

TINJAUAN

MicroRNA dalam metabolisme

S.Vinenberg,¹J.Geiger,²S. Madsen¹ dan LT Dalgaard²

¹ Pusat Penelitian Metabolisme Dasar, Fakultas Kesehatan, Universitas Kopenhagen, Kopenhagen, Denmark 2
Departemen Sains dan Lingkungan, Universitas Roskilde, Roskilde, Denmark

Diterima 11 Januari 2016,
revisi diminta 6 Februari
2016,
revisi diterima 11 Maret 2016,
diterima 21 Maret 2016
Korespondensi: LT Dalgaard,
PhD, Associate Professor,
Departemen Sains dan
Lingkungan, Universitas Roskilde,
Universitetsvej 1, Bldg. 28A1,
DK-4000 Roskilde, Denmark.
Email: ltd@ruc.dk

Abstrak

MicroRNAs (miRNAs) dalam dekade terakhir telah muncul sebagai pengatur utama homeostasis metabolik. Jaringan utama dalam metabolisme perantara penting selama perkembangan sindrom metabolik, seperti: B-sel, hati, otot rangka dan jantung serta jaringan adiposa, semuanya telah terbukti dipengaruhi oleh miRNA. Di pankreas B-sel, sejumlah miRNA penting dalam menjaga keseimbangan antara diferensiasi dan proliferasi (keluarga miR-200 dan miR-29) dan eksositosis insulin dalam keadaan terdiferensiasi dikendalikan oleh miR-7, miR-375 dan miR-335. MiR-33a dan MiR-33b memainkan peran penting dalam metabolisme kolesterol dan lipid, sedangkan miR-103 dan miR-107 mengatur sensitivitas insulin hati. Dalam jaringan otot, sejumlah miRNA yang ditentukan (miR-1, miR-133, miR-206) mengontrol sakelar tipe myofibre dan menginduksi program diferensiasi miogenik. Demikian pula, dalam jaringan adiposa, sejumlah miRNA yang ditentukan mengontrol konversi atau diferensiasi adiposit putih menjadi coklat (miR-365, miR-133, miR-455). Penemuan miRNA yang bersirkulasi dalam eksosom menekankan pentingnya mereka sebagai molekul pensinyalan endokrin dan penanda penyakit yang berpotensi. Disregulasi mereka pada penyakit metabolik, seperti obesitas, diabetes tipe 2 dan aterosklerosis menekankan potensi mereka sebagai target terapi. Ulasan ini menekankan ide dan kontroversi terkini dalam penelitian miRNA dalam metabolisme.

Kata kunci adiposit, metabolisme, microRNA, hepatosteatos non-alkohol, diabetes mellitus tipe 2, B-sel.

Selama 50 tahun terakhir, istilah 'gen' telah identik dengan daerah genom yang mengkode mRNA yang diterjemahkan menjadi protein. Namun, ledakan pengurutan genom skala besar dekade terakhir telah mengungkapkan bahwa bertentangan dengan harapan awal bahwa organisme yang lebih kompleks akan memiliki jumlah gen yang lebih banyak, sekarang jelas bahwa manusia dan tikus memiliki jumlah gen penyandi protein yang sama dengan cacing bulat *C. elegans*. Penjelasan yang mungkin untuk paradoks ini berasal dari wawasan bahwa kompleksitas biologis umumnya berkorelasi dengan proporsi genom yang bukan pengkode protein (Taft dkk. 2007). Sebagian besar non-protein-

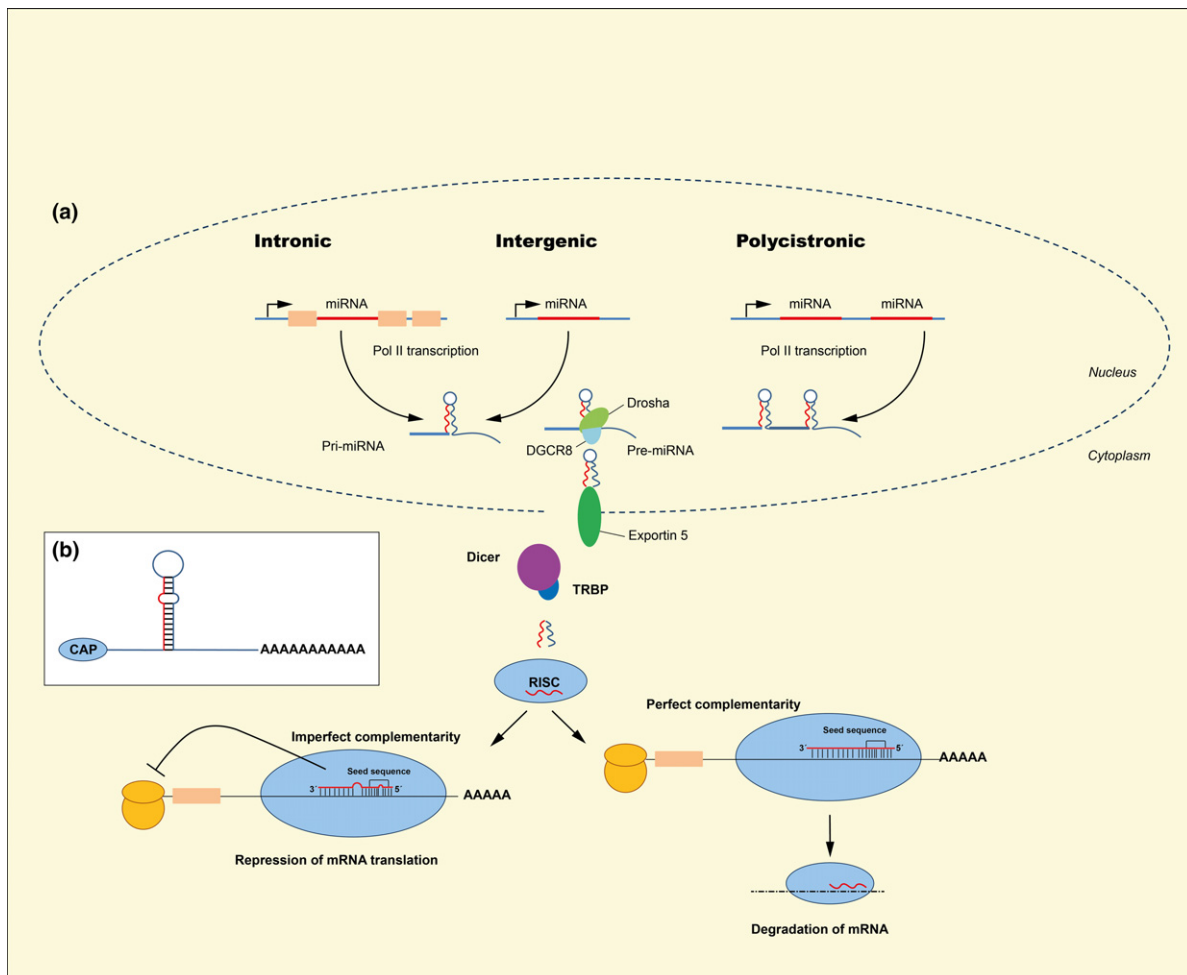
daerah pengkodean ditranskripsi menjadi RNA non-coding panjang atau RNA non-coding kecil, yang mengatur regulasi ekspresi protein baik pada tingkat transkripsi maupun translasi. Sebuah kelas RNA kecil non-coding disebut microRNAs (miRNAs) ditemukan pada tahun 1993 oleh Lee, Feinbaum dan Ambros (Leedkk. 1993). MiRNA terdiri dari kira-kira 22 nukleotida dan mengatur ekspresi gen dengan mengikat situs komplementer mereka dalam 3'-daerah yang belum diterjemahkan (3'UTR) dari mRNA target (Lagos-Quintana dkk. 2001) menghasilkan represi translasi mRNA atau degradasi transkrip. Tingkat komplementaritas pasangan basa miRNA target menentukan

nasib transkrip target. Komplementaritas sempurna mengarah pada pembelahan dan degradasi target. Sebaliknya, komplementaritas yang tidak sempurna memicu pembungkaman mRNA dengan mekanisme berbeda yang mungkin melibatkan represi translasi, degradasi mRNA yang tidak bergantung pada alat pengiris dan/atau sekuestrasi dalam badan pemrosesan sitoplasma (Roberts 2015) (Gbr. 1).

Setiap miRNA mungkin memiliki ratusan target mRNA, serta satu mRNA tunggal dapat diatur oleh beberapa miRNA berbeda yang menambah lapisan kompleksitas ekspresi protein. MiRNA dikodekan di berbagai wilayah genom termasuk non-coding

daerah (intronik atau intergenik) serta pengkodean protein (dalam ekson). Biogenesis kanonik dari miRNA fungsional yang matang melibatkan beberapa langkah pemrosesan, yang dijelaskan pada Gambar 1. Setiap langkah pemrosesan berisi lapisan regulasi lain dan karenanya menambah kompleksitas ekspresi gen.

Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk menyoroti kemajuan dan tantangan baru-baru ini dalam penelitian miRNA dalam metabolisme dan penyakit metabolik, dengan penekanan khusus pada jaringan dan tipe sel tertentu dan utama yang penting untuk pengembangan sindrom metabolik, obesitas, dan diabetes tipe 2: B-sel, hati, tulang dan



Gambar 1 Jalur biogenesis miRNA kanonik (a) dan rata-rata prekursor miRNA (b). (a): Gen miRNA terletak di intronik, intergenik, atau polisistronik. MiRNA primer (Pri-miRNA) ditranskripsi oleh polimerase II (atau polimerase III). Pri-miRNA dibelah oleh kompleks mikroprosesor Drosha-DGCR8 di dalam nukleus. Prekursor miRNA (pre-miRNA) diangkut keluar dalam sitoplasma oleh Exportin 5. Dalam sitoplasma, pre-miRNA selanjutnya dibelah hingga panjang matangnya (sekitar 22 nt) oleh RNase III Dicer dalam kompleks dengan double- TRBP protein pengikat RNA terdampar. Protein argonaute (AGO2) melepaskan dupleks miRNA dan memfasilitasi penggabungan untai pemandu (merah) ke dalam kompleks pembungkaman yang diinduksi RNA (RISC). AGO2 kemudian memandu perakitan miRNA RISC untuk menargetkan mRNA, sedangkan untai penumpang (biru) terdegradasi. Beberapa miRNA mengikat mRNA dengan komplementaritas sempurna dan menginduksi degradasi mRNA. miRNA juga mengikat target dengan komplementaritas yang tidak sempurna dan memblokir terjemahan. (b): Rata-rata prekursor miRNA dengan batang jepit rambut dari 33 pasangan basa, loop terminal dan dua wilayah mengapit, di mana 5' ujungnya ditutup dan poliadenilasi 3' akhir.

otot jantung dan jaringan adiposa. Meskipun crosstalk organ ke organ sangat berdampak pada metabolisme, itu bukan ruang lingkup ulasan ini. Selain itu, kami juga menjelaskan kemajuan terkini dalam pengembangan terapi dan biomarker miRNA, serta tantangan dalam kuantifikasi miRNA.

Pulau-pulau pankreas dan B-sel

Pulau Langerhans merupakan simpul kontrol penting untuk mempertahankan normoglikemia, jika cukup B-sekresi insulin sel diperlukan untuk pengambilan glukosa perifer yang tepat, dan A-sekresi glukagon sel penting untuk produksi glukosa hati. Pentingnya B-sel untuk homeostasis glukosa digarisbawahi oleh pengamatan bahwa diabetes mellitus tipe 2 hanya berkembang dalam konteks B-kegagalan sel. Selain itu, studi genetik mengungkapkan bahwa di antara lebih dari 75 lokus genetik yang terkait dengan diabetes tipe 2, proporsi terbesar menyimpan transkrip penting untuk B-fungsi sel atau proliferasi (Rutter 2014).

Tingkat ekspresi atau fungsi gen diatur pada banyak tingkatan, dan jaringan miRNA merupakan titik kontrol untuk integrasi faktor lingkungan dan genetik yang mempengaruhi respons fisiologis organisme. B-sel. Secara umum, sebagian besar studi genetika dengan mutan miRNA tidak menunjukkan fenotipe yang jelas kecuali hewan tersebut dihadapkan oleh stresor fisiologis. Untuk B-sel, peningkatan stres terjadi misalnya karena beban kerja mereka meningkat karena resistensi insulin perifer, yang dapat mengakibatkan perkembangan menjadi diabetes tipe 2 (Halban dkk. 2014).

