

PEMILIHAN KANDIDAT miRNA SEBAGAI PREDIKTOR DIABETES MELITUS GESTASIONAL DENGAN ANALISIS BERBASIS DATA MINING

F Dany^{1*}, UA Nikmah¹, A Noviantari¹

Pusat Riset Biomedis Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

Jln. Raya Jakarta-Bogor, Km 46, Pakansari, Cibinong, Bogor 16911

*Email: fransdany1@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes melitus gestasional (DMG) merupakan keadaan ketika ibu mengalami diabetes selama kehamilan sampai proses persalinan dan dapat berdampak negatif bagi kesehatan ibu dan anak. Ibu hamil dengan DMG sering tidak bergejala dan luput dari pemantauan khususnya saat kehamilan pertama. Potensi microRNA (miRNA) sebagai penanda awal sejumlah penyakit telah banyak diteliti dan studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandidat miRNA sebagai prediktor DMG. Pemilihan kandidat miRNA dilakukan melalui data mining pada database Human microRNA Disease Database (HMDD), analisis fungsional serta target miRNA dengan database miRDB dan analisis pengayaan dengan miRNet. Hasil analisis menunjukkan bahwa miR-126, miR-222 dan miR-27a berpotensi menjadi prediktor DMG, khususnya miR-27a yang dapat terkait dengan jalur aktivitas Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor. Kandidat miRNA tersebut dapat dikembangkan sebagai target skrining biomarker atau terapi sebagai bagian dari pendekatan personalized medicine pada penatalaksanaan DMG.

Kata kunci: diabetes melitus gestasional (DMG), miRNA, HMDD, miRDB, miRNet

PENDAHULUAN

Diabetes melitus gestasional (DMG) adalah diabetes yang hanya dijumpai selama masa kehamilan sampai persalinan namun berpotensi meningkatkan risiko morbiditas dan bahkan mortalitas pada ibu dan anak yang dikandungnya (PERKENI, 2021). Angka kejadian DMG di Indonesia diperkirakan berkisar >1% dan sering tidak bergejala sehingga dapat luput dari pemantauan khususnya pada kehamilan pertama (Rahmawati dkk., 2016; Widyaputri dkk., 2022). Sejumlah faktor risiko DMG antara lain usia ibu yang cukup tua saat hamil, obesitas, riwayat keluarga dengan diabetes, riwayat *polycystic ovarium syndrome* (PCOS), dan riwayat melahirkan bayi >4 kg atau bayi dengan cacat bawaan bila pernah melahirkan. Keadaan ini juga terkait dengan kejadian preeklampsia/eklampsia atau diabetes melitus (DM) bagi si ibu di kemudian hari (Lee dkk., 2018; Li dkk., 2021). Di sisi lain, anak yang dilahirkan dari ibu dengan DMG juga berisiko mengalami gangguan tumbuh kembang atau kecacatan. Oleh sebab itu, skrining awal DMG sangat penting dilakukan sehingga penatalaksanaan yang sesuai dapat diantisipasi (Raets dkk., 2021).

Sejumlah studi terkini menunjukkan potensi *microRNA* (miRNA) sebagai penanda awal sejumlah penyakit. miRNA merupakan untai nukleotida pendek (~17-25 basa) yang merupakan bagian dari RNA non-pengkode namun dapat mempengaruhi ekspresi gen. miRNA juga dapat disekresikan sebagai molekul perantara komunikasi parakrin antar sel dan jaringan (Condrat dkk., 2020). Sebagian miRNA juga berperan pada patogenesis sejumlah penyakit seperti kanker, obesitas, diabetes melitus, kelainan autoimun dan lainnya sehingga gencar diteliti dan dikembangkan sebagai target diagnostik atau skrining

biomarker dan target terapi abnormalitas terkait (Li dan Kowdley, 2012; Chen dkk., 2016). Sejumlah besar informasi atau data hasil riset-riset miRNA tersebut telah disimpan dalam *database* daring public yang dapat dimanfaatkan peneliti untuk mendesain pengembangan miRNA sebagai target *biomarker* atau terapi (Major dkk., 2021). Karena itu, studi ini bertujuan mengidentifikasi kandidat miRNA yang berpotensi dalam memprediksi kejadian DMG melalui teknik *data mining* dengan menggunakan *database* miRNA yang tersedia secara daring.

