu faktor prognostik AML yang telah lama diketahui adalah kelainan kromosom yang dapat dijumpai pada sebagian besar AML. Namun demikian, sekitar 40-49% AML tidak menunjukkan kelainan kromosom (CN-AML) dan dalam 15 tahun terakhir dapat dibuktikan bahwa kelompok CN-AML ini secara molekuler merupakan kelompok yang heterogen dengan mutasi dan perubahan ekspresi berbagai gen yang terbukti mempengaruhi *clinical outcome* atau prognosis. Misalnya, mutasi FLT3-ITD yang berkorelasi dengan prognosis buruk, dan NPM1 yang berkorelasi dengan prognosis baik, terutama bila tidak disertai mutasi FLT3-ITD.⁷ Tabel 2 memperlihatkan beberapa miRNA penting yang berkaitan dengan profil sitogenetik dan molekuler pada AML.⁷ Dari tabel 2 tampak bahwa pada kelainan kromosom tertentu, ekspresi miRNA yang satu dapat meningkat sedangkan miRNA yang lain menurun. Tetapi, pada kasus sitogenetik normal pun dapat dijumpai kelainan ekspresi miRNA, baik meningkat atau menurun. Hal ini sering dikaitkan dengan kelainan molekuler yang diketahui erat kaitannya dengan prognosis AML. Karena itu, di samping pemeriksaan kelainan sitogenetik saat ini dianjurkan untuk menyertakan pemeriksaan kelainan

Tabel 2: MiRNA penting yang berkaitan dengan kelainan kromosom dan molekuler pada AML⁷

Kelainan kromosom	MiRNA meningkat	MiRNA menurun
t(15;17)	miR-127 miR-299 miR-323 miR-368 miR-382	miR-17 miR-126
t(8;21) inv(16)	miR-126	miR-133
t(11q23)/MLL	miR-326 miR-219 miR-17-92 miR-196a miR-124a miR-30d	miR-29s miR-34a miR-16
Trisomy 8		
Sitogenetik normal Kelainan gen		
Mutasi NPM1	miR-10a/-10b miR-196a miR-196b	miR-204 miR-128 miR-126 miR-130a miR-451
FLT3-ITD	miR-155	
Mutasi CEBPA	miR-181a miR-335	miR-34a
BAALC overexpression MN1 overexpression	miR-126 miR-126* miR-424	miR-148a miR-16 miR-17-92 miR-100 miR-196a

molekuler untuk menentukan prognosis.

Sejumlah miRNA telah diidentifikasi dapat membedakan CLL dari populasi sel B CD5+ normal. Sebanyak 13 miRNA sudah diketahui termasuk dalam golongan faktor prognostik dikaitkan dengan profil molekuler CLL yang ditentukan dengan mutasi atau non-mutasi IgVH dan kadar ZAP70 (seperti telah lama diketahui prognosis CLL erat kaitannya dengan ada tidaknya mutasi IgVH dan kadar ZAP70). Ekspresi miRNA tertentu berkaitan erat dengan respons terapi - yang berarti juga menentukan prognosis- misalnya respons CLL terhadap terapi fludarabine. Dalam berbagai penelitian terungkap bahwa sekitar 53% pasien dengan CLL yang refrakter terhadap fludarabine menunjukkan kadar miR-34a yang rendah dibanding 9% CLL yang sensitif.¹⁸ MicroRNA yang lain seperti miR-222, miR-148a, dan miR-21 diekspresikan berbeda di antara CLL yang sensitif dan CLL yang resistan terhadap fludarabine. Penemuan itu di kemudian hari dapat

berpengaruh terhadap strategi pengobatan CLL.¹⁹

Selain dampaknya pada prognosis keganasan hematologik, ekspresi miRNA juga berpengaruh pada prognosis tumor padat. Pada kanker paru dapat dibuktikan bahwa ada kelainan biogenesis miRNA. Kanker paru jenis NSCLC dengan peningkatan ekspresi miR-155 dan penurunan ekspresi miR-let7a-2 menunjukkan *survival* yang buruk. Daftar micro-RNA yang berperan dalam menentukan prognosis keganasan makin lama makin panjang, masing-masing dapat bermanfaat untuk digunakan dalam membedakan jenis kanker satu dengan yang lain, deteksi dini dan menentukan stadium, memprediksi respons terapi maupun memprediksi *survival*.^{17,20,21}

