

The effect of miRNA-135b overexpression on the gene expression profile of LNCaP cells

A. Pendahuluan

MicroRNA (miRNA) merupakan molekul RNA kecil non-coding berukuran ±18–25 nukleotida yang berperan sebagai regulator utama ekspresi gen pada tingkat post-transcriptional melalui mekanisme pengikatan pada 3'-UTR mRNA target, sehingga menyebabkan degradasi mRNA atau inhibisi translasi. Dalam konteks kanker, miRNA dapat berfungsi sebagai oncomiR maupun tumor suppressor, tergantung pada target gen yang diregulasi. Salah satu miRNA yang banyak dilaporkan terlibat dalam progresi kanker adalah miR-135b, yang diketahui berperan dalam modulasi proliferasi sel, migrasi, angiogenesis, serta adaptasi terhadap hipoksia. Beberapa studi menunjukkan bahwa miR-135b dapat mengatur androgen receptor (AR) dan estrogen receptor α (ERα), dua reseptor nuklir yang berperan penting dalam patogenesis kanker prostat dan kanker payudara (Grigore et al., 2024).

Pada kanker prostat, khususnya pada sel AR-positif seperti LNCaP, jalur sinyal AR merupakan regulator utama pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel. Aktivasi AR mengontrol transkripsi berbagai gen yang terlibat dalam proliferasi, metabolisme, dan diferensiasi sel. Selain itu, interaksi antara AR dan jalur lain seperti jalur HIF1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha) memperlihatkan adanya cross-talk molekuler yang kompleks, terutama dalam kondisi hipoksia yang umum ditemukan pada mikroenvironment tumor. miR-135b diduga berperan dalam modulasi jalur-jalur ini, baik secara langsung melalui penargetan mRNA tertentu maupun secara tidak langsung melalui regulasi jaringan transkripsi yang lebih luas (Zhang et al., 2024).

Dataset GSE57820 dikembangkan untuk mengevaluasi dampak overekspresi miR-135b terhadap profil ekspresi gen pada sel kanker prostat LNCaP dalam rentang waktu berbeda (12, 24, dan 36 jam). Pendekatan time-course ini penting karena efek regulasi miRNA sering kali bersifat dinamis dan bertahap, dimulai dari target langsung (early response genes) hingga perubahan sekunder pada jaringan regulasi yang lebih kompleks. Dengan menganalisis perubahan ekspresi gen secara komprehensif, penelitian ini dapat memberikan gambaran mengenai bagaimana miR-135b memengaruhi lanskap transkriptom sel kanker prostat secara temporal.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen yang mengalami perubahan ekspresi signifikan (Differentially Expressed Genes/DEGs) akibat overekspresi miR-135b, membandingkan pola ekspresi gen pada waktu inkubasi 12, 24, dan 36 jam, dan menginterpretasikan implikasi biologis perubahan ekspresi gen tersebut terhadap regulasi AR dan jalur terkait kanker.

Hipotesis penelitian ini adalah bahwa overekspresi miR-135b pada sel LNCaP akan menyebabkan perubahan ekspresi gen yang signifikan dan bersifat time-dependent, dengan jumlah serta kompleksitas DEGs meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi. Selain itu, diduga bahwa gen-gen yang terdiferensiasi tersebut akan melibatkan target langsung maupun tidak langsung dari miR-135b yang berkaitan dengan regulasi AR dan jalur hipoksia (HIF1 α) sehingga berkontribusi terhadap perubahan proliferasi dan dinamika molekuler sel kanker prostat.

B. Metode

1. Pemilihan Dataset

Penelitian ini menggunakan dataset **GSE57820** yang diperoleh dari Gene Expression Omnibus (GEO), sebuah repositori publik milik National Center for Biotechnology Information (NCBI). Dataset ini berasal dari eksperimen expression profiling by microarray pada sel kanker prostat manusia LNCaP (*Homo sapiens*). Tujuan eksperimen adalah mengevaluasi dampak overekspresi microRNA-135b (miR-135b) terhadap profil ekspresi gen pada sel kanker prostat androgen receptor (AR)-positif dalam beberapa interval waktu. Dalam desain eksperimen, sel LNCaP ditransfeksi menggunakan Ambion pre-miR™ construct miR-135b pada konsentrasi 20 nM, sedangkan kelompok kontrol menggunakan pre-miR negative control (scrambled control). Sampel dikumpulkan pada tiga titik waktu setelah transfeksi, yaitu 12 jam, 24 jam, dan 36 jam. Setiap kondisi memiliki dua replikasi biologis sehingga meningkatkan reliabilitas data dan mengurangi bias eksperimental.