Bukti untuk mendukung peran penting miRNA dalam B-sel telah diperoleh dari penghapusan cre-mediated pemain dadu1 dalam garis keturunan pankreas yang berbeda. Pdx1-dimediasi cre pemain dadu1 penghapusan menunjukkan bahwa miRNA yang diekspresikan secara perkembangan penting untuk pulau yang tepat dan B-perkembangan sel (Lynn dkk. 2007) dan keduanya diinduksi dan konstitutif pemain dadu1 penghapusan di B-sel mengakibatkan gangguan sekresi insulin dan diabetes (Kalis dkk. 2011, Melkman-Zehavi dkk. 2011, Martinez-Sanchez dkk. 2015) dengan gangguan sekresi insulin terstimulasi glukosa (GSIS) sebelum perubahan konten insulin atau B-massa sel.

Peran penting lain dari miRNA dianggap melalui represi selektif mRNA, yang ekspresinya merusak fungsi yang benar dari jenis sel tertentu, yang disebut gen 'tidak diizinkan'. Untuk B-sel Slc16a1 (pengangkut piruvat), Lda (laktat dehidrogenase A), Fcgrt1 (reseptor Fc neonatus), Pdfgra (reseptor PDGF, tipe alfa) dan Gandum (ornithine aminotransferase) secara selektif ditekan oleh miRNA, karena mRNA ini ditekan dalam pemain dadu1 pulau KO dan 3'UTR memberikan peningkatan reporter-

aktivitas gen di pemain dadu1 sel pulau yang terkuras (Pullen dkk. 2011, Martinez-Sanchez dkk. 2015). Komponen Argonaute 2 (Ago2) dari kompleks RISC mengontrol kompensasi B-proliferasi sel dan berada di bawah kendali miR-184, yang diatur secara negatif oleh kadar glukosa darah, sehingga memberikan umpan balik sistemik ke B-sel yang mencerminkan resistensi insulin sistemik (Tattikota dkk. 2014, 2015).

Meskipun sangat sedikit miRNA yang spesifik jaringan, sejumlah miRNA dapat ditetapkan sebagai diperkaya dalam jaringan endokrin, neuro-endokrin atau epitel, di mana miR-375 termasuk dalam miRNA yang diperkaya endokrin (10% dari B-microRNA sel adalah miR-375) (Poy dkk. 2004, van de Bunt dkk. 2013), famili miR-7 ke neuro-endokrin, dan famili 200-diekspresikan dalam jaringan epitel tempat asal sel pulau. Fenotipe KO global miR-375 (KO) (Poy dkk. 2009) menunjukkan hiperglikemia progresif dengan jumlah yang lebih rendah B-sel dan gangguan kompensasi B-proliferasi sel serta efek pada Na⁺ properti inaktivasi saluran (Salunkhe dkk. 2015a). Jadi, kekurangan miR-375 adaptasi sel terhadap stres dan resistensi insulin menyerupai fenokopi pemain dadu1-KO B-sel (Lynn dkk. 2007). Sebaliknya, spesifik B-ekspresi ulang sel miR-375 pada tikus KO menormalkan toleransi glukosa. Meskipun miR-375 adalah miRNA yang paling banyak diekspresikan di pankreas B-sel, dalam kondisi fisiologis normal, hanya 1% miR-375 plasma yang berasal dari B-sel, yang hanya berlipat ganda setelah diabetes yang diinduksi streptozotocin (Latreille dkk. 2015). Dengan demikian, temuan ini menantang penggunaan miR-375 sebagai biomarker yang beredar untuk B-cedera sel (Erner dkk. 2013).

Sedangkan ekspresi miR-375 diperlukan untuk benar B-fungsi dan proliferasi sel, penghapusan yang ditargetkan dari tampilan anggota keluarga miR-7 atau miR-200 ditingkatkan B-fungsi sel pada tikus yang diberi diet normal yang menunjukkan bahwa peran miRNA ini secara konstitutif menekan B-fungsi sel (Latreille dkk. 2014, Belgia dkk. 2015). Bersyarat B-sel KO dari ketiga miRNA dari keluarga miR-7 secara istimewa mengubah kelimpahan protein sinaptik yang terlibat dalam eksositosis, di mana de-represi gen target diamati dan eksositosis insulin meningkat (Latreille dkk. 2014). Apakah keluarga miR-7 diatur dengan cara yang sama di jaringan lain dengan tingkat eksositosis tinggi masih perlu diperiksa. Keluarga miR-200 terdiri dari kluster miR-200a/141 dan miR-200b/miR-200c/miR-429. MiRNA ini umumnya disregulasi pada kanker, tetapi miRNA yang termasuk dalam subfamili ini juga sangat melimpah di B-sel dan jumlah hingga 2/3 dari semua miRNA di B-sel. Mereka diturunkan dengan diet tinggi lemak dan diregulasi pada db/db diabetes (latar belakang BKS) sekitar tiga kali lipat. Lebih jauh-

lebih, ekspresi paksa dari cluster miR-141/200a hanya dengan lima kali lipat B-sel mengakibatkan diabetes terbuka dan kematian tikus berikutnya dan disertai dengan B-apoptosis sel (Belgardt dkk. 2015). KO ganda dari kluster miR-141/200a dan 200b/c/429 melindungi dari B-sel ER-stres dalam model tikus Akita, yang sebagai salah lipat insulin, serta di kedua beberapa streptozotocin dosis rendah dan streptozotocin dosis tunggal diinduksi B-kerusakan sel. NSB-perlindungan sel dimediasi melalui regulasi Tp53 aktivitas. Dengan demikian, dua keluarga besar miRNA secara negatif mengontrol B-fungsi sel dan kelangsungan hidup. Orang bisa bertanya mengapa pankreas B-sel berada di bawah kontrol negatif yang berat. Dalam pengaturan akses terbatas ke nutrisi, memiliki produksi dan sekresi insulin yang berlebihan akan merugikan individu karena risiko hipoglikemia. Akibatnya, akan ada tekanan selektif yang tinggi untuk mengembangkan mekanisme menjaga B-sel di bawah kendali.

Namun, lingkungan di mana sebagian besar subjek terpapar bukanlah lingkungan kelaparan, melainkan lingkungan pesta. Oleh karena itu, penting untuk belajar B-kegagalan sel pada diabetes mellitus tipe 2 dan dampak lingkungan pada respon pulau dan gangguan sekresi insulin. Eksositososis insulin adalah fitur yang sangat khusus dari B-sel. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa varian gen terkait diabetes, tetapi ekspresi gen eksositososis telah terbukti berkurang pulau dari pasien dengan diabetes tipe 2, yang bukan karena variasi genetik di sekitar gen ini. Variasi epigenetik, seperti metilasi DNA (Dayehdkk. 2014) atau miRNA, dapat memediasi beberapa perubahan ekspresi. Dalam upaya untuk mengidentifikasi miRNA yang terlibat dalam B-dekompensasi sel, pulau diisolasi dari tikus Goto Kakizaki (GK), model diabetes tipe 2 dengan B-disfungsi sel. miR-335, miR-152 dan miR-130a/b ditemukan meningkat (Esguerradkk.2011) dan analisis komputasi menunjukkan bahwa miR-335 menargetkan transkrip yang mengkode protein eksositososis (Stxbp1, Syt11, Snap25). Selain itu, ekspresi berlebih miR-335 menyebabkan penurunan GSIS serta penurunan eksositososis insulin yang diinduksi depolarisasi (Salunkhedkk. 2015b). Selain itu, garis sel sekretor insulin yang buruk INS-832/2 telah meningkatkan kadar miR-152 dan miR-130a/b dibandingkan dengan sel INS-832/13, yang mempertahankan GSIS tinggi (Hohmeierdkk. 2000, Ofori dkk. 2014). Sejalan dengan ini, knockdown miR-152 menyebabkan peningkatan GSIS, sedangkan ekspresi berlebih merusak GSIS dalam sel INS-832/13, dengan penurunan konten insulin secara bersamaan (Oforidkk. 2014). Selain itu, miR-187 terbukti meningkat pada pulau diabetes tipe 2 manusia, berkorelasi negatif dengan GSIS di pulau dari donor normoglikemik, dan ekspresi paksa di pulau tikus dan sel INS-1 mengurangi GSIS (Lockedkk. 2014). Dengan demikian, banyak miRNA

berpartisipasi dalam dan mengontrol eksositososis insulin, disregulasi di pulau diabetes tipe 2 dan merupakan simpul alami dalam jaringan interaksi seluler yang mengatur eksositososis insulin (Eliasson 2014).

B-sel memiliki tingkat proliferasi yang rendah, yang semakin menurun seiring bertambahnya usia hewan (Wang dkk. 2015b). Namun, dewasa B-sel melepaskan lebih banyak insulin sebagai respons terhadap glukosa daripada B-sel dari hewan muda (Jacovetti dkk. 2015), sehingga menarik untuk dipahami bagaimana a B-sel dapat tetap 'muda' dalam hal kapasitas proliferasi dan 'tua/dewasa' dalam hal sekresi insulin. Ketika pulau anak tikus dari usia 10 hari (D10) dibandingkan dengan pulau dewasa, tingkat proliferasi lebih tinggi dan tingkat GSIS lebih rendah, sementara kandungan insulin tidak berubah. Transisi ditemukan terjadi 2-5 hari setelah penyapihan, dan perubahan nutrisi yang terkait diperkirakan menyebabkan pergeseran antara tingkat proliferasi dan GSIS. Tikus yang disapih sebelum waktunya menunjukkan pergeseran metabolisme dan pematangan yang sama, lebih lanjut menunjukkan bahwa itu adalah perubahan nutrisi yang mendorong pergeseran tersebut. Menariknya, beberapa miRNA diubah di pulau muda vs pulau dewasa. Misalnya, apakah keluarga miR-29, miR-204 dan miR-129 diregulasi, sedangkan cluster miR-17-92, miR-181b dan miR-215 ditekan lebih dari dua kali lipat dari pulau muda (D10) hingga dewasa. Pola ekspresi yang sama terjadi pada anak anjing yang disapih sebelum waktunya. Anehnya, ketika anak anjing diberi makan diet tinggi lemak, transisi ke GSIS tinggi tidak terjadi dan ini dikaitkan dengan profil miRNA imatur yang diperpanjang. Untuk menyelidiki kontribusi miRNA tunggal pada fenotipe ini, pulau-pulau terisolasi D10 dipisahkan menjadi sel-sel pulau tunggal, ditransfeksi menggunakan oligonukleotida antisense yang menargetkan miRNA atau miRNA mimetik dan GSIS dan B-proliferasi sel ditentukan. Dengan menggunakan pendekatan ini, baik kluster miR-17-92 dan miR-181b ditemukan mengatur B-replikasi sel serta GSIS. Menggunakan uji reporter luciferase, kluster miR-17-92 ditunjukkan untuk menargetkan 3'UTR dari Pfkfb3 (fosfofruktokinase, trombosit), Tgfb2 (mengubah reseptor beta faktor pertumbuhan II) dan Pten (fosfatase dan tensin homolog), sedangkan miR-181b ditargetkan gpd2 (gliserol-3-fosfat dehidrogenase 2), Mdh1 (malat dehidrogenase 1) dan sirt1 (sirtuin 1). Sebagai catatan, kluster miR-17-92 juga merupakan target transkripsi E2F yang diketahui dan mengatur level cMyc pada tipe sel lain (Aguda dkk. 2008). Sepertinya jalur serupa dapat mengontrol penurunan B-proliferasi sel terjadi dengan penyapihan dan pematangan. B-Proliferasi sel menurun seiring bertambahnya usia, yang sebagian disebabkan oleh penurunan jumlah Pdgfra, dimediasi oleh peningkatan penuaan yang disebabkan oleh miR-34a (Tugay dkk. 2015). Dari studi ini, jelas bahwa keadaan gizi, malnutrisi dan program janin mempengaruhi keadaan maturitas bayi B-sel.

Namun, bagaimana ini diterjemahkan ke dalam subyek manusia dan nutrisi manusia, dan misalnya, peran susu formula dibandingkan dengan pemberian ASI tidak diketahui dan perlu ditangani.