MICRO-RNA DALAM SIRKULASI SEBAGAI BIOMARKER KEGANASAN

Dari berbagai penelitian terungkap bahwa profil ekspresi miRNA menunjukkan ciri-ciri yang berhubungan dengan klasifikasi, diagnosis, dan perjalanan penyakit. Karena satu miRNA tunggal mampu mengatur beberapa mRNA, kelainan pada satu miRNA dapat mengganggu ekspresi beberapa mRNA dan protein sekaligus. Selain itu, seperti diuraikan di atas, sebagian besar miRNA adalah spesifik jaringan dan mengatur perkembangan lineage dan diferensiasi sel. Karena itu, profil ekspresi miRNA dapat digunakan untuk deteksi asal jaringan kanker yang tumor primernya tidak diketahui, dan status lineage dan diferensiasi tumor tertentu.²²

Pada 2008 untuk pertama kali terungkap bahwa miRNA dapat dideteksi dan diukur kadarnya dalam serum dan cairan tubuh lain sebagai *cell-free-miRNA*. Walaupun serum mengandung *ribonuclease* yang dapat merusak RNA, adanya miRNA dalam serum menunjukkan bahwa miRNA resistan terhadap perombakan oleh RNase. miRNA juga stabil pada kondisi yang tidak menguntungkan seperti suhu tinggi, pH tinggi/rendah, tindakan beku-cair berulang kali, dan lain-lain.²³ Hal ini diduga disebabkan miRNA berada dalam partikel (kompleks lipid atau lipoprotein) atau *microvesicle* (*exosome*) yang melindunginya terhadap degradasi oleh RNase. Karena *microvesicle* dan *exosome* juga dapat dijumpai dalam cairan tubuh lain, miRNA kemungkinan besar juga dapat ditemukan dalam cairan tubuh lain selain serum.^{22,23} Walaupun demikian, profil ekspresi miRNA dalam cairan tubuh seperti urin, saliva, cairan amnion, dan cairan pleura berbeda dengan profil ekspresinya dalam darah, yang membuktikan hipotesis bahwa profil microRNA dalam cairan tubuh merefleksikan fisiologi.²⁴

Dalam keadaan normal, kadar *cell-free-miRNA* dalam serum stabil dan profilnya sesuai dengan sel-sel darah dalam sirkulasi. Karena itu, perubahan dalam kadar microRNA dapat digunakan sebagai indikator adanya

perubahan fisiologis maupun patologis dan dapat digunakan sebagai biomarker non-invasif. Salah satu penelitian mengungkapkan bahwa pengukuran miRNA dalam sirkulasi dapat digunakan untuk membedakan orang sehat dari pasien dengan adenoma, dengan sensitivitas 73% dan spesifisitas 79%.²⁴ Identifikasi dan pengukuran kadar miRNA dapat digunakan untuk menunjang diagnosis dini kanker.^{16,23,25,26,27} Penelitian lain membuktikan bahwa analisis ekspresi miRNA dalam plasma perokok yang tidak menunjukkan gejala kanker (*disease-free smokers*) 1-2 tahun sebelum munculnya gejala klinik kanker paru menghasilkan ciri-ciri perubahan miRNA dengan potensi prediktor molekuler dan agresivitas kanker paru.²⁸ Pemeriksaan miRNA dalam feses juga berpotensi untuk dapat digunakan dalam menunjang diagnosis kanker kolorektal. Salah satu penelitian mengungkapkan bahwa beberapa jenis miRNA dalam feses dapat digunakan untuk membedakan kontrol sehat dari kolitis ulseratif, dan membedakan kanker kolorektal berbagai stadium Duke's. miR-21, miR-106a, miR-96, miR-203, miR-20a, miR-326, dan miR-92 diekspresikan lebih tinggi pada kanker kolorektal stadium Duke's lanjut, sedangkan ekspresi miR-320, miR-126, miR-143, miR-145, dan miR-125b pada stadium Duke's lanjut lebih rendah. Dengan demikian, pemeriksaan miRNA dalam feses dapat digunakan untuk diagnosis kanker kolorektal yang lebih sensitif dan spesifik dibanding *fecal-occult-blood-test* (FOBT).²⁹ Tabel 3 memperlihatkan profil miRNA dalam sirkulasi pada berbagai jenis kanker (dimodifikasi dari Brase.²⁴)