The screenshot shows the NCBI GEO Accession Display page for dataset GSE57820. At the top, there are links for NCBI, HOME, SEARCH, SITE MAP, GEO Publications, FAQ, MIAME, and Email GEO. A login link is also present. The main content area displays the following details:

Series GSE57820	
Status	Public on Apr 21, 2015
Title	The effect of miRNA-135b overexpression on the gene expression profile of LNCaP cells
Organism	<i>Homo sapiens</i>
Experiment type	Expression profiling by array
Summary	MicroRNAs (miRNAs) regulate a wide range of cellular signaling pathways and biological processes in both physiological and pathological states such as cancer. We have previously identified miR-135b as a direct regulator of androgen receptor (AR) protein level in prostate cancer (PCa). We wanted to further explore the relationship of miR-135b to hormonal receptors, particularly estrogen receptor α (ER α). Here we show that miR-135b expression inversely correlates with ER α protein in two independent breast cancer (BCa) patient cohorts (101 and 1302 samples) and with AR protein in 47 PCa patient samples. We identify ER α as a novel miR-135b target by demonstrating miR-135b binding to the 3'UTR of the ER α and decreased ER α protein and mRNA level in breast cancer cells upon miR-135b overexpression. miR-135b inhibits proliferation of hormone receptor positive cancer cell lines as shown by overexpression in ER α -positive BCa cells (MCF-7) and AR-positive PCa cells (LNCaP, 22Rv1) when grown in 2D. To identify other genes regulated by miR-135b we performed gene expression studies and found a potential link to the

2. Analisis diferensial ekspresi gen menggunakan fitur GEO2R

Analisis diferensial ekspresi gen dilakukan menggunakan fitur GEO2R yang tersedia pada platform GEO. GEO2R menggunakan paket statistik limma (Linear Models for Microarray Data) dalam lingkungan R untuk menghitung perubahan ekspresi gen antar kelompok. Analisis dilakukan dengan membandingkan masing-masing kelompok perlakuan (12 jam, 24 jam, dan 36 jam) terhadap kelompok kontrol. Koreksi terhadap multiple testing diterapkan menggunakan metode Benjamini–Hochberg untuk memperoleh adjusted p-value (False Discovery Rate/FDR). Kriteria gen yang dianggap sebagai Differentially Expressed Genes (DEGs) ditetapkan sebagai adjusted p-value < 0,05 dan nilai absolut log₂ fold change ($|log_2FC| \geq 1$) yang setara dengan perubahan ekspresi minimal dua kali lipat. Hasil analisis kemudian diurutkan berdasarkan adjusted p-value terkecil untuk mengidentifikasi gen yang paling signifikan secara statistik.

Kelompok :

Transfection (transfeksi) adalah proses memasukkan materi genetik (DNA atau RNA) ke dalam sel eukariotik secara buatan menggunakan metode kimia, fisik, atau biologis.

- Transfected with pre-miR construct for miR-135b at 20 nM dengan waktu inkubasi 12 jam
- Transfected with pre-miR construct for miR-135b at 20 nM dengan waktu inkubasi 24 jam
- Transfected with pre-miR construct for miR-135b at 20 nM dengan waktu inkubasi 36 jam
- Kontrol negatif (sudah diinkubasi pada saat 12, 14, 36 jam)

The screenshot shows the GEO2R interface on the NCBI website. At the top, there are links for GEO Publications, FAQ, MIAME, Email GEO, and Login. Below the header, a message says "Use GEO2R to compare two or more groups of Samples in order to identify genes that are differentially expressed across experimental conditions. Results are presented as a table of genes ordered by significance." It includes links for "Full instructions" and "YouTube". A search bar shows "GSE57820" and a "Set" button. Below the search bar, tabs for "GEO2R", "Options", "Profile graph", and "R script" are visible. The main area has a heading "Quick start" with a list of steps:

- Specify a GEO Series accession and a Platform if prompted.
- Click 'Define groups' and enter names for the groups of Samples you plan to compare, e.g., test and control.
- Assign Samples to each group. Highlight Sample rows then click the group name to assign those Samples to the group. Use the Sample metadata (title, source and characteristics) columns to help determine which Samples belong to which group.
- Click 'Analyze' to perform the calculation with default settings.
- You may change settings in the Options tab.