Metabolisme hati diatur oleh miRNAs

Hati memainkan peran utama dalam metabolisme energi karena merupakan kontributor utama penyimpanan glukosa absorptif dan pelepasan glukosa pasca-absorpsi, metabolisme asam amino dan merupakan pengatur utama metabolisme lipoprotein. Meskipun fungsi miRNA pertama kali dijelaskan untuk regulasi pengembangan yang tepat dari *C. elegans* (Lee dkk. 1993), beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa miRNA memainkan peran penting untuk mengendalikan homeostasis metabolik. miR-122 adalah miRNA yang paling melimpah di hati dan telah terbukti terlibat dalam kolesterol hati dan metabolisme lipid (Kruetzfeldt dkk. 2005). Dua penelitian telah menunjukkan bahwa antisense yang menargetkan miR-122 menghasilkan penurunan kadar kolesterol plasma yang signifikan (Kruetzfeldt dkk. 2005, Esau dkk. 2006), tetapi efek pada metabolisme kolesterol oleh miR-122 tampaknya tidak langsung, karena target yang tepat dari miRNA khusus ini masih belum jelas (Fernandez-Hernando dkk. 2013). MiRNA lain yang terlibat dalam metabolisme kolesterol hati adalah miR-33 yang berasal dari dua miRNA intronik, miR-33a dan miR-33b, yang dikodekan dalam intron *Srebf2* dan *Srebf1* gen masing-masing (Najafi-Shoushtari dkk. 2010). Kedua miRNA ditranskripsi bersama dengan gen inang mereka dan di bawah regulasi mereka. MiR-33a secara langsung menargetkan pengangkut kolesterol *Abca1* dan *Abcg1*, yang bertanggung jawab atas penghabisan kolesterol dari sel, menunjukkan pentingnya miRNA ini dalam metabolisme kolesterol. Sesuai dengan ini, mouse miR-33a KO telah menunjukkan peningkatan *Abca1* ekspresi dan kadar HDL plasma (Horie dkk. 2010). Data tersebut didukung oleh tiga studi independen yang menggunakan strategi berbeda untuk menghambat miR-33a endogen, yang juga meningkatkan kadar HDL plasma (Marquardt dkk. 2010, Najafi-Shoushtari dkk. 2010, Rayner dkk. 2010). Selain metabolisme kolesterol miR-33b juga telah terbukti terlibat dalam asam lemak β -oksidasi, seperti carnitine palmitoyltransferase (*Cpt1a*) diatur oleh miR-33b. Menariknya, miR-33 juga sangat melimpah di otak (Rayner dkk. 2010), dan sebelumnya telah ditunjukkan bahwa metabolisme kolesterol di otak hewan diabetes memang terganggu (Suzuki dkk. 2010), menunjukkan peran potensial untuk miR-33 dalam metabolisme kolesterol otak.

Dalam upaya untuk secara sistematis mengidentifikasi miRNA yang mengatur metabolisme kolesterol melalui reseptor lipoprotein densitas rendah (LDLR), Goedeked dkk. (2015) mengembangkan layar throughput tinggi untuk

memantau efek miRNA untuk menginduksi serapan lipoprotein densitas rendah (LDL) seluler. Selama pemeriksaan ini, miR-148a ditemukan sebagai kandidat teratas untuk regulasi LDLR. Dan memang, ketika miR-148a ditekan, kadar LDL menurun, sedangkan kadar HDL meningkat, menyoroti potensi terapeutik untuk pengobatan aterosklerosis dan dislipidemia terkait miRNA khusus ini.

Beberapa miRNA lain telah terbukti terlibat dalam metabolisme hati dan homeostasis glukosa. miR-143 (Yordania dkk. 2011), miR-181a (Zhou dkk. 2012), miR-103 dan miR-107 (Trajkovski dkk. 2011) semuanya telah terbukti mempengaruhi sensitivitas insulin hati, dan baru-baru ini, miR-802 telah terbukti meningkat dengan obesitas dan pengurangannya meningkatkan toleransi glukosa dan kerja insulin (Kornfeld dkk. 2013). Dari studi di atas, jelas bahwa miRNA memainkan peran sentral dalam regulasi metabolisme hati dan kemungkinan besar miRNA yang lebih penting secara metabolik akan ditemukan di masa depan dan akan berfungsi sebagai target potensial untuk pengobatan gangguan metabolisme. Namun, menggunakan miRNA sebagai terapi menghadapi banyak tantangan, yang akan dibahas di bagian 'miRNA sebagai terapi'.

MiRNA otot dan jantung

Otot rangka menyumbang lebih dari 40% dari berat badan orang sehat normal dan sejauh ini merupakan organ tubuh terbesar. Selanjutnya, gangguan pembuangan glukosa otot yang distimulasi insulin adalah cacat utama dalam keadaan resisten insulin selama penjepitan hiperinsulinemia-euglikemia (DeFronzo dkk. 1985), menyoroti pentingnya otot rangka dalam homeostasis glukosa. Selain pentingnya mereka dalam homeostasis glukosa seluruh tubuh, otot rangka juga memainkan peran penting dalam penuaan yang sehat, dan pengecilan otot hadir dalam banyak penyakit, seperti sarkopenia, HIV-AIDS, kanker cachexia, gagal ginjal dan tirah baring (Bodine 2013, Polge dkk. 2013), menunjukkan pentingnya pengembangan dan pemeliharaan massa otot. MiRNA telah terbukti diperlukan untuk perkembangan otot yang sesuai, karena tikus knockout *dicer1* otot spesifik telah menandai disregulasi perkembangan otot yang mengakibatkan kematian embrio (O'Rourke dkk. 2007). Selain itu, miRNA terlibat dalam kontrol jenis serat otot (Van Rooij dkk. 2009), yaitu miR-208a, miR-208b dan miR-499, dengan masing-masing miRNA ini dikodekan dalam gen rantai berat myosin (MHC) (McCarthy dkk. 2009) menandakan pentingnya mereka dalam fenotipe otot. Dalam kesepakatan, miR-208b dan miR-499 menurun seiring dengan ekspresi gen MHC masing-masing, berkorelasi terbalik dengan

myostatin pada otot rangka manusia setelah cedera tulang belakang, dan dengan demikian terkait dengan pengaturan massa otot (Boon dkk. 2015). Sejalan dengan ini, perubahan terkait usia pada miR-143 baru-baru ini terbukti memengaruhi regenerasi ototin vitro (Soriano-Arroquiadkk. 2016).

Beberapa miRNA diperkaya dalam otot dan jantung (Sempere dkk. 2004), dan khususnya, miR-1, miR-133 dan miR-206 didefinisikan sebagai miRNA miogenik yang mampu menginduksi diferensiasi otot rangka pada model murine (Chen dkk. 2006, Dey dkk. 2011). Untuk mengatasi jaringan miRNA diferensiasi sel otot rangka manusia, Sjögren dan rekan tampil analisis perjalanan waktu dari hari ke 0 (myoblast) hingga hari ke 10 (myotube) digabungkan dengan analisis microarray untuk mengidentifikasi ekspresi miRNA dan mRNA diferensial (Sjögren dkk. 2015). Mengkonfirmasi data dari sel otot murine, perubahan lipatan terbesar dalam ekspresi miRNA memang diamati untuk miR-1, miR-133a, miR-133b dan miR-206. Mengintegrasikan miRNA dan mRNA yang diekspresikan secara berbeda dalam analisis jaringan menunjuk ke simpul regulasi miRNA yang mengandung gen seperti HEYL, NR4A2, NR4A3, PAX7 dan PHIP. Menariknya, ini semua dijelaskan sebagai pengatur perkembangan dan diferensiasi otot. Selain itu, studi fungsional dengan ekspresi berlebih miR-30b, juga diekspresikan secara berbeda selama diferensiasi otot, menunjukkan bahwa tidak semua dalam silikon target gen yang diprediksi harus diatur oleh manipulasi miRNA khusus ini. Meskipun integrasi miRNA dan mRNA simultan, data ekspresi dengan algoritma prediksi target dan jaringan penelitian ini dengan jelas menunjukkan bahwa deduksi berbasis bioinformatika tidak dapat menggantikan validasi eksperimental fungsi miRNA (Sjögrendkk. 2015). Oleh karena itu, studi fungsional yang digerakkan oleh hipotesis miRNA dan gen target dalam pengembangan otot rangka, serta pengaturan biologis lainnya, masih perlu ditangani.

Dinding otot jantung (miokardium) bertanggung jawab untuk memompa darah melalui paru-paru dan seluruh tubuh, dan jelas penting bahwa otot-otot di jantung mempertahankan aktivitasnya dalam segala kondisi. Peningkatan risiko kematian dini dengan diabetes tipe 2 bukan karena diabetes itu sendiri, tetapi penyakit kardiovaskular dan komorbiditasnya yang mengikuti perkembangan diabetes dan obesitas. Komplikasi mikrovaskular terjadi sebagai gejala sisa jangka panjang dari diabetes tipe 2 yang tidak terkontrol dengan baik dan termasuk retinopati diabetik, neuropati dan gangguan penyembuhan luka serta nefropati. Peran miRNA dan dampaknya pada komplikasi mikrovaskular telah dibahas dengan sangat baik di tempat lain (Mouradkk. 2014, Banerjee & Sen 2015, Bhatt dkk. 2016).

Beberapa miRNA diperkaya di dalam hati (Sempere dkk. 2004), dan tikus KO dicer1 khusus jantung mati muda oleh gagal jantung parah yang terutama ditandai dengan pertumbuhan hipertrofik (Chen dkk. 2008) menunjukkan pentingnya Dicer dalam kontraksi jantung dan menunjukkan bahwa miRNA memainkan peran kunci dalam fungsi jantung yang tepat. Pada manusia, hipertrofi jantung merupakan faktor risiko utama untuk perkembangan gagal jantung dan aritmia yang mematikan (Towbin & Bowles 2002) dan biasanya terkait dengan hipertensi dan komplikasi makrovaskular. Perkembangan hipertrofi jantung terkait dengan reaktivasi yang menyimpang dari program gen embrionik, yang masih belum sepenuhnya dipahami. Namun, diketahui bahwa faktor transkripsi yang berbagi domain helix-loop-helix dasar penting untuk penentuan dan diferensiasi berbagai jenis sel, termasuk kardiomyosit. Dengan elegan, Dirkx dan rekan-rekannya (Dirkxdkk. 2013) menunjukkan bahwa faktor transkripsi seperti itu, H₂ dan puncak saraf turunan menyatakan transkrip (Tangan2) yang diperlukan untuk perkembangan jantung yang tepat (Hutson & Kirby 2007, Snider dkk. 2007), diaktifkan kembali di jantung yang gagal, di mana ia mendorong induksi jaringan gen yang mengendalikan pertumbuhan, pelebaran, dan disfungsi jantung. Menariknya, Tangan2 diekspresikan secara terbalik dengan miR-1, miR-92a, miR-92b dan miR-25 dalam model eksperimental penyakit jantung dan in vivo penghambatan miR-25 mengakibatkan disfungsi jantung di a Tangan2 cara bergantung (Dirkx dkk. 2013). Beberapa miRNA lain telah terbukti terlibat dalam hipertrofi jantung patologis termasuk miR-133 (Caredkk. 2007), miR-199b (Da Costa Martins dkk. 2010) dan miR-378 (Ganesan dkk. 2013) menandakan potensi untuk menargetkan miRNA spesifik dengan terapi berbasis RNA.

MiRNA dalam jaringan adiposa dan diferensiasi adiposit

Pandangan tradisional tentang jaringan adiposa sebagai depot penyimpanan lipid yang tidak aktif secara biologis telah berubah selama 30 tahun terakhir. Sekarang jelas bahwa jaringan adiposa adalah organ endokrin yang sangat responsif yang mempengaruhi homeostasis metabolik dan peradangan (Rosen & Spiegelman 2006). Pentingnya fungsi jaringan adiposa dalam kesehatan dan penyakit diungkapkan oleh berbagai penyakit yang sebelumnya terkait dengan penuaan yang lebih umum di antara individu yang kelebihan berat badan dan obesitas. Penemuan penurunan yang disebabkan oleh usia dalam pemrosesan miRNA, khususnya di jaringan adiposa, menggarisbawahi pentingnya jaringan ini. Kelimpahan enzim pemrosesan kunci, Dicer, berkurang dalam jaringan adiposa putih (inguinal dan perigonadal) dengan penuaan dan diikuti oleh penurunan terkoordinasi dalam tingkat beberapa miRNA,

pengamatan dilestarikan antara tikus, manusia dan nematoda. Pada tikus yang dikenai pembatasan kalori, tingkat Dicer tidak menurun (Moridkk. 2012b). Knockdown of Dicer dalam sel menghasilkan penuaan dini, dan tikus yang kekurangan Dicer di jaringan adiposa mengembangkan hilangnya lemak putih intra-abdominal dan subkutan secara lipodistrofik, resistensi insulin yang parah dan pembesaran dan 'pemutihan' lemak coklat intraskapular (Moridkk. 2012b, 2014), dan miR-365 diidentifikasi sebagai miRNA yang sebagian dapat menjelaskan fenotipe 'pemutih'.