Seperti telah disebut di atas, sebagian miRNA merupakan miRNA spesifik jaringan, tetapi sebagian lain dapat

dijumpai pada jaringan-jaringan lain. Sebagai contoh, kanker kolorektal menunjukkan beberapa miRNA yang sama dengan kanker paru, misalnya miR-134, miR-146a, miR-221, miR-222, miR-23a, dan lain-lain. Keberadaan miRNA yang sama pada kedua jenis kanker ini konsisten sehingga diduga ada miRNA terkait tumor yang umum (*common-tumor-related-miRNA*). Di lain pihak, ekspresi masing-masing miRNA pada kanker tertentu dapat berbeda. Pada kanker kolorektal, kadar miR-17-3p dan miR-92 dalam serum meningkat sangat tinggi, dan menurun sangat drastis setelah tumor diangkat. Dengan demikian, disimpulkan bahwa pengukuran kadar miRNA dalam serum dapat digunakan sebagai biomarker untuk memantau keganasan.^{26,27,30} Metode deteksi yang digunakan bermacam-macam, tetapi pada umumnya menggunakan RT-PCR kuantitatif, atau *microarray* (lihat tabel 3).^{22,31}

RINGKASAN

MicroRNA merupakan keluarga RNA yang tidak menyandi (*non-coding RNA*) yang berfungsi mengatur ekspresi gen pada jalur transduksi sinyal seluler. Ia berfungsi sebagai modulator translasi dan stabilitas mRNA serta berpotensi mempengaruhi berbagai jalur proliferasi, diferensiasi dan apoptosis sel. Ia dapat berfungsi sebagai onkogen maupun *tumor suppressor gene*, tergantung mRNA sarasannya. Kelainan pada miRNA, baik ekspresi berlebihan maupun delesi, dapat berpengaruh pada berbagai proses seluler, termasuk transformasi ganas. Dalam beberapa tahun terakhir, berbagai jenis miRNA yang berperan pada keganasan telah dapat diidentifikasi, bahkan selain dalam jaringan

Tabel 3: Profil miRNA serum pada berbagai jenis kanker (dimodifikasi dari Brase²⁴)

Jenis tumor	miRNA dalam sirkulasi	Teknik pemeriksaan
Limfoma sel B	miRNA-155, miRNA-210, miRNA-21	RT-PCR kuantitatif
Kanker payudara	miRNA-195, let-7a miRNA-155	RT-PCR kuantitatif RT-PCR kuantitatif
Kanker kolon	miRNA-29, miRNA-92a miR-17-3p, miR-92	RT-PCR kuantitatif RT-PCR kuantitatif
Kanker lambung	miR-17-5p, miR-21, miR-106a, miR-106b, let-7a	RT-PCR kuantitatif
Leukemia	miRNA-92a	Microarray microRNA
Kanker paru	miRNA-25, miRNA-223, miR-486, miR-30d, miR-1, miR-499	RT-PCR kuantitatif dan sekuensing
Kanker mulut	miR-31	RT-PCR kuantitatif arrays
Kanker ovarium	miRNA-21, miRNA-92, miRNA-93, miRNA-29a, miRNA-155, miRNA-127, miRNA-99b	RT-PCR kuantitatif arrays
Kanker pankreas	miRNA 201, miR-21, miR-210, miR-155, miR-196a	RT-PCR arrays
Kanker prostat	miRNA-141, miRNA-375	RT-PCR kuantitatif
SCC	miRNA-184	RT-PCR kuantitatif arrays