Below this, a "How to use" section and an "Analyze" button are shown.

The screenshot shows the GEO2R web application interface. At the top, there are links for NCBI, GEO Publications, FAQ, MIAME, Email GEO, and Log in. Below the header, a brief description of GEO2R is provided: "Use GEO2R to compare two or more groups of Samples in order to identify genes that are differentially expressed across experimental conditions. Results are presented as a table of genes ordered by significance." There are also "Full Instructions" and "YouTube" links.

The main search bar contains "GEO accession GSE57820 Set". Below it, a navigation bar includes "GEO2R", "Options", "Profile graph", and "R script".

A "Quick start" section provides a list of steps:

- Specify a GEO Series accession and a Platform if prompted.
- Click 'Define groups' and enter names for the groups of Samples you plan to compare, e.g., test and control.
- Assign Samples to each group. Highlight Sample rows then click the group name to assign those Samples to the group. Use the Sample metadata (title, source and characteristics) columns to help determine which Samples belong to which group.
- Click 'Analyze' to perform the calculation with default settings.
- You may change settings in the Options tab.

A "How to use" link is available, and a prominent green "Analyze" button is at the bottom left.

The main content area displays a table titled "Samples" with 12 rows selected out of 12 total. The table has columns for Group, Accession, Title, Source name, Cell line, Characteristics, Cell type, and Cell line origin. The data is as follows:

Group	Accession	Title	Source name	Cell line	Characteristics	Cell type	Cell line origin
Setelah 12 jam	GSM1394594	LNCaP_miR-135b_12h_B1	LNCaP_miR-135b_12h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Setelah 12 jam	GSM1394595	LNCaP_miR-135b_12h_B2	LNCaP_miR-135b_12h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Setelah 24 jam	GSM1394596	LNCaP_miR-135b_24h_B1	LNCaP_miR-135b_24h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Setelah 24 jam	GSM1394597	LNCaP_miR-135b_24h_B2	LNCaP_miR-135b_24h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Setelah 36 jam	GSM1394598	LNCaP_miR-135b_36h_B1	LNCaP_miR-135b_36h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Setelah 36 jam	GSM1394599	LNCaP_miR-135b_36h_B2	LNCaP_miR-135b_36h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394600	LNCaP_Scr_12h_B1	LNCaP_Scr_12h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394601	LNCaP_Scr_12h_B2	LNCaP_Scr_12h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394602	LNCaP_Scr_24h_B1	LNCaP_Scr_24h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394603	LNCaP_Scr_24h_B2	LNCaP_Scr_24h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394604	LNCaP_Scr_36h_B1	LNCaP_Scr_36h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate
Kontrol	GSM1394605	LNCaP_Scr_36h_B2	LNCaP_Scr_36h	LNCaP	dsmz cat. #: ACC 256	Prostate carcinoma	Left supraclavicular lymph node metastasis from a 50-year-old man with prostate

3. Visualisasi data

Visualisasi data meliputi volcano plot untuk menggambarkan hubungan antara signifikansi statistik dan besar perubahan ekspresi, MA plot (*mean-difference plot*) untuk menilai distribusi log fold change terhadap rata-rata ekspresi gen, UMAP untuk melihat pola pengelompokan sampel secara global, serta histogram adjusted p-value untuk mengevaluasi distribusi signifikansi gen secara keseluruhan.

C. Hasil dan Interpretasi

Hasil analisis diferensial menunjukkan bahwa overekspresi miR-135b menyebabkan perubahan ekspresi gen yang signifikan pada sel LNCaP. Jumlah gen terdiferensiasi meningkat secara bertahap seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Pada perbandingan 36 jam versus kontrol, jumlah DEGs yang teridentifikasi merupakan yang terbanyak dibandingkan dengan 12 dan 24 jam, menunjukkan bahwa efek biologis miR-135b bersifat time-dependent dan semakin kuat seiring waktu.