Jaringan adiposa coklat (BAT) memiliki potensi terapeutik yang jelas, dan banyak penelitian menyoroti pentingnya miRNA dalam pembentukan BAT, seperti miR-193b/-365 (Sun dkk. 2011, Feuermann dkk. 2013), miR-196a (Mori dkk. 2012a), miR-155 (Chendkk. 2013) dan miR-133a/b (Trajkovski dkk. 2012). Baru-baru ini, Zhang dkk. ditunjukkan dengan menggabungkan data microarray miRNA dan mRNA bahwa miR-455 memainkan peran penting dalam adipogenesis coklat. MiR-455, sebuah miRNA yang diinduksi BMP7, menargetkan beberapa regulator adipogenik utama, seperti Necdin dan Runx1t1, yang merupakan penekan adipogenik penting yang membuka program diferensiasi adiposit. Selain itu, miR-455 menargetkan inhibitor faktor 1α yang diinduksi hipoksia (HIF1α), hidroksilase yang biasanya menghambat aktivitas AMPK melalui hidroksilasi, yang mengarah pada aktivasi AMPK. Dengan demikian, miR-455 menekan Necdin dan Runx1t1 untuk memulai program adipogenik dan menekan HIF1α untuk mengaktifkan AMPK yang, pada gilirannya, bertindak sebagai pemicu metabolik untuk menginduksi adipogenesis coklat (Zhang dkk. 2015). Memang menarik untuk mengamati bahwa BAT

miRNA yang diekspresikan sampai tingkat tertentu mencerminkan garis keturunan miogenik sel-sel ini di mana BAT berbagi miRNA fungsional yang penting dengan otot rangka (Tabel 1).

Beberapa penelitian telah membandingkan profil ekspresi miRNA pada jaringan adiposa putih gemuk dan kurus dari tikus dan dari manusia. Dalam sel lemak dari tikus dengan obesitas yang diinduksi diet, 35 dari 574 miRNA yang terdeteksi diekspresikan secara berbeda (Xiedkk. 2009). Skrining microarray jaringan WAT manusia mengidentifikasi sejumlah miRNA yang berpotensi disregulasi pada pasien dengan obesitas, baik pada pasien dengan diabetes mellitus tipe 2 bersamaan dan pada subjek yang toleran glukosa (Heneghandkk. 2011, Keller dkk. 2011). Namun, terbukti sulit untuk memvalidasi miRNA yang dilaporkan dalam kohort lain, serta arah ekspresi miRNA antara kelompok kurus dan gemuk, yang semuanya ditinjau dengan sangat baik di Arner & Kulyte (2015) (Arner & Kulyte 2015). Ini menyoroti tantangan bahwa banyak studi miRNA sulit untuk direproduksi. Sebagai sumber variasi yang mungkin, kita harus mempertimbangkan asal sampel, jenis jaringan atau sel mana yang diperiksa, jenis kelamin subjek uji, dan keadaan penyakit. Selain itu, banyak studi microarray sering kurang bertenaga, yang juga berkontribusi pada hasil yang ambigu (Witwer 2013), belum lagi platform mana yang digunakan untuk mendeteksi miRNA (Mestdag dkk. 2014).

MiRNA sering menegaskan tindakan mereka dalam keluarga dan dengan demikian bekerja dalam jaringan. Arner dkk. (2012) menemukan bahwa 11 miRNA diturunkan regulasinya pada subjek obesitas, yang semuanya menargetkan ekspresi CCL2 (ligan motif CC 2, juga dikenal sebagai MCP1 (makrofag

Tabel 1 MiRNA penting untuk jaringan yang relevan secara metabolik

B-sel	Hati	sk. Otot	Jantung	WA	KELELAWAR
miR-375	miR-122	miR-1	miR-25	miR-365	miR-365
keluarga miR-200	miR-33a/b	miR-206	miR-199a-214	miR-193b	miR-193b
keluarga miR-7	miR-148a	miR-208b	miR-155	miR-126	miR-155
miR-335	miR-143	miR-133a/b		miR-92a	miR-133a/b
miR-152	miR-103/107	miR-499			miR-196a
keluarga miR-29	miR-802	miR-30b			miR-455
miR-181b	miR-181a	miR-143			
miR-184					
miR-187					
miR-204					
miR-17-92					
miR-129					
miR-34a					
miR-215					
miR-130a/b					

MiRNA dalam tabel ini semuanya dikutip dalam teks dan bukan daftar lengkap dari semua miRNA yang terbukti penting untuk fungsi jaringan ini. MiRNA diberikan dengan nomor saja, untuk identitas 5' atau 3' spesies dewasa silakan merujuk ke publikasi asli.

protein kemoatraktan 1) (Arner dkk. 2012). Kemokin CCL2 diduga memicu peradangan pada jaringan adiposa, yang pada gilirannya dapat menjadi pendorong resistensi insulin seluruh tubuh. Juga, diketahui bahwa individu obesitas memiliki peningkatan sekresi CCL2 dibandingkan dengan kontrol ramping (Arner dkk. 2012). Sebuah subnetwork yang melibatkan miR-126, miR-193b dan miR-92a terbukti berhubungan terbalik dengan faktor transkripsi yang mengendalikan peradangan pada jaringan adiposa dan bahwa regulasi miRNA ini memiliki efek aditif pada sekresi CCL2 (Kulytedkk. 2014). Meskipun ada data yang saling bertentangan, terutama dalam konteks WAT dan miRNA, akumulasi data menunjukkan bahwa miRNA adalah modulator sentral dari diferensiasi dan biologi WAT dan BAT normal (Rottiers & Naar 2012).

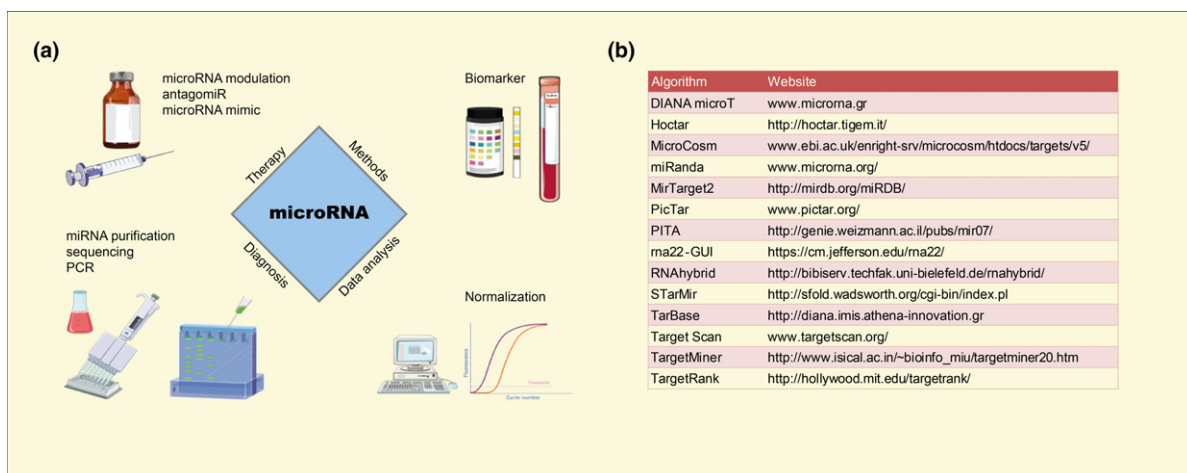
MiRNA sebagai terapi

Pengetahuan yang berkembang tentang miRNA dan aksi molekulernya memunculkan aplikasi industri inovatif untuk kelas molekul ini (Gbr. 2a). Di antara perspektif yang paling menjanjikan adalah penggunaan miRNA dalam terapi medis dan potensinya sebagai biomarker baru (Hayes dkk. 2014). Kedua topik tersebut akan dibahas pada bagian berikut dengan fokus pada tantangan saat ini, strategi solusi yang ada, dan perspektif masa depan.

Mengingat bahwa miRNA terlibat dalam regulasi besarnya proses seluler (Esau dkk. 2006, Tra-

jkovski dkk. 2011, Rottiers & Naar 2012, Dumortier dkk. 2013), tidak mengherankan bahwa pola ekspresi miRNA berubah pada obesitas (Ortega dkk. 2013) dan diabetes (Kong dkk. 2010, Hayes dkk. 2014, Yang dkk. 2014). Secara patofisiologi, miRNA yang diregulasi dapat dimanipulasi oleh analog nukleotida komplementer untuk mengurangi aktivitas efektifnya (Stenvang dkk. 2012). 'AntagomiR' ini sering memiliki arsitektur nukleotida yang dimodifikasi, di mana, misalnya, gugus ribosa asam nukleat telah digantikan oleh analog RNA afinitas tinggi Locked Nucleic Acid™ (LNA™, Exiqon). AntagomiRs mengikat miRNA matang dan prekursor dan dengan demikian secara efektif menghilangkannya dari kumpulan yang tersedia secara biologis (Elmendorf dkk. 2007, Gebert dkk. 2014). Spons miRNA merupakan strategi penghambatan alternatif. Bertindak setelah prinsip yang sama, spons miRNA mengandung beberapa situs pengikatan miRNA dalam urutannya dan dengan demikian bersaing untuk miRNA (Zhang dkk. 2013). Oligo-ribonukleotida yang dimodifikasi dapat digunakan untuk ekspresi berlebih miRNA dan secara paralel dengan inhibitor ini adalah alat yang mudah digunakan untuk memodifikasi level miRNA seluler di in vitro model (Stenvang & Kauppinen 2008, Chen dkk. 2015).

AntagomiR Miravirsin yang menargetkan miR-122 spesifik hati (Roche Innovation Center Copenhagen, sebelumnya Santaris Pharma) menunjukkan kelayakan penghambatan miRNA dan merupakan terjemahan yang menjanjikan dari penelitian microRNA dasar ke dalam konteks terapeutik (Janssen dkk. 2013, Ottosen dkk. 2015). MiR-122 adalah



Gambar 2 (a) Aspek translasi miRNA. Untuk terapi, miRNA dapat digunakan sebagai antagonis (antagomiR) atau agonis (mimik microRNA). Metode khusus, seperti sekuensing generasi berikutnya dari RNA kecil dan susunan miRNA berbasis qPCR digunakan untuk mengidentifikasi kemungkinan biomarker miRNA dari spesimen pasien, tetapi juga dapat digunakan untuk memantau efek terapeutik atau efek samping yang tidak diinginkan oleh pengobatan. Integral dengan penggunaan translasi miRNA ditingkatkan dan strategi analisis data yang konsisten dari hasil qPCR dengan fokus khusus pada penggunaan normalisasi data yang optimal dan identifikasi gen referensi atau miRNA yang tepat. Untuk tujuan ini, teknik dan strategi analisis saat ini perlu disesuaikan dan dioptimalkan. Sosok itu dirakit dengan bantuan Seni Medis Servier (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

diperlukan untuk replikasi virus hepatitis C (HCV) (Jopling dkk. 2005, 2008, Henke dkk. 2008), dan pemberian Miravirsen mampu menekan ekspresi miR-122 dan dengan demikian mencegah replikasi HCV (Jopling dkk. 2005, Ottosen dkk. 2015).

Dalam metabolisme, hanya beberapa inhibitor miRNA yang sedang dikembangkan, salah satunya adalah anti-miR-103/107 RG-125 terkonjugasi N-acetylgalactosamine (GalNAc) (GalNAc) (AZD4076), sedang dikembangkan oleh Regulus Therapeutics dan AstraZeneca untuk pengobatan non-alkoholik steatohepatitis (NASH) pada pasien diabetes tipe 2/pada-diabetes (Regulus Therapeutics 2014, 2015). Pengobatan NASH saat ini dengan thiazolidinediones umumnya disertai dengan penambahan berat badan yang tidak diinginkan (Mussod dkk. 2012), dan ada kebutuhan yang tidak terpenuhi untuk terapi yang lebih baik untuk gangguan ini. Pengobatan dengan RG-125 (AZD4076) didasarkan pada kemampuannya untuk menghambat aktivitas miR-103/107, yang peningkatan regulasi hepatiknya menyebabkan resistensi insulin (Trajkovskid dkk. 2011). Pembungkaman miR-103/107 berbasis antagomiR pada tikus diikuti dengan penurunan kandungan trigliserida hati dan peningkatan sensitivitas insulin. RG-125 (AZD4076) memiliki potensi untuk bertindak sebagai sensitizer insulin yang manjur (Regulus Therapeutics 2015).

RG-125 (AZD4076) dimodifikasi dengan penambahan N-acetylgalactosamine (Regulus Therapeutics 2015), yang menargetkan oligonukleotida secara istimewa ke hepatosit melalui pengikatan ke ASGR1 yang diperkaya hati (asialoglycoprotein receptor 1). Konjugasi ini meningkatkan potensi dan membantu menghindari reaktivitas silang dengan keluarga miRNA serupa seperti miR-15/16, menghindari dua tantangan yang dihadapi agen farmasi berbasis miRNA; pengiriman dan spesifisitas untuk miRNA yang dimaksud. Saat ini, AstraZeneca memulai dosis dalam studi klinis Tahap I pertama pada manusia dari RG-125 (AZD4076) pada akhir 2015.

Terapi berbasis MiRNA menawarkan beberapa keuntungan berbeda dibandingkan terapi diarahkan asam nukleat lainnya: MiR-NA adalah peredam yang efisien dan berbeda dengan DNA plasmid atau oligonukleotida sintesis, miRNA terjadi secara alami dalam aliran darah. Karena mereka menargetkan beberapa mRNA, efek sinergis yang dihasilkan dapat menjadi positif untuk terapi (Chend dkk. 2015) dan meningkatkan hambatan untuk pembentukan perlawanan (Janssen dkk. 2013, Wang dkk. 2015a). Toksisitas rendah dan toleransi yang baik pada pasien yang diobati dengan antagomiR mendukung peran menguntungkan miRNA dalam terapi (Janssen dkk. 2013, Van Der Ree dkk. 2014).

Namun, ada beberapa tantangan penting yang dihadapi perawatan yang dimediasi miRNA: miR-NA yang tidak dimodifikasi terdegradasi dengan cepat (Chen dkk. 2015), menekankan persyaratan untuk turunan atau enkapsulasi yang dimodifikasi secara kimia. Selain itu, aktivasi kekebalan bawaan atau neurotoksisitas potensial dan

efek samping yang penting, dan penghambat miRNA dibatasi dalam tindakan mereka oleh serapan seluler dan penggabungan ke dalam RISC, dan dosis yang tidak tepat dapat menyebabkan penghambatan target yang tidak diinginkan yang menyebabkan efek samping (Lindow dkk. 2012). Saat ini, dua tantangan utama dengan obat berbasis miRNA adalah pengiriman (Wang dkk. 2015a) dan spesifisitas jaringan yang rendah (Kwekkeboom dkk. 2016). Pemberian kandidat obat berbasis miRNA sebagian besar dilakukan dengan cara injeksi baik secara intravena maupun lokal (Obad dkk. 2011, Shu dkk. 2015, Wang dkk. 2015a), tetapi pendekatan alternatif termasuk pemberian oral, formulasi enema diikuti dengan pemberian usus, aplikasi topikal dan pemberian intra-okular (Stenvang & Kauppinen 2008, Kwekkeboom dkk. 2016). Namun demikian, strategi yang lebih baik untuk pengiriman jaringan yang tepat dan efisien diperlukan.

Dengan demikian, pendekatan terapi berbasis miRNA memiliki potensi sebagai alat baru dan inovatif dalam berbagai penyakit, tetapi saat ini hanya ada sedikit pengembangan untuk penyakit metabolik yang kemungkinan besar disebabkan oleh sifat target miRNA yang tidak menentu serta kesulitan untuk mendapatkan spesifisitas jaringan.

Biomarker

MiRNA ditemukan dalam cairan bio, seperti darah, urin, plasma, dan air liur (Javidi dkk. 2014, Arrese dkk. 2015). Meskipun RNA murni rentan terhadap degradasi yang cepat, miRNA dari cairan bio menunjukkan stabilitas yang luar biasa (Mitchell dkk. 2008). Penjelasan umum adalah bahwa miRNA ini terkandung dalam eksosom, yang merupakan vesikel membran kecil berukuran 40–100 nm (Chevillet dkk. 2014), yang mengandung DNA, mRNA dan protein selain miRNA (Band dkk. 2015). Dikelilingi oleh struktur membran seperti itu, miRNA dilindungi dari RNase. Proses sekresi miRNA dalam eksosom sebagian besar masih belum diketahui. Tidak jelas, jaringan mana yang berkontribusi pada sekresi miRNA dan apakah itu hasil dari penyortiran aktif. Lebih jauh lagi, ini merupakan pertanyaan terbuka, apakah miRNA yang disekresikan memiliki fungsi biologis. Tetapi mengingat kelimpahan miRNA yang rendah dalam eksosom, yang mungkin serendah satu salinan per eksosom (Chevillet dkk. 2014), fungsi komunikasi tampaknya tidak mungkin. Selain itu, miRNA dalam cairan bio juga dapat distabilkan melalui pengikatan pada Ago2 atau lipoprotein (Arroyo dkk. 2011).

Terlepas dari masalah yang tidak jelas ini, dijelaskan dengan baik bahwa pola miRNA dari cairan bio berubah dalam kondisi patologis (Mitchell dkk. 2008, Ortega dkk. 2013, Yang dkk. 2014). Tanda tangan MiRNA menjanjikan untuk digunakan dalam tes diagnostik atau prognostik dalam berbagai penyakit, misalnya kanker (Javid dkk. 2014), sindrom ovarium polikistik (Sørensen dkk.

2014) dan penyakit hati (Arrese dkk. 2015) antara lain. Keuntungan menggunakan miRNA sebagai biomarker termasuk sensitivitas deteksi dan kemungkinan analisis multiplexing untuk meningkatkan spesifisitas. Tantangan utama untuk analisis miRNA sebagai biomarker dari cairan bio adalah untuk menetapkan protokol yang kuat dan konsekuen untuk penanganan sampel pra-analitik, ekstraksi dan pengukuran miRNA, yang semuanya penting untuk hasil yang andal (Blondal dkk. 2013). Semua diambil bersama-sama, miRNA dapat digunakan sebagai alat diagnostik, tetapi studi untuk masa depan harus mencakup investigasi kohort berbasis populasi yang besar untuk menetapkan nilai garis dasar dan tingkat antara variasi subjek untuk memungkinkan penggunaan miRNA untuk minimal hingga non-invasif biomarker.

Kuantifikasi miRNA

Meskipun molekul RNA telah dipelajari selama beberapa dekade, adaptasi teknik laboratorium standar untuk penelitian miRNA merupakan tantangan. Sementara teknik isolasi RNA berbasis kolom dan kimia berhasil digunakan untuk isolasi mRNA, ini memiliki keterbatasan terkait dengan miRNA (Trevorl Stokes, 2012, McAlexander dkk. 2013, Moldova dkk. 2014). Untuk analisis level miRNA, dua pendekatan yang umum digunakan adalah platform berdasarkan sequencing dan PCR kuantitatif (qPCR). Selama studi kontrol kualitas miRNA (MiRQC), platform komersial dari 12 penyedia yang berbeda dinilai dan dibandingkan dengan metrik kualitas yang berbeda (Mestdaghd dkk. 2014). Itu diselidiki seberapa baik kinerja platform ketika dihadapkan dengan tantangan seperti diskriminasi antara sekuens miRNA yang sangat mirip atau miRNA yang berlimpah rendah. Ternyata, setiap platform memiliki kekuatan dan kelemahan tertentu. Oleh karena itu, pilihan pendekatan yang optimal sangat bergantung pada pengaturan dan tujuan eksperimental.

Integrasi data ekspresi mRNA dan miRNA berdasarkan analisis mikro-array atau sekuensing generasi berikutnya adalah metode yang mudah digunakan untuk menyelidiki kemungkinan mekanisme pengaturan miRNA. Namun, penting untuk disadari bahwa target miRNA yang ditekan secara istimewa pada tingkat translasi tidak akan terdeteksi menggunakan pendekatan ini. Dengan demikian, menggunakan susunan mRNA untuk mengkaraktirasi regulasi target miRNA kemungkinan akan kehilangan target sebenarnya yang diatur oleh penghambatan translasi, dan oleh karena itu, pendekatan ini lebih cenderung melaporkan temuan negatif palsu. Menggunakan imunopresipitasi Ago2 untuk memperkaya mRNA yang dimasukkan ke dalam RISC, dan dengan demikian ditargetkan oleh miRNA, adalah pendekatan alternatif untuk mengidentifikasi target miRNA yang memungkinkan identifikasi target yang diatur pada tingkat translasi juga.

Analisis, kuantifikasi, dan transparansi data miRNA telah menjadi langkah penting. Tertentu

kekurangannya adalah tidak adanya referensi standar untuk normalisasi. Penggunaan snoRNA, seperti U6, tidak diinginkan, karena stabilitas dan biogenesis yang berbeda dibandingkan dengan miRNA (Vandesompele 2013, Hellemans & Vandesompele 2014). Strategi lain, termasuk normalisasi rata-rata global (Zhao dkk. 2010) atau beberapa gen referensi stabil (Bustin dkk. 2009, Mestdaghd dkk. 2009), harus digunakan. Untuk meningkatkan transparansi analisis, informasi terperinci mengenai urutan dan nama miRNA harus dicatat secara eksplisit dalam publikasi yang dihasilkan (Van Peer dkk. 2014), misalnya menggunakan software miR-tracker (Van Peer dkk. 2014).

Mengidentifikasi mRNA target dari miRNA yang diberikan sangat penting dalam memahami konteks biologis miRNA, namun tetap menjadi masalah yang kompleks. Pasangan basa yang tidak sempurna dari dupleks miRNA-mRNA menantang untuk algoritme perangkat lunak (Witkos dkk. 2011). Akibatnya, sebagian besar algoritma berjuang dengan jumlah hasil positif palsu yang tinggi dan akurasi yang rendah (Ekimler dkk. 2014). Algoritma prediksi saat ini tersedia sebagai alat online (Gbr. 2b) atau kode sumber. Titik awal biasanya adalah 'wilayah benih' dari nukleotida 2–7 miRNA (Mazi-ere & Enright 2007, Vlachos & Hatzigeorgiou 2013, Peterson dkk. 2014), yang digunakan oleh RISC untuk mengikat mRNA oleh pasangan basa Watson-Crick ke miRNA (Saito & Sætrom 2010, Peterson dkk. 2014). Bergantung pada algoritme, fitur lain juga diperhitungkan: lokasi situs pengikatan pada mRNA, konservasi urutan lintas spesies, energi bebas dari dupleks yang terbentuk, aksesibilitas situs pengikatan mRNA, sekitar situs pengenalan miRNA dan ekspresi miRNA profil dalam jaringan yang diselidiki (Saito & Sætrom 2010, Vlachos & Hatzigeorgiou 2013, Ekimler dkk. 2014, Peterson dkk. 2014). Saldo yang berbeda dari fitur ini dapat menyebabkan perbedaan dalam hasil. Sebaiknya, beberapa algoritma dapat digabungkan dalam analisis (Witkos dkk. 2011) diikuti dengan validasi eksperimental. Meskipun metode prediksi target bioinformatika memiliki batasan, metode ini dapat melengkapi pendekatan eksperimental, sehingga menghasilkan identifikasi target miRNA yang lebih efisien. Kesimpulannya, baik analisis dan prediksi target miRNA memberikan tantangan baru untuk laboratorium basah dan kering.

Kesimpulan dan perspektif

Sejumlah besar miRNA telah terlibat dalam berbagai aspek sindrom metabolik dan diabetes mellitus, dan saat ini, tidak ada set miRNA yang mapan atau terpadu yang mencirikan berbagai subfenotipe penyakit metabolik. Namun, sejumlah miRNA tampaknya mempengaruhi fungsi atau keadaan diferensiasi pankreas B-sel, sedangkan miRNA dalam kerangka

otot tal, hati dan jaringan adiposa merupakan set miRNA yang berbeda dan hampir tidak tumpang tindih (Tabel 1). Bidang penelitian miRNA berkembang pesat dengan alat dan model baru yang muncul. Ini akan memungkinkan pengembangan lebih lanjut dari terapi berbasis miRNA untuk pengobatan penyakit metabolik yang kebutuhannya belum terpenuhi di seluruh dunia. Selain itu, melihat dampak regulasi pemrosesan miRNA di jaringan adiposa, akan sangat berguna untuk mengidentifikasi regulator endogen serta molekul kecil dari pemrosesan miRNA dengan potensi penggunaan modifikasi metabolisme jaringan adiposa untuk pengobatan penyakit metabolik.

Kesimpulan umum adalah bahwa dengan banyak penelitian yang kontras mengenai regulasi ekspresi dan fungsi miRNA dalam tipe sel yang berbeda menunjukkan bahwa ada kebutuhan yang tulus untuk penelitian lebih lanjut. Karena banyak miRNA tampaknya memiliki peran dalam modulasi respons stres, sedangkan miRNA dapat diabaikan dalam keadaan tidak terganggu, maka perlu untuk menyelidiki model stres metabolik yang tepat untuk menjelaskan fungsinya. Selain itu, karena miRNA sering ada dalam famili, pendekatan yang semakin penting adalah memodulasi tingkat seluruh famili miRNA atau miR-NA yang terkoregulasi bersama-sama serta secara terpisah untuk menetapkan peran mereka dalam jaringan atau organ yang utuh.