tumor juga dapat diidentifikasi dan diukur kadarnya dalam serum sebagai *circulating /cell free miRNA*, sehingga di kemudian hari dapat digunakan sebagai biomarker non-invasif untuk diagnosis maupun prognosis dan pemantauan kanker. ❖

DAFTAR PUSTAKA

- Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNA in cancer prognosis. *New Engl J Med* 2008; 359(25): 2720-22
- Xia HP. Great potential of microRNA in cancer stem cell. *J Cancer Mol* 2008; 4(3): 79-89
- Lund AH. miR-10 in development and cancer. *Cell Death Diff* 2010; 17: 209-14
- Bhagavathi S, Czader M. MicroRNAs in benign and malignant hematopoiesis. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1276-80
- Wang Y, Belloch R. Cell cycle regulation by microRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res* 2009; 69(10): 4093-95
- Hornstein E. miRNA activity directs stem cell commitment to a particular fate. *Cell Cycle* 2010; 9(20): 1-2
- Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 117: 1121-29
- Sassen S, Miska EA, Caldas C. Micro-RNA – implications for cancer. *Virchows Arch* 2008; 452: 1-10
- Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Gen Res* 2010; 20: 589-99
- Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2009; 84: 1-16
- Melton C, Biellock R. MicroRNA regulation of embryonic stem cell self renewal and differentiation. In: Meshorer E and Plath K (eds). *The Cell Biology of Stem Cells*. Austin, Landa BioSc 2010.
- Lin SL, Chang DC, Ying SY, Leu D, Wu DTS. MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of the CDK2 and CDK4K c3ell cycle pathway. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9473-82
- Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroucek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cell. *J Transl Med* 2009; 7: 10. Diunduh dari <http://translationalmed.com/content/7/1/20>
- Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, et al. MicroRNA miR-125a controls hemopoietic stem cell number. *PNAS* 2010; diunduh dari <http://www.pnas.org/content/early/2010/07/06/0913574107full.pdf>
- Song YX, Yue ZY, Wang ZN, Xu YY, Luo Y, Xu HM, et al. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer* 2011; 10: 1. Diunduh dari: <http://www.molecularcancer.com/content/10/1/1>
- Fu SW, Chen L, Man YG. MiRNA biomarkers in breast cancer detection and management. *J Cancer* 2011; 2: 116-22.
- Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. *Brit J Cancer* 2010; 103: 1144-48
- Hannafon BN, Sebastian P, de las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL. Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R24. Diunduh dari <http://www.breast-cancer-research.com/content/13/2/R24>
- Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, Cavazzini F, Veronese A, Ciccone M, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 2010;9:123. Diunduh dari <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/123>
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2011; 1: 119-25
- Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The Oncol.* <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/content/short/theoncologist.2010-0103v1>
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sc* 2010; 101: 2087-92
- Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:306 Diunduh dari <http://www.molecular.cancer.com/content/9/1/306>.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008; 3(9): e3148. www.plosone.org.
- Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter E. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009;2:89. Diunduh dari <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/2/89>
- Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009;8:102. Diunduh dari <http://www.molecular-cancer.com/content/8/1/102>
- Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sc* 2011; 120: 183-93
- Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *PNAS* 2011; 108(9): 3713-18
- Dong Y, Wu WKK, Wu CW, Sung JY, Yu J, Ng SSM. MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Brit J Cancer* 2011; 104: 893-98
- Kroh EM, Parkin RK, Michell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298-301
- Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DSB. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem* 2011; 57: 84-91.