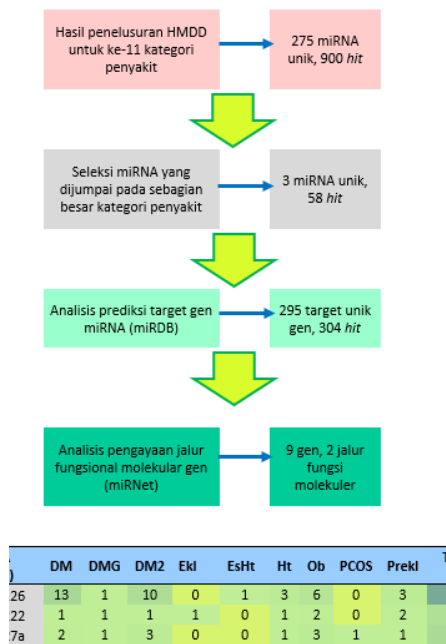
METODE

Studi ini merupakan analisis *in silico* melalui teknik penggalian data (*data mining*) dari *database* miRNA yang tersedia secara daring. Situs *Human microRNA Disease Database* versi 3.2 (HMDD v3.2) yang diakses di <https://www.cuilab.cn> digunakan untuk seleksi awal pencarian miRNA berdasarkan target penyakit. Set data terlebih dulu diunduh dalam bentuk TSV yang diubah menjadi *file* Excel untuk mempermudah filter data. Mengingat keterkaitan DMG dengan beberapa kelainan, 11 kategori penyakit digunakan pada penelusuran ini, yaitu diabetes melitus (DM) secara umum, DM tipe 1 (DM1), DM tipe 2 (DM2), DMG, eklamsia (Ekl), preeklamsia (Prekl), hipertensi esensial (EsHt) atau hipertensi secara umum (Ht), obesitas (Ob), *polycystic ovarium syndrome* (PCOS) dan komplikasi kehamilan lainnya. Daftar miRNA hasil penelusuran selanjutnya dibuat tabulasi silang melalui menu *Pivot Table* untuk menyaring miRNA yang paling banyak dijumpai di antara ke-11 kategori penyakit di atas terkait DMG dan harus terdeteksi minimal 1 *hit* untuk kriteria DMG.

Kemudian, analisis dilanjutkan dengan memasukkan miRNA terpilih ke *database* miRDB yang dapat diakses di <http://mirdb.org> untuk mengetahui target gen. Kandidat miRNA yang terpilih adalah miRNA dengan skor target >94. Analisis pengayaan (*enrichment analysis*) dilakukan untuk mengetahui fungsi molekular gen yang paling bermakna dengan menggunakan perangkat daring miRNet yang dapat diakses di <https://www.mirnet.ca/miRNet/home.xhtml> dengan memasukkan semua gen yang terseleksi dari miRDB dan referensi berdasarkan data Gene Ontology (GO) untuk fungsi molekular (GO-MF, *gene ontology-molecular function*). Jalur fungsi molekular yang dipilih adalah jalur dengan nilai *adjusted p value* <0,05 dan target gen berikut miRNA yang terkait dengan fungsi tersebut diidentifikasi. Analisis dan filter data dibantu dengan perangkat lunak Microsoft Excel 2016.

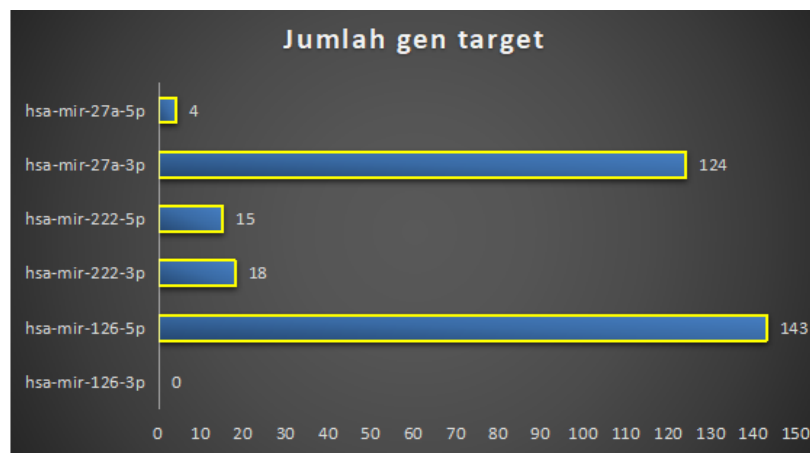
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambar 1 menunjukkan alur proses *data mining* dengan *database* HMDD, miRDB dan miRNet serta terdapat sebagian miRNA yang hanya ditemukan pada faktor risiko tertentu seperti eklamsia, dan *polycystic ovary syndrome* (PCOS). Jumlah *hit* terbanyak dari ke-3 miRNA terpilih dijumpai pada hsa-mir-126. Dalam pemilahan berdasarkan kategori penyakit, *hit* terkait DM tipe 1 (DM1) dan komplikasi kehamilan lain tidak ditemukan sehingga tidak ditampilkan.



Gambar 1. Alur proses data *mining* pemilahan kandidat miRNA untuk prediksi diabetes melitus gestasional (DMG)

Setelah dilakukan analisis prediksi target gen dengan *database* miRDB menggunakan kriteria skor target gen >94 , hsa-mir-126-5p paling banyak mempengaruhi gen target disusul dengan hsa-mir-27a-3p. Hal ini mengonfirmasi dominasi jumlah *hit* kategori penyakit untuk hsa-mir-126 yang dijumpai pada hasil penelusuran awal dengan *database* HMDD. Sementara, hsa-mir-222 mempengaruhi gen dengan jumlah yang hampir berimbang antara sisi lengan 5' dan 3' (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil analisis fungsional gen target miRNA terpilih dengan database miRDB

Meskipun hsa-mir-126 tidak memberikan *hit* target gen di sisi lengan 3', miRNA tersebut memiliki aktivitas biologis dan mempengaruhi regulasi gen. Dominasi sisi tertentu pada miRNA umumnya tidak dijumpai meskipun fungsi kedua arah orientasi untai miRNA dapat mempengaruhi stabilitas kompleks fungsional dengan gen targetnya (Mitra dkk., 2015; Yurikova dkk., 2019) CDS and 3'UTR of mRNAs of target genes. The MirTarget program used in this study allows for the discovery of miRNA binding sites (BS).

Tabel 1. Hasil *enrichment analysis* fungsi molekuler gen target dengan database miRNet

No	Gen Target	miRNA	Skor Target	Fungsi Molekuler Gen
1	ARHGEF26	hsa-miR-27a-3p	98	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity*</i>
2	ARHGEF38	hsa-miR-222-3p	95	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
3	DENND1B	hsa-miR-126-5p	100	<i>Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
4	FGD2	hsa-miR-126-5p	96	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
5	ITSN2	hsa-miR-27a-3p	95	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
6	PREX2	hsa-miR-126-5p	95	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
7	SBF2	hsa-miR-27a-3p	97	<i>Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
8	SOS1	hsa-miR-27a-3p	99	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>
9	VAV2	hsa-miR-27a-3p	96	<i>Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>

*Nilai *adjusted p value* untuk ke-2 fungsi molekuler sebesar 0,0169

Hasil analisis pengayaan (*enrichment analysis*) pada Tabel 1, dari interaksi antar gen target menunjukkan dua jalur fungsi molekuler yang bermakna secara statistik yaitu, aktivasi *Ras guanyl-nucleotide exchange factor* dan *Rho guanyl-nucleotide exchange factor*. Kedua jalur tersebut terkait dengan 9 gen target dan terdapat 2 gen yang berasosiasi dengan hanya 1 jalur pada timbulnya DMG. Dari ke-3 kandidat miRNA, hsa-miR-27a-3p mendominasi pengaruh gen target tersebut. Bila dilihat pada Gambar 1, jumlah hit hsa-miR-27a memang tidak sebanyak jumlah *hit* has-miR-126, tetapi secara substantif, hsa-miR-27a ditemukan berasosiasi dengan sejumlah faktor risiko DMG utama, yaitu *polycystic ovary syndrome* (PCOS), preeklamsia dan hipertensi (Tabrizi dkk., 2020; Zheng dkk., 2020; Zhu dan Liu, 2021). Suatu studi *in vivo* dengan hewan model mencit mengindikasikan peran miR-27a dalam menekan faktor transkripsi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang berfungsi sebagai sistem pertahanan antioksidan. Pengikatan miR-27a dapat mengurangi stabilitas *messenger RNA* (mRNA) berikut ekspresi protein Nrf2 yang berdampak pada timbulnya stres oksidatif dan embriopati diabetik (Zhao dkk., 2018).

Sementara itu, hsa-mir-126 terdistribusi di berbagai tipe jaringan dan eksosom. Dalam proses kehamilan, mir-126-3p terekspresi di sel endotel vaskular vena umbilicalis tali pusat dan plasenta. Peningkatan ekspresi miRNA ini terkait dengan timbulnya diabetes dan gangguan tumbuh kembