

BAB 1

PENDAHULUAN

Terapi gen adalah teknik untuk mengoreksi gen-gen yang cacat yang bertanggung jawab terhadap suatu penyakit. Pengobatan atau pencegahan penyakit melalui terapi gen dilakukan dengan transfer bahan genetik ke tubuh pasien. Terapi ini berkembang dengan pesat sejak *clinical trial* pada tahun 1990 (Malik, 2005).

Pendekatan terapi gen yang berkembang adalah dengan menambahkan gen normal ke dalam sel yang mengalami ketidaknormalan, mengganti gen abnormal dengan gen normal dengan melakukan rekombinasi homolog, mereparasi gen abnormal dengan cara mutasi balik selektif sehingga akan mengembalikan fungsi normal gen tersebut, dan mengendalikan regulasi ekspresi gen abnormal tersebut. Perkembangan yang terkini adalah mencegah diekspresikannya gen-gen yang abnormal, atau dikenal dengan istilah *gene silencing*. Untuk tujuan *gene silencing*, penggunaan RNA jika dibandingkan dengan DNA lebih dimungkinkan, sehingga dikenal istilah *RNA therapeutic* (Malik, 2005).

Perkembangan terapi gen dimulai dari suatu studi yang dilaporkan di majalah Nature pada bulan Mei 2001 bahwa RNA dapat membungkam ekspresi gen dengan efektif. Terapi gen mereparasi mRNA (*messenger RNA*) daripada mengganti gen yang cacat dengan menggunakan mekanisme regulasi sel itu sendiri, sehingga efek samping yang merugikan lebih dapat ditekan (Malik, 2005). Penghambatan proses ekspresi gen dilakukan pada tahap translasi, yaitu dengan mengganggu proses translasi tersebut pada molekul mRNA. Molekul RNA yang akan ditranslasi mempunyai urutan di bagian hulu sebagai tempat pengenalan bagi ribosom dalam proses sintesis protein. Ribosom sebagai mesin pensintesis

polipeptida yang kemudian dimodifikasi lebih lanjut menjadi protein. Manipulasi pada tahap translasi mRNA bertujuan untuk mengatasi suatu penyakit genetik dikenal dengan istilah *antisense* RNA, *small interfering* RNA (siRNA), atau disebut pula *RNA interference* (RNAi) (Malik, 2005).

RNA interference (RNAi) merupakan strategi pertahanan kuno yang dimiliki oleh tumbuhan dan invertebrata tingkat rendah untuk melawan infeksi virus dan kerusakan genomik akibat menyisipnya materi genetik asing. RNAi dapat menghambat ekspresi gen pada urutan yang spesifik dengan memutus mRNA. Mekanisme kerja RNAi melibatkan suatu intermediet aktif yang disebut *small interfering* RNA (siRNA) (Malik, 2005).

Saat ini para klinisi sudah merintis penggunaan RNAi pada pasien-pasien dengan penyakit Parkinson, juga penyakit-penyakit infeksi seperti hepatitis dan HIV. Pengobatan penyakit kanker pun sudah mulai menerapkan RNAi dalam banyak percobaannya, baik secara langsung mentarget gen-gen penyebab kanker atau secara tidak langsung mentarget gen-gen yang menyebabkan sel kanker kebal terhadap obat-obat kemoterapi (Oktavia, 2010).

Molekul siRNA berukuran kecil yaitu hanya 21-25 nukleotida dengan dua nukleotida pada kedua ujung tidak berpasangan (untaian residu 3'). Molekul ini dihasilkan dari hasil kerja suatu enzim *Dicer*, yaitu suatu ribonuclease dengan energi ATP, yang mengenali dan memotong RNA yang membentuk dupleks untai ganda menjadi potongan kecil fragmen untai ganda RNA. siRNA juga dihasilkan dari suatu *short hairpin* RNA, yaitu untai dupleks RNA yang terbentuk dari suatu untai tunggal yang membentuk *hairpin* (seperti jepit rambut, dengan lengkungan melipat pada salah satu ujungnya) yang juga dipotong oleh *Dicer*. Oleh enzim helicase, siRNA akan dibuka ikatan hidrogennya sehingga untai antisense dari

siRNA yang terbebas dapat bergabung dengan protein membentuk suatu kompleks protein - *RNA-induced silencing complex* (RISC). Kompleks tersebut akan mengaktifkan RISC yang semula inaktif, dan kemudian bekerja memutus mRNA pada bagian yang mengandung urutan homolog dengan siRNA (Malik, 2005).

Terapi menggunakan siRNA memiliki permasalahan dalam hal stabilitas dan sistem penghantaran ke dalam sel. Dua teknik sistem penghantaran siRNA yaitu: secara langsung melakukan introduksi siRNA sintetik, dan introduksi suatu plasmid atau virus yang menyandi urutan gen yang akan memproduksi siRNA yang sesuai. Kendala dalam terapi ini yaitu mudahnya siRNA terdegradasi ketika masuk ke dalam tubuh. Oleh karena itu, dilakukan upaya untuk meningkatkan stabilitas dari siRNA yaitu dengan cara melakukan modifikasi kimia pada gugus ribosa siRNA dan basa (Malik, 2005).

Pada molekul siRNA, ikatan hidrogen antara basa dapat terjadi melalui pasangan basa non Watson-Crick (WC) atau *non-canonical*. Pasangan tersebut merupakan faktor penting dalam pengaturan struktur siRNA. Pada molekul DNA, ikatan hidrogen antara basa terjadi melalui pembentukan standar pasangan basa Watson-Crick (WC) (Bansal, 2003; Cahyono, 2010).

Struktur sekunder siRNA dibuat pada saat memodifikasi siRNA. Hal ini dilakukan karena struktur yang berbentuk *double helix / double strand* merupakan tempat terjadinya interaksi dengan molekul lainnya. Modifikasi yang dilakukan terhadap siRNA yaitu:

- 1) Modifikasi pada gugus ribosa.

Melakukan penguncian (*lock*) pada gugus ribosa agar dapat mempertahankan ikatan dan kestabilan, yaitu menjadi *Locked Nucleic Acid* (LNA). LNA mengandung jembatan metilen menghubungkan 2'-

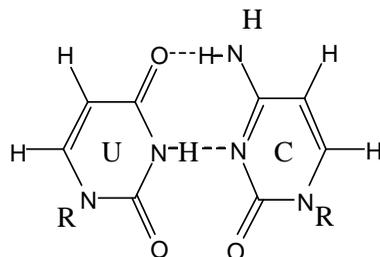
oksigen dengan 4'-karbon pada cincin ribosa (C2'-endo). Jembatan ini mengunci cincin ribosa pada konformasi karakteristik RNA C3'-endo (Pande and Nilsson, 2008).

2) Modifikasi pada basa.

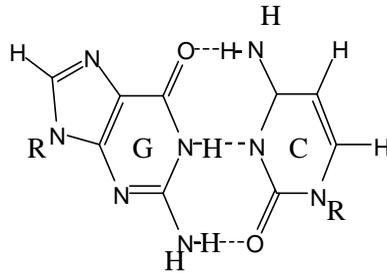
a. Penggantian pasangan basa (modifikasi *closing base pair*).

Penggantian pasangan basa yang tidak sebenarnya (*non-canonical* (C-U)) dengan pasangan basa yang sebenarnya (*canonical* (C-G)). Hal ini dilakukan untuk membentuk keserasian ikatan hidrogen agar tidak terjadi penolakan pembentukan pasangan basa sehingga stabilitas siRNA dapat meningkat. Urasil (U) pada pasangan basa *non-canonical* (C-U) diganti dengan Guanine (G) oleh RNA polimerase sehingga siRNA menjadi lebih stabil (Cahyono, 2010).

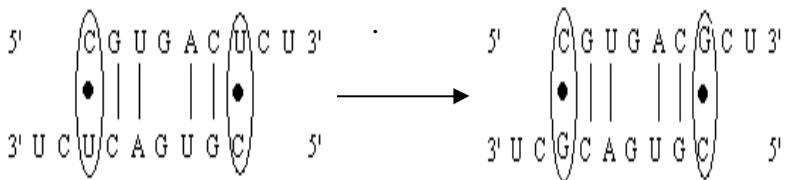
Penggantian ini berdasarkan pada jumlah ikatan hidrogen yang lebih sedikit pada pasangan basa *non-canonical* (C-U) yaitu sebanyak 2 ikatan dibandingkan dengan pasangan basa *canonical* (C-G) yang jumlah ikatan hidrogennya sebanyak 3 ikatan. Pasangan basa *canonical* (C-G) lebih stabil daripada pasangan basa *non-canonical* (C-U) (Cahyono, 2010).



Gambar 1.1. Pasangan basa *non-canonical* (C-U).



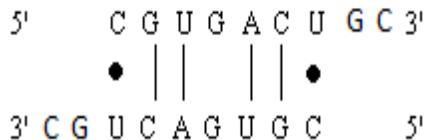
Gambar 1.2. Pasangan basa *canonical* (C-G).



Gambar 1.3. Pasangan basa C-U dimodifikasi menjadi pasangan basa C-G.

- b. Adanya penggantian dua untaian basa (untaian residu 3') pada kedua ujung.

Untaian basa dapat meningkatkan stabilitas siRNA apabila untaian nukleotida terdekat adalah purin (*Guanine, Adenine*). Hal ini karena purin lebih bersifat aromatis daripada pirimidin (*Cytosine, Uracil*) (Isaksson and Chattopadhyaya, 2005; Oktavia, 2010).



Gambar 1.4. Pasangan basa residu RNA dengan basa untaian G dan C.



Gambar 1.5. Pasangan basa residu RNA dengan basa untaian C dan G.

Keterangan:

- menunjukkan: *closing base pair*
- menunjukkan: ikatan hidrogen.

Penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa penggantian pasangan basa *canonical* menyebabkan kenaikan stabilitas siRNA dupleks secara signifikan (Cahyono, 2010). Penguncian basa dalam LNA juga menyebabkan kenaikan afinitas LNA-protein Argonaute (Novalia, 2010). Pasangan basa residu RNA dengan untaian G-C lebih *konvergen* dibandingkan pasangan basa residu RNA dengan untaian C-G (Oktavia, 2010). Berdasarkan hal tersebut dalam penelitian ini dipelajari *docking* protein Argonaute dengan siRNA yang dibandingkan dengan siRNA termodifikasi. Tujuan penelitian ini akan memberikan gambaran posisi siRNA dan siRNA termodifikasi dengan protein Argonaute dan interaksinya.