Karya ini, dan Simposium tentang MicroRNAs dalam Metabolisme, dari mana ulasan ini berasal, disponsori oleh Akademi Diabetes Denmark yang didukung oleh Yayasan Novo Nordisk. Kami sangat berterima kasih atas dukungan dari Pembicara yang Diundang dari Simposium ini untuk berbagi pandangan mereka tentang penelitian MicroRNA dalam Metabolisme dan atas komentar konstruktif mereka untuk ulasan ini. Daftar lengkap Pembicara pada Simposium tentang MicroRNAs dalam Metabolisme dapat ditemukan di Lampiran S1. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Lena Eliasson, Romano Regazzi, Marcelo Mori, Brendan Egan, Peter Mouritzen, Bader Zarrouki dan Hongbin Zhang untuk revisi kritis dan komentar konstruktif mereka pada naskah ini. Pendanaan: Pekerjaan ini didukung oleh Akademi Diabetes Denmark yang didukung oleh Yayasan Novo Nordisk, Universitas Roskilde dan FSS,

Konflik kepentingan

JG, SM dan LTD tidak memiliki apa-apa untuk dideklarasikan. SV saat ini bekerja di Novo Nordisk A/S, sebuah perusahaan farmasi yang menjual produk untuk pengobatan diabetes mellitus.

Referensi

Aguda, BD, Kim, Y., Piper-Hunter, MG, Friedman, A. & Marsh, CB 2008. Regulasi MicroRNA dari jaringan kanker: konsekuensi dari loop umpan balik yang melibatkan miR-17-92, E2F, dan Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19678-19683.

Arner, P. & Kulyte, A. 2015. Jaringan regulasi MicroRNA bekerja di jaringan adiposa manusia dan obesitas. *Nat Rev Endocrinol* 11, 276–288.

Arner, E., Mejhert, N., Kulyte, A., Balwiercz, PJ, Pachkov, M., Cormont, M., Lorente-Cebrian, S., Ehrlund, A., Laurencikienė, J., Heden, P. dkk. 2012. Mikro-RNA jaringan adiposa sebagai pengatur produksi CCL2 pada obesitas manusia. *Diabetes* 61, 1986–1993.

Arrese, M., Eguchi, A. & Feldstein, AE 2015. Beredar microRNAs: biomarker penyakit hati yang muncul. *Semin Liver Dis* 35, 43–54.

Arroyo, JD, Chevillet, JR, Kroh, EM, Ruf, IK, Pritchard, CC, Gibson, DF, Mitchell, PS, Bennett, CF, Pogossova-Agadjanyan, EL, Stirewalt, DL, Tait, JF & Tewari, M. 2011. Kompleks Argonaute2 membawa populasi mikroRNA yang bersirkulasi independen dari vesikel dalam plasma manusia. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5003–5008.

Ban, J.-J., Lee, M., Im, W. & Kim, M. 2015. pH rendah meningkatkan hasil isolasi eksosom. *Biochem Biophys Res Commun* 461, 76–79.

Banerjee, J. & Sen, CK 2015. microRNA dan penyembuhan luka. *Adv Exp Med Biol* 888, 291–305.

Belgardt, BF, Ahmed, K., Spranger, M., Latreille, M., Denzler, R., Kondratiuk, N., von Meyenn, F., Villena, FN, Herrmanns, K., Bosco, D., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Rulicke, T. & Stoffel, M 2015. Keluarga microRNA-200 mengatur kelangsungan hidup sel beta pankreas pada diabetes tipe 2. *Nat Med* 21, 619–627.

Bhatt, K., Kato, M. & Natarajan, R. 2016. Ulasan mini: peran yang muncul dari microRNAs dalam patofisiologi penyakit ginjal. *Am J Physiol Renal Physiol* 310, F109–F118.

Pirang, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilm, M. & Dahlsveen, IK 2013. Menilai sampel dan kualitas profil miRNA dalam serum dan plasma atau biofluida lainnya. *Metode* 59, S1–S6.

Bodine, SC 2013. Pengecilan otot yang diinduksi tidak digunakan. *Int J Bio-Kimia Sel Biol* 45, 2200–2208.

Boon, H., Sjogren, RJ, Massart, J., Egan, B., Kostovski, E., Iversen, PO, Hjeltne, N., Chibalin, AV, Widegren, U. & Zierath, JR 2015. MicroRNA-208b semakin menurun setelah cedera tulang belakang pada manusia dan berbanding terbalik dengan ekspresi myostatin. *Perwakilan Fisiol* 3, e12622, doi: 10.14814/phy2.12622.

van de Bunt, M., Gaulton, KJ, Bagian, L., Moran, I., John-putra, PR, Lindgren, CM, Ferrer, J., Gloyn, AL & McCarthy, MI 2013. Profil miRNA pulau pankreas manusia dan sel beta dan hubungannya dengan patogenesis diabetes tipe 2. *PLoS SATU* 8, e55272.

Bustin, SA, Benes, V., Garson, JA, Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, MW, Shipley, GL, Vandesompele, J. & Wittwer, CT 2009. Pedoman MIQE: informasi minimum untuk publikasi kuantitatif real-time PCR eksperimen. *Klin Chem* 55, 611–622.

Perawatan, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, ML, Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, ND dkk. 2007. MicroRNA-133 mengontrol hipertrofi jantung. *Nat Med* 13, 613–618.

Chen, JF, Mandel, EM, Thomson, JM, Wu, Q., Callis, TE, Hammond, SM, Conlon, FL & Wang, DZ 2006.

- Peran microRNA-1 dan microRNA-133 dalam proliferasi dan diferensiasi otot rangka. *Nat Genet* 38,228–233.
- Chen, JF, Murchison, EP, Tang, R., Callis, TE, Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, SM, Schneider, MD, Selzman, CH, Meissner, G., Patterson, C., Hannon, GJ & Wang, DZ 2008. Penghapusan Dicer yang ditargetkan di jantung menyebabkan kardiomiopati dilatasi dan gagal jantung. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2111–2116. Chen, Y., Siegel, F., Kipschull, S., Haas, B., Frohlich, H., Meister, G. & Pfeifer, A. 2013. miR-155 mengatur diferensiasi adiposit coklat dan krem melalui sirkuit bistabil. *Komunitas Nat* 4, 1769.
- Chen, Y., Gao, DY & Huang, L. 2015. in vivo pengiriman miRNA untuk terapi kanker: tantangan dan strategi. *Rev. Pengiriman Obat Adv* 81, 128–141.
- Chevillet, JR, Kang, Q., Ruf, IK, Briggs, HA, Vojtech, LN, Hughes, SM, Cheng, HH, Arroyo, JD, Meredith, EK, Gallichotte, EN dkk. 2014. Analisis kuantitatif dan stoikiometri kandungan mikroRNA eksosom. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 14888–14893.
- Da Costa Martins, PA, Salic, K., Gladka, MM, Armand, AS, Leptidis, S., El Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-De Roo, CJ, Bierhuizen, MF, Van Der Nagel, R. dkk. 2010. MicroRNA-199b menargetkan kinase nuklir Dyrk1a dalam loop amplifikasi otomatis yang mempromosikan pensinyalan kalsineurin/NFAT. *Biola Sel Nat* 12, 1220–1227.
- Dayeh, T., Volkov, P., Salo, S., Hall, E., Nilsson, E., Olsson, AH, Kirkpatrick, CL, Wollheim, CB, Eliasson, L., Ronn, T., Bacos, K. & Ling, C. 2014. Analisis metilasi DNA genom-lebar pulau pankreas manusia dari donor diabetes dan non-diabetes tipe 2 mengidentifikasi kandidat gen yang mempengaruhi sekresi insulin. *PLoS Genet* 10,e1004160.
- DeFronzo, RA, Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M. & Wahren, J. 1985. Pengaruh insulin pada metabolisme glukosa perifer dan splanknik pada diabetes mellitus (tipe II) yang tidak tergantung insulin. *J Clin Invest* 76, 149–155.
- Dey, BK, Gagan, J. & Dutta, A. 2011. miR-206 dan -486 menginduksi diferensiasi myoblast dengan menurunkan regulasi Pax7. *Sel Mol Biola* 31, 203–214.
- Dirx, E., Gladka, MM, Philippen, LE, Armand, AS, Kinet, V., Leptidis, S., El Azzouzi, H., Salic, K., Bourajaj, M., Da Silva, GJ dkk. 2013. Nfat dan miR-25 bekerja sama untuk mengaktifkan kembali faktor transkripsi Hand2 pada gagal jantung. *Biola Sel Nat* 15, 1282–1293.
- Dumortier, O., Hinault, C. & van Obberghen, E. 2013. MicroRNA dan metabolisme crosstalk dalam homeostasis energi. *Metab Sel* 18, 312–324.
- Ekimler, S., Sahin, K., Watanabe, Y., Tomita, M. & Kanai, A. 2014. Metode komputasi untuk prediksi target microRNA. *Metode Enzim* 5, 671–683. Eliasson, L. 2014. Mesin eksositosis. *Acta Physiol (Oxf)* 210, 455–457.
- Elmen, J., Lindow, M., Silahtaroglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjarn, M., Hansen, JB, Hansen, HF, Straarup, EM, McCullagh, K., Kearney, P. & Kauppinen, S. 2007. Antagonisme microRNA-122 pada tikus dengan LNA-antimiR yang diberikan secara sistemik mengarah ke up-regulasi dari satu set besar mRNA target yang diprediksi di hati. *Asam Nukleat Res* 36, 1153–1162.
- Erener, S., Mojibian, M., Fox, JK, Denroche, HC & Kiefer, TJ 2013. Beredar miR-375 sebagai biomarker kematian sel beta dan diabetes pada tikus. *Endokrinologi* 154,603–608.
- Esau, C., Davis, S., Murray, SF, Yu, XX, Pandey, SK, Pear, M., Watts, L., Booten, SL, Graham, M., McKay, R.dkk. 2006. regulasi miR-122 metabolisme lipid diungkapkan oleh in vivo penargetan antisense. *Metab Sel* 3, 87–98.
- Esguerra, JL, Bolmeson, C., Cilio, CM & Eliasson, L. 2011. Diferensial glukosa-regulasi microRNAs di pulau pankreas model diabetes tipe 2 non-obesitas tikus Goto-Kakizaki. *PLoS SATU* 6, e18613. Fernandez-Hernando, C., Ramirez, CM, Goedeke, L. & Suarez, Y. 2013. MicroRNAs pada penyakit metabolik. *Arterioskler Tromb Vasc Biola* 33, 178–185.
- Feuermann, Y., Kang, K., Gavrilova, O., Haetscher, N., Jang, SJ, Yoo, KH, Jiang, C., Gonzalez, FJ, Robinson, GW & Hennighausen, L. 2013. MiR-193b dan miR-365-1 tidak diperlukan untuk pengembangan dan fungsi lemak coklat pada tikus. *RNA Biola* 10, 1807–1814.
- Ganesan, J., Ramanujam, D., Sassi, Y., Ahles, A., Jentzsch, C., Werfel, S., Leierseder, S., Loyer, X., Giacca, M., Zentilin, L., Thum, T., Lagerbauer, B. & Engelhardt, S. 2013. MiR-378 mengontrol hipertrofi jantung oleh represi gabungan faktor jalur protein kinase yang diaktifkan mitogen. *Sirkulasi* 127, 2097–2106.
- Gebert, LFR, Rebhan, MAE, Crivelli, SEM, Denzler, R., Stoffel, M. & Hall, J. 2014. Miravirsin (SPC3649) dapat menghambat biogenesis miR-122. *Asam Nukleat Res* 42, 609–621.
- Goedeke, L., Rotllan, N., Canfran-Duque, A., Aranda, JF, Ramirez, CM, Araldi, E., Lin, CS, Anderson, NN, Wagschal, A., de Cabo, R., Horton, JD, Lasuncion, MA, Naar, AM, Suarez, Y. & Fernandez-Hernando, C. 2015. MicroRNA-148a mengatur reseptor LDL dan ekspresi ABCA1 untuk mengontrol kadar lipoprotein yang bersirkulasi. *Nat Med* 21, 1280–1289.
- Halban, PA, Polonsky, KS, Bowden, DW, Hawkins, MA, Ling, C., Mather, KJ, Powers, AC, Rhodes, CJ, Sussel, L. & Weir, GC 2014. Kegagalan sel beta pada diabetes tipe 2: mekanisme yang didalilkan dan prospek untuk pencegahan dan pengobatan. *J Clin Endokrinol Metabo* 99, 1983– 1992.
- Hayes, J., Peruzzi, PP & Lawler, S. 2014. MicroRNAs di kanker: biomarker, fungsi dan terapi. *Tren Mol Med* 20, 460–469.
- Hellemans, J. & Vandesompele, J. 2014. Pemilihan terpercaya gen referensi untuk analisis RT-qPCR. *Metode Mol Biol* 1160, 19–26.
- Heneghan, HM, Miller, N., McAnena, OJ, O'Brien, T. & Kerin, MJ 2011. Ekspresi miRNA diferensial dalam jaringan adiposa omentum dan dalam sirkulasi pasien obesitas mengidentifikasi biomarker metabolik baru. *J Clin Endokrinol Metabo* 96, E846–E850.
- Henke, JI, Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuetz, CG, Fehr, C., Juettner, C. & Niepmann, M. 2008. mi-

- croRNA-122 merangsang translasi RNA virus hepatitis C. *EMBO J* 27, 3300–3310.
- Hohmeier, HE, Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M. & Newgard, CB 2000. Isolasi garis sel turunan INS-1 dengan K sensitif ATP yang kuat+ sekresi insulin yang bergantung pada saluran dan tidak bergantung pada glukosa. *Diabetes* 49, 424–430.
- Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Marusawa, H., Iwanaga, Y., Hasegawa, K., Yokode, M., Kimura, T. & Kita, T. 2010. MicroRNA-33 dikodekan oleh intron protein pengikat elemen pengatur sterol 2 (Srebp2) mengatur HDL dalam hidup. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 17321– 17326.
- Hutson, MR & Kirby, ML 2007. Model sistem untuk mempelajari perkembangan dan penyakit jantung. *Krista saraf jantung dan malformasi conotruncal*. *Semin Cell Dev Biol* 18, 101–110.
- Jacovetti, C., Matkovich, SJ, Rodriguez-Trejo, A., Guay, C. & Regazzi, R. 2015. Pematangan sel beta pascakelahiran dikaitkan dengan perubahan microRNA spesifik pulau yang disebabkan oleh pergeseran nutrisi saat penyapihan. *Komunitas Nat* 6, 8084.
- Janssen, HLA, Reesink, HW, Lawitz, EJ, Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, AJ, Patrick, AK, Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, BD, Kauppinen, S., Levin, AA & Hodges, MR 2013. Pengobatan infeksi HCV dengan menargetkan microRNA. *N Engl J Med* 368, 1685–1694.
- Javidi, MA, Ahmadi, AH, Bakhshinejad, B., Nouraei, N., Babashah, S. & Sadeghizadeh, M. 2014. Mikro-RNA bebas sel sebagai biomarker kanker: pengembangan miRNA melalui cairan tubuh. *Med Oncol* 31, 295.
- Jopling, CL, Yi, M., Lancaster, AM, Lemon, SM & Sar-sekarang, P. 2005. Modulasi kelimpahan RNA virus hepatitis C oleh microRNA spesifik hati. *Sains* 309, 1577–1581.
- Jopling, CL, Schuetz, S. & Sarnow, P. 2008. Posisi-tergantungan fungsi penyok untuk situs pengikatan microRNA miR-122 tandem yang terletak di genom RNA virus hepatitis C. *Mikroba Host Sel* 4, 77–85.
- Jordan, SD, Kruger, M., Willmes, DM, Redemann, N., Wunderlich, FT, Bronneke, HS, Merkwirth, C., Kashkar, H., Olkkonen, VM, Bottger, T., Braun, T., Seibler, J. & Bruning, JC 2011. Ekspresi berlebih yang diinduksi obesitas dari miRNA-143 menghambat aktivasi AKT yang dirangsang insulin dan mengganggu metabolisme glukosa. *Biola Sel Nat* 13, 434–446.
- Kalis, M., Bolmeson, C., Esguerra, JL, Gupta, S., Edlund, A., Tormo-Badia, N., Speidel, D., Holmberg, D., Maya, S., Khoo, NK, Wendt, A., Eliasson, L. & Cilio, CM 2011. Penghapusan spesifik sel beta dari Dicer1 menyebabkan sekresi insulin yang rusak dan diabetes mellitus. *PLoS SATU* 6, e29166.
- Keller, P., Gburcik, V., Petrovic, N., Gallagher, IJ, Nedergaard, J., Cannon, B. & Timmons, JA 2011. Studi gen-chip mikroRNA yang diatur adipogenesis pada adiposit primer tikus dan obesitas manusia. *Gangguan Endokr BMC* 11, 7.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., Zhao, J. & Zhao, L. 2010. Signifikansi serum microRNAs pada pra-diabetes dan diabetes tipe 2 yang baru didiagnosis: sebuah studi klinis. *Akta Diabetes* 48, 61–69.
- Kornfeld, JW, Baitzel, C., Konner, AC, Nicholls, HT, Vogt, MC, Herrmanns, K., Scheja, L., Haumaitre, C., Wolf, AM, Knippschild, U., Seibler, J., Cereghini, S., Heeren, J., Stoffel, M. & Bruning, JC 2013. Ekspresi berlebih yang diinduksi obesitas dari miR-802 merusak metabolisme glukosa melalui pembungkaman Hnf1b. *Alam* 494, 111–115.
- Krutz, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, KG, Tuschl, T., Manoharan, M. & Stoffel, M. 2005. Membungkam microRNAs in vivo dengan 'antagomirs'. *Alam* 438, 685–689.
- Kulyte, A., Belarbi, Y., Lorente-Cebrian, S., Bambace, C., Arner, E., Daub, CO, Heden, P., Ryden, M., Mejhert, N. & Arner, P. 2014. Efek aditif dari microRNAs dan faktor transkripsi pada produksi CCL2 dalam jaringan adiposa putih manusia. *Diabetes* 63, 1248–1258.
- Kwekkeboom, RFJ, Sluijter, JPG, van Middelaar, BJ, Metz, CH, Brans, MA, Kamp, O., Paulus, WJ & Musters, RJP 2016. Peningkatan pengiriman lokal terapi antagomir ke miokardium hewan pengerat menggunakan ultrasound dan microbubbles. *Rilis Terkendali J* 222, 18–31.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. 2001. Identifikasi pengkodean gen baru untuk RNA kecil yang diekspresikan. *Sains* 294, 853–858.
- Latreille, M., Hausser, J., Stutzer, I., Zhang, Q., Hastoy, B., Gargani, S., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Zavolan, M., Esguerra, JL, Eliasson, L., Rulicke, T., Rorsman, P. & Stoffel, M. 2014. MicroRNA-7a mengatur fungsi sel beta pankreas. *J Clin Invest* 124, 2722–2735.
- Latreille, M., Herrmanns, K., Renwick, N., Tuschl, T., Malecki, MT, McCarthy, MI, Owen, KR, Rulicke, T. & Stoffel, M. 2015. dosis gen miR-375 dalam sel beta pankreas: implikasi untuk regulasi massa sel beta dan pengembangan biomarker. *J Mol Med (Berl)* 93, 1159–1169.
- Lee, RC, Feinbaum, RL & Ambros, V. 1993. The C. elegans gen heterokronik lin-4 mengkode RNA kecil dengan komplementaritas antisense ke lin-14. *Sel* 75, 843–854.
- Lindow, M., Vornlocher, H.-P., Riley, D., Kornbrust, DJ, Burchard, J., Whiteley, LO, Kamens, J., Thompson, JD, Nochur, S., Younis, H., Bartz, S., Parry, J., Ferrari, N., Henry, SP & Levin, AA 2012. Menilai efek biologis oligonukleotida yang diinduksi hibridisasi yang tidak diinginkan. *Nat Bioteknologi* 30, 920–923.
- Locke, JM, Da, SX, Dawe, HR, Rutter, GA & Harries, LW 2014. Peningkatan ekspresi miR-187 di pulau manusia dari individu dengan diabetes tipe 2 dikaitkan dengan penurunan sekresi insulin yang dirangsang glukosa. *diabetes* 57, 122–128.
- Lynn, FC, Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., McManus, MT, Harfe, BD & German, MS 2007. Ekspresi microRNA diperlukan untuk genesis sel pulau pankreas pada tikus. *Diabetes* 56, 2938–2945.
- Marquart, TJ, Allen, RM, Ory, DS & Baldan, A. 2010. miR-33 menghubungkan induksi SREBP-2 dengan represi transporter sterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 12228–12232.
- Martinez-Sanchez, A., Nguyen-Tu, MS & Rutter, GA 2015. Inaktivasi DICER mengidentifikasi sel beta pankreas

- gen "tidak diizinkan" yang ditargetkan oleh microRNA. *Mol Endocrinol* 29, 1067–1079.
- Mazi-ere, P. & Enright, AJ 2007. Prediksi microRNA target. *Penemuan Narkoba Hari Ini* 12, 452–458.
- McAlexander, MA, Phillips, MJ & Witwer, KW 2013. Perbandingan metode ekstraksi miRNA dari plasma dan pemulihan kuantitatif RNA dari cairan serebrospinal. *Gen depan* 4, 1–8.
- McCarthy, JJ, Esser, KA, Peterson, CA & Dupont-Versteegden, EE 2009. Bukti regulasi jaringan MyomiR dari ekspresi gen rantai berat beta-myosin selama atrofi otot rangka. *Genomik Fisiol* 39, 219–226.
- Melkman-Zehavi, T., Oren, R., Kredo-Russo, S., Shapira, T., Mandelbaum, AD, Rivkin, N., Nir, T., Lennox, KA, Behlke, MA, Dor, Y. & Hornstein, E. 2011. miRNA mengontrol konten insulin dalam sel beta pankreas melalui downregulasi represor transkripsi. *EMBO J* 30, 835–845.
- Mestdag, P., van Vlierberghe, P., de Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. & Vandesompele, J. 2009. Sebuah novel dan metode universal untuk normalisasi data microRNA RT-qPCR. *Biola genom* 10, R64.
- Mestdag, P., Hartmann, N., Baeriswyl, L., Andreasen, D., Bernard, N., Chen, C., Cheo, D., D'Andrade, P., Demayo, M., Dennis, L. dkk. 2014. Evaluasi platform ekspresi miRNA kuantitatif dalam studi kontrol kualitas microRNA (miRQC). *Metode Nat* 11, 809–815.
- Mitchell, PS, Parkin, RK, Kroh, EM, Fritz, BR, Wyman, SK, Pogoseva-Agadjanyan, EL, Peterson, A., Noteboom, J., O'Brian, KC, Allen, A. dkk. 2008. Mikro-RNA yang beredar sebagai penanda berbasis darah yang stabil untuk deteksi kanker. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10513–10518.
- Moldovan, L., Batte, KE, Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, CB & Piper, M. 2014. Tantangan metodologis dalam memanfaatkan miRNA sebagai biomarker yang beredar. *Sel J Mol Med* 18, 371–390.
- Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K. & Kaneda, Y. 2012a. Peran penting untuk miR-196a dalam adipogenesis coklat sel progenitor lemak putih. *PLoS Biola* 10, e1001314.
- Mori, MA, Raghavan, P., Thomou, T., Boucher, J., Robida-Stubbs, S., Macotela, Y., Russell, SJ, Kirkland, JL, Blackwell, TK & Kahn, CR 2012b. Peran pemrosesan microRNA dalam jaringan adiposa dalam pertahanan stres dan umur panjang. *Metab Sel* 16, 336–347.
- Mori, MA, Thomou, T., Boucher, J., Lee, KY, Lallukka, S., Kim, JK, Torriani, M., Yki-Jarvinen, H., Grinspoon, SK, Cypess, AM & Kahn, CR 2014. Pemrosesan miRNA yang diubah mengganggu penentuan adiposit coklat/putih dan berhubungan dengan lipodistrofi. *J Clin Invest* 124, 3339–3351.
- Moura, J., Borsheim, E. & Carvalho, E. 2014. Peran microRNAs dalam komplikasi diabetes-penekanan khusus pada penyembuhan luka. *Gen (Basel)* 5, 926–956.
- Musso, G., Cassader, M., Rosina, F. & Gambino, R. 2012. Dampak pengobatan saat ini pada penyakit hati, metabolisme glukosa dan risiko kardiovaskular pada penyakit hati berlemak non-alkohol (NAFLD): tinjauan sistematis dan meta-analisis uji coba acak. *diabetes* 55, 885–904.
- Najafi-Shoushtari, SH, Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, DE, Gerszten, RE & Naar, AM 2010. MicroRNA-33 dan gen inang SREBP bekerja sama untuk mengontrol homeostasis kolesterol. *Sains* 328, 1566–1569.
- Obad, S., Santos, CO, Petri, A., Heidenblad, M., Sapu, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, EM dkk. 2011. Membungkam keluarga microRNA dengan penargetan benih LNA kecil. *Nat Genet* 43, 371–378.
- Ofori, JK, Salunkhe, VA, Bagge, A., Wendt, A., Mulder, H., Eliasson, L. & Esguerra, JLS 2014. Regulasi Sekresi Insulin Terstimulasi Glukosa (GSIS) oleh miR-130a/b dan miR-152 melalui komponen piruvat dehidrogenase E1, subunit alfa PDHA1. *diabetes* 57, S170–S170.
- O'Rourke, JR, Georges, SA, Seay, HR, Tapscott, SJ, McManus, MT, Goldhamer, DJ, Swanson, MS & Harfe, BD 2007. Peran penting untuk Dicer selama pengembangan otot rangka. *Dev Biola* 311, 359–368.
- Ortega, FJ, Mercader, JM, Catalan, V., Moreno-Navarrete, JM, Pueyo, N., Sabater, M., Gomez-Ambrosi, J., Anglada, R., Fernandez-Formoso, JA, Ricart, W., Fruhbeck, G. & Fernandez-Real, JM 2013. Penargetan tanda tangan microRNA yang beredar dari obesitas. *Klin Chem* 59, 781–792.
- Ottosen, S., Peterseli, TB, Yang, L., Zeh, K., van Doorn, L.-J., van der Veer, E., Raney, AK, Hodges, MR & Patrick, AK 2015. In vitro aktivitas antivirus dan profil resistensi praklinis dan klinis miravirsin, terapi virus anti-hepatitis c baru yang menargetkan faktor manusia miR-122. *Kemoterapi Agen Antimikroba* 59, 599–608.
- Peterson, SM, Thompson, JA, Ufkin, ML, Sathyanarayana, P., Liaw, L. & Congdon, CB 2014. Fitur umum alat prediksi target microRNA. *Gen depan* 5, 1–10.
- Polge, C., Heng, AE, Combaret, L., Bechet, D., Taillandier, D. & Attaix, D. 2013. Kemajuan terbaru dalam menjelaskan jalur sinyal proteolitik dalam pengecilan otot: implikasi klinis potensial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23(pasokan 1), S1–S5.
- Poy, MN, Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., MacDonald, PE, Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P. & Stoffel, M. 2004. MicroRNA spesifik pulau pankreas mengatur sekresi insulin. *Alam* 432, 226–230.
- Poy, MN, Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M. & Stoffel, M. 2009. miR-375 mempertahankan massa sel alfa dan beta pankreas yang normal. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 5813–5818.
- Pullen, TJ, Da, SX, Kelsey, G. & Rutter, GA 2011. miR-29a dan miR-29b berkontribusi pada pembungkaman spesifik sel beta pankreas dari transporter monokarboksilat 1 (Mct1). *Sel Mol Biola* 31, 3182–3194.
- Rayner, KJ, Suarez, Y., Davalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, ML, Tamehiro, N., Fisher, EA, Moore, KJ & Fernandez-Hernando, C. 2010. MiR-33 berkontribusi pada regulasi homeostasis kolesterol. *Sains* 328, 1570–1573.
- RegulusTherapeutics, I. 2014. Regulus mengumumkan pemberitahuan tentang tunjangan dari kantor paten AS terkait dengan Program microRNA-103/107 di Gangguan Metabolik. *Jumpa pers*, 1.

- RegulusTherapeutics, I. 2015. RG - 125 (AZD4076), a microRNA terapi penargetan microRNA - 103/107 untuk pengobatan NASH pada pasien dengan diabetes tipe 2/Pre - Diabetes, dipilih sebagai kandidat klinis oleh AstraZeneca. Jumpa pers.
- Roberts, TC 2015. Mesin microRNA. *Adv Exp Med Biola* 887, 15–30.
- Rosen, ED & Spiegelman, BM 2006. Adiposit sebagai pengatur keseimbangan energi dan homeostasis glukosa. *Alam* 444, 847–853.
- Rottiers, V. & Naar, AM 2012. MicroRNAs dalam metabolisme dan gangguan metabolisme. *Nat Rev Mol Sel Biol* 13, 239–250.
- Rutter, GA 2014. Dorothy Hodgkin Lecture 2014. Undergen berdiri yang diidentifikasi oleh studi asosiasi genom untuk diabetes tipe 2. *Obat Diabetes* 31, 1480–1487.
- Saito, T. & Sætrom, P. 2010. MicroRNA – penargetan dan prediksi sasaran. *Bioteknologi Baru* 27, 243–249.
- Salunkhe, VA, Esguerra, JL, Ofori, JK, Mollet, IG, Braun, M., Stoffel, M., Wendt, A. & Eliasson, L. 2015a. Modulasi ekspresi microRNA-375 mengubah sifat saluran Na⁽⁺⁾ bervoltase dan eksositosis dalam sel yang mensekresi insulin. *Acta Fisiol (Oxf)* 213, 882–892.
- Salunkhe, VA, Ofori, J., Gandasi, NR, Salo, SA, Hansputra, S., Andersson, SAYA, Wendt, A., Barg, S., Esguerra, JLS & Eliasson, L. 2015b. MiR-335 mengatur protein eksositosis dan mempengaruhi sekresi insulin yang dirangsang glukosa melalui penurunan Ca²⁺-eksositosis tergantung pada sel beta. *diabetes* 58, S128–S128.
- Sempere, LF, Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Lumut, E., Dmitrovsky, E. & Ambros, V. 2004. Profil ekspresi mikroRNA mamalia mengungkap subset dari mikroRNA yang diekspresikan otak dengan kemungkinan peran dalam diferensiasi saraf murine dan manusia. *Biola genom* 5, R13.
- Shu, D., Li, H., Shu, Y., Xiong, G., Carson, KAMI, Haque, F., Xu, R. & Guo, P. 2015. Pengiriman sistemik antimiRNA untuk menekan payudara tiga kali lipat negatif. *ACS Nano* 9, 9731–9740.
- Sjogren, RJ, Egan, B., Katayama, M., Zierath, JR & Krook, A. 2015. Analisis temporal pola ekspresi miRNAmRNA timbal balik memprediksi jaringan regulasi selama diferensiasi dalam sel otot rangka manusia. *Genomik Fisiol* 47, 45–57.
- Snider, P., Olaopa, M., Firulli, AB & Conway, SJ 2007. Perkembangan kardiovaskular dan garis keturunan puncak saraf jantung yang menjajah. *JurnalIlmiahDunia* 7, 1090–1113.
- Sørensen, A., Wissing, M., Salo, €., S., Englund, A. & Dalgaard, L. 2014. MicroRNAs Terkait dengan Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *gen* 5, 684–708.
- Soriano-Arroquia, A., McCormick, R., Molloy, AP, McAr-dle, A. & Goljanek-Whysall, K. 2016. Perubahan terkait usia dalam interaksi miR-143-3p:Igfbp5 mempengaruhi regenerasi otot. *Sel penuaan* 15, 361–369.
- Stenvang, J. & Kauppinen, S. 2008. MicroRNA sebagai target untuk terapi berbasis antisense. *Opini Ahli Biol Ada* 8, 59–81.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. & Kauppinen, S. 2012. Penghambatan fungsi microRNA oleh oligonukleotida antimiR. *Kesunyian* 3, 1.
- Sun, L., Xie, H., Mori, MA, Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, SM, Liu, Q., Kahn, CR & Lodish, HF 2011. Mir193b-365 sangat penting untuk diferensiasi lemak coklat. *Biola Sel Nat* 13, 958–965.
- Suzuki, R., Lee, K., Jing, E., Penawar, SB, McDonald, JG, Montine, TJ, Craft, S. & Kahn, CR 2010. Diabetes dan insulin dalam regulasi metabolisme kolesterol otak. *Metab Sel* 12, 567–579.
- Taft, RJ, Pheasant, M. & Mattick, JS 2007. Hubungan-kapal antara DNA non-pengkode protein dan kompleksitas eukariotik. *BioEsai* 29, 288–299.
- Tattikota, SG, Rathjen, T., McAnulty, SJ, Wessels, HH, Akerman, I., van de Bunt, M., Hausser, J., Esguerra, JL, Musahl, A., Pandey, AK dkk. 2014. Argonaute2 memediasi ekspansi kompensasi sel beta pankreas. *Metab Sel* 19, 122–134.
- Tattikota, SG, Rathjen, T., Hausser, J., Khedkar, A., Kabra, UD, Pandey, V., Sury, M., Wessels, HH, Mollet, IG, Eliasson, L. dkk. 2015. miR-184 mengatur fungsi sel beta pankreas menurut metabolisme glukosa. *J Biol Chem* 290, 20284–20294.
- Towbin, JA & Bowles, NE 2002. Hati yang gagal. *Alam* 415, 227–233.
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, MH & Stoffel, M. 2011. Micro-RNA 103 dan 107 mengatur sensitivitas insulin. *Alam* 474, 649–653.
- Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, CC & Stoffel, M. 2012. MyomiR-133 mengatur diferensiasi lemak coklat melalui Prdm16. *Biola Sel Nat* 14, 1330–1335.
- TrevorStokes 2012. Grup menarik kembali kertas microRNA setelah menyadari reagen adalah hasil yang miring. *Jam Tangan Pencabutan*, 1.
- Tugay, K., Guay, C., Marques, AC, Allagnat, F., Locke, JM, Harries, LW, Rutter, GA & Regazzi, R. 2015. Peran microRNAs dalam penurunan terkait usia fungsi sel beta pankreas di pulau tikus. *diabetes* 59, 161–169.
- Van Der Ree MH, van der Meer, AJ, de Bruijne, J., Maan, R., van Vliet, A., Welzel, TM, Zeuzem, S., Lawitz, EJ, Rodriguez-Torres, M., Kupcova, V., Wiercinska-Drapalo, A., Hodges, MR, Janssen, HLA & Reesink, HW 2014. Keamanan jangka panjang dan kemanjuran terapi bertarget microRNA pada pasien hepatitis C kronis. *Resolusi Antivirus* 111, 53–59.
- Van Peer, G., Lefever, S., Anckaert, J., Beckers, A., Rihani, A., Van Goethem, A., Volders, PJ, Zeka, F., Ongenaert, M., Mestdagh, P. & Vandesompele, J. 2014. pelacak miRBase: melacak perubahan anotasi microRNA. *Basis Data (Oxford) pii: bau080*. doi: 10.1093/database/bau080,
- Van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, BA, Sutherland, LB, Qi, X., Richardson, JA, Kelm, RJ Jr & Olson, EN 2009. Sebuah keluarga microRNAs dikodekan oleh gen myosin mengatur ekspresi myosin dan kinerja otot. *Sel Pengembang* 17, 662–673.
- Vandesompele, J. 2013. Bagaimana menemukan mikro-RNA | Biogazelle.
- Vlachos, IS & Hatzigeorgiou, AG 2013. Sumber daya online untuk analisis miRNA. *Klinik Biokimia* 46, 879–890.

- Wang, H., Jiang, Y., Peng, H., Chen, Y., Zhu, P. & Huang, Y. 2015a. Kemajuan terbaru dalam pengiriman microRNA untuk terapi kanker oleh vektor sintesis non-virus. *Pengiriman Obat Adv* 81, 142–160.
- Wang, P., Fiaschi-Taesch, NM, Vasavada, RC, Scott, DK, Garcia-Ocana, A. & Stewart, AF 2015b. Diabetes mellitus-kemajuan dan tantangan dalam proliferasi sel beta manusia. *Nat Rev Endokrinol* 11, 2011–212.
- Witkos, TM, Koscianska, E. & Krzyzosiak, WJ 2011. Aspek praktis dari prediksi target microRNA. *Curr Mol Med* 11, 93–109.
- Witwer, KW 2013. Penyampaian dan kualitas data dalam mikroar-profil microRNA berbasis sinar. *Klin Chem* 59, 392–400.
- Xie, H., Lim, B. & Lodish, HF 2009. MicroRNAs diinduksi selama adipogenesis yang mempercepat perkembangan sel lemak diregulasi pada obesitas. *Diabetes* 58, 1050–1057.
- Yang, Z., Chen, H., Si, H., Li, X., Ding, X., Sheng, Q., Chen, P. & Zhang, H. 2014. Serum miR-23a, biomarker potensial untuk diagnosis pra-diabetes dan diabetes tipe 2. *Akta Diabetes* 51, 823–831.
- Zhang, Y., Wang, Z. & Gemeinhart, RA 2013. Kemajuan dalam pengiriman mikroRNA. *Relis Terkendali J* 172, 962–974.
- Zhang, H., Guan, M., Townsend, KL, Huang, TL, An, D., Yan, X., Xue, R., Schulz, TJ, Winnay, J., Mori, M. dkk. 2015. MicroRNA-455 mengatur adipogenesis coklat melalui jaringan pensinyalan HIF1an-AMPK-PGC1alpha baru. *Perwakilan EMBO* 16, 1378–1393.
- Zhao, Y., Wang, E., Liu, H., Rotunno, M., Koshiol, J., Marincola, FM, Landi, MT & McShane, LM 2010. Evaluasi metode normalisasi untuk microarrays microRNA dua saluran. *J Transl Med* 8, 69.
- Zhou, B., Li, C., Qi, W., Zhang, Y., Zhang, F., Wu, JX, Hu, YN, Wu, DM, Liu, Y., Yan, TT, Jing, Q., Liu, MF & Zhai, QW 2012. Downregulation miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) dan meningkatkan sensitivitas insulin hati. *diabetes* 55, 2032–2043.

informasi pendukung

Informasi Pendukung Tambahan dapat ditemukan secara online di tab informasi pendukung untuk artikel ini:

Lampiran S1 Pembicara di microRNAs dalam simposium metabolisme, yang semuanya berkontribusi pada naskah.