Hasil	Interpretasi (NCBI, n.d)
	<p>Volcano plot memperlihatkan distribusi gen berdasarkan log₂ fold change pada sumbu horizontal dan -log₁₀(p-value) pada sumbu vertikal. Gen yang berada di sisi kanan dengan nilai log₂FC positif menunjukkan <i>upregulation</i> akibat overekspresi miR-135b, sedangkan gen di sisi kiri dengan log₂FC negatif menunjukkan <i>downregulation</i>. Titik-titik yang berada pada bagian atas grafik memiliki nilai signifikansi statistik yang lebih tinggi. Pada waktu 36 jam, terlihat akumulasi gen dengan perubahan ekspresi yang lebih besar dan signifikan, baik yang meningkat maupun menurun.</p>
	<p>Mean Difference (MD) Plot menunjukkan bahwa sebagian besar gen terdistribusi di sekitar garis logFC = 0, menandakan bahwa mayoritas gen tidak mengalami perubahan signifikan. Namun, sejumlah gen menyimpang jauh dari garis tengah, mencerminkan perubahan ekspresi yang bermakna secara biologis. Distribusi yang relatif simetris antara gen upregulated dan downregulated menunjukkan tidak adanya bias sistematis dalam data.</p>
	<p>Analisis UMAP menunjukkan pemisahan klaster yang jelas antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, khususnya pada 36 jam. Sampel kontrol membentuk klaster tersendiri, sedangkan sampel perlakuan menunjukkan pengelompokan yang berbeda sesuai durasi inkubasi. Hal ini mengindikasikan bahwa overekspresi miR-135b mengubah profil ekspresi gen secara global dan konsisten antar replikasi biologis.</p>

GSE57820: limma, Padj<0.05

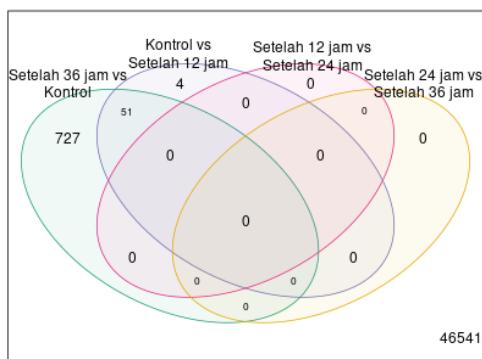
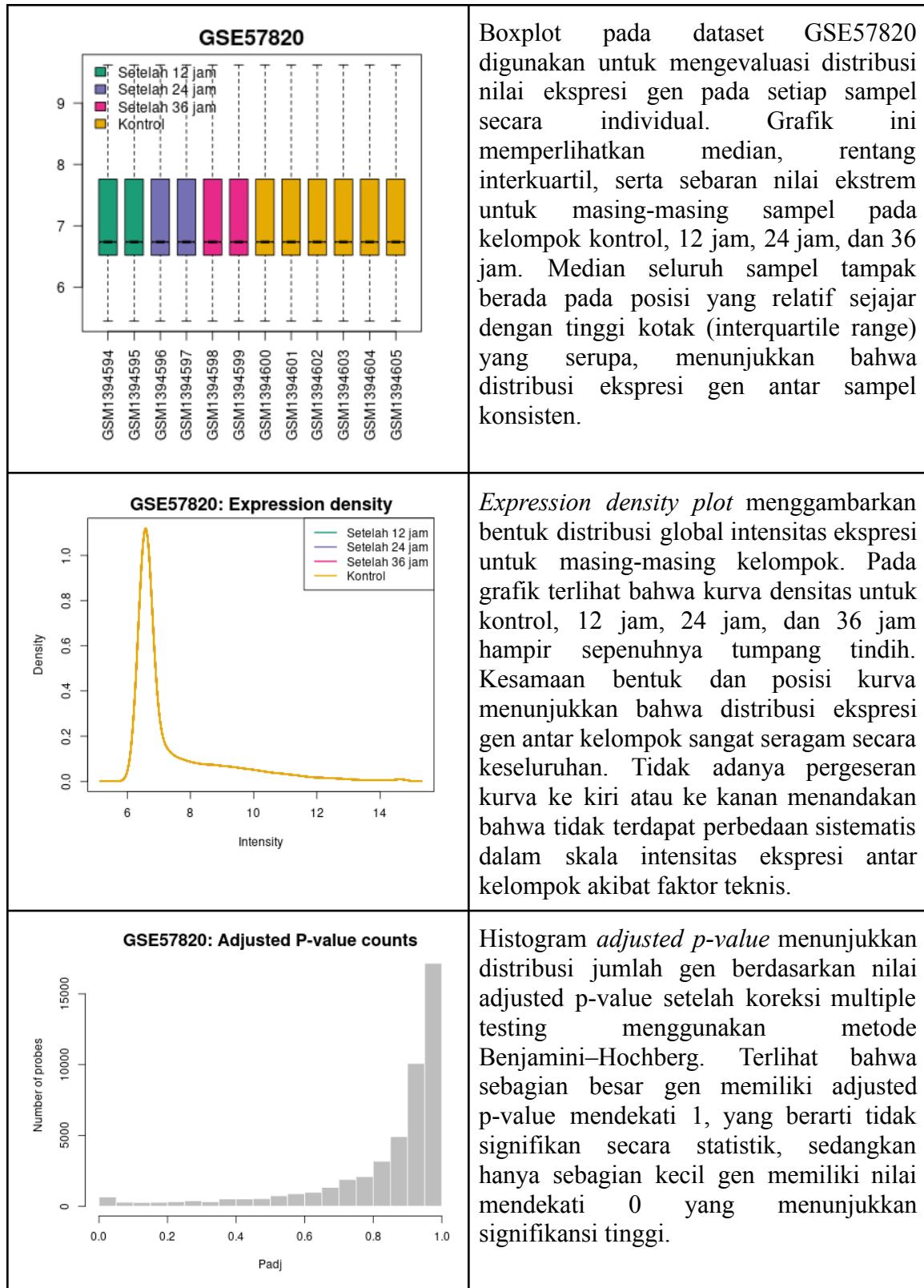


Diagram Venn pada analisis GSE57820 (limma, adjusted p-value < 0,05) menunjukkan distribusi gen yang terdiferensiasi secara signifikan pada berbagai perbandingan waktu setelah overekspresi miR-135b. Terlihat bahwa perbandingan 36 jam versus kontrol memiliki jumlah gen signifikan paling besar, yaitu 727 gen, yang sebagian besar bersifat unik pada kondisi tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa efek biologis miR-135b menjadi paling kuat dan luas setelah 36 jam inkubasi. Sebaliknya, perbandingan pada waktu yang lebih awal, seperti 12 jam dan 24 jam, menunjukkan jumlah gen signifikan yang jauh lebih sedikit. Overlap antar kelompok relatif minimal, hanya sejumlah kecil gen yang sama-sama signifikan antara 36 jam dan 12 jam (sekitar 51 gen), sedangkan irisan antar kombinasi waktu lainnya hampir tidak ada. Mayoritas gen lainnya (sekitar 46.541 gen) tidak menunjukkan perubahan signifikan pada seluruh perbandingan.

Pada fase awal (12 dan 24 jam), perubahan ekspresi gen masih terbatas, kemungkinan karena proses regulasi miRNA yang melibatkan pengikatan ke mRNA target dan penekanan translasi atau degradasi. Pada 36 jam, efek tersebut menjadi lebih nyata dan melibatkan lebih banyak gen, yang menunjukkan aktivasi atau supresi jalur molekuler secara lebih luas.



D. Pembahasan

Hasil analisis ekspresi gen pada dataset GSE57820 menunjukkan bahwa overekspresi miR-135b pada sel kanker prostat LNCaP memicu perubahan transkriptom bergantung pada waktu inkubasi. Volcano plot memperlihatkan bahwa pada 36 jam terjadi peningkatan jumlah gen dengan log₂ fold change besar dan signifikansi statistik tinggi, baik yang mengalami *upregulation* maupun *downregulation*. Hal ini menunjukkan bahwa efek regulasi miR-135b tidak hanya terbatas pada sejumlah kecil target primer, tetapi berkembang menjadi respons molekuler yang lebih luas seiring waktu. Pada 12 dan 24 jam, perubahan ekspresi relatif lebih sedikit, yang mengindikasikan bahwa efek miRNA membutuhkan waktu untuk menghasilkan konsekuensi biologis yang signifikan pada tingkat transkripsi (Grigore *et al.*, 2024).

Hasil tersebut diperkuat oleh Mean Difference (MD) plot yang menunjukkan bahwa sebagian besar gen memang berada di sekitar garis $\text{logFC} = 0$, menandakan bahwa hanya sebagian kecil gen yang terdiferensiasi. Distribusi yang relatif simetris antara gen upregulated dan downregulated menunjukkan bahwa perubahan ekspresi terjadi secara seimbang dan tidak menunjukkan bias teknis dalam data. Analisis UMAP semakin memperjelas bahwa perubahan yang terjadi bersifat global dan konsisten. Pemisahan klaster yang jelas antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, terutama pada 36 jam, menunjukkan bahwa profil ekspresi gen secara keseluruhan mengalami pergeseran yang nyata akibat overekspresi miR-135b. Sampel-sampel dalam kelompok yang sama mengelompok bersama juga menunjukkan konsistensi sehingga meningkatkan validitas hasil penelitian (NCBI, n.d.)

Diagram Venn memberikan gambaran kuantitatif mengenai dinamika perubahan tersebut. Jumlah gen signifikan paling banyak ditemukan pada perbandingan 36 jam versus kontrol (727 gen), dengan sebagian besar bersifat unik pada waktu tersebut. *Overlap* yang minimal antara waktu 12, 24, dan 36 jam menunjukkan bahwa regulasi gen oleh miR-135b bersifat dinamis dan melibatkan efek bertahap, dimana target awal memicu perubahan sekunder pada jalur regulasi lainnya. Validasi kualitas data melalui boxplot dan density plot menunjukkan bahwa distribusi ekspresi gen antar sampel dan antar kelompok sangat seragam, dengan median dan bentuk kurva distribusi yang hampir identik. Hal ini mengindikasikan bahwa proses normalisasi berjalan dengan baik dan tidak terdapat variasi teknis yang signifikan. Selain itu, histogram adjusted p-value menunjukkan distribusi yang wajar, dimana mayoritas gen tidak signifikan dan hanya sebagian kecil gen memiliki adjusted p-value rendah. Pola ini konsisten dengan karakteristik umum studi ekspresi gen skala besar (NCBI, n.d.).

E. Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa overekspresi miR-135b secara signifikan mempengaruhi profil ekspresi gen pada sel kanker prostat LNCaP dengan pola yang bersifat *time-dependent*. Jumlah gen yang mengalami diferensiasi ekspresi meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi, dengan efek paling kuat terdeteksi pada 36 jam setelah transfeksi, dimana ditemukan jumlah DEGs terbanyak dan perubahan ekspresi yang lebih luas. Analisis statistik dan visualisasi secara konsisten menunjukkan bahwa miR-135b tidak hanya mengatur sejumlah kecil target langsung, tetapi juga memicu perubahan transkriptom yang lebih global melalui mekanisme regulasi bertahap. Validasi kualitas data melalui boxplot, density plot, dan distribusi adjusted p-value memastikan bahwa hasil yang diperoleh bukan merupakan artefak teknis, melainkan mencerminkan respons biologis yang nyata.

DAFTAR PUSTAKA

- Grigore, I. A., Rajagopal, A., Chow, J. T.-S., Stone, T. J., & Salmena, L. (2024). Discovery of miRNA–mRNA regulatory networks in glioblastoma reveals novel insights into tumor microenvironment remodeling. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78337-y>
- NCBI. (n.d.). About GEO2R - GEO - NCBI. [Www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/geo2r.html#vooma>
- Zhang, J., You, Q., Wang, Y., & Ji, J. (2024). LncRNA GAS5 Modulates the Progression of Glioma Through Repressing miR-135b-5p and Upregulating APC. *Biologics: Targets and Therapy*, Volume 18, 129–142. <https://doi.org/10.2147/btt.s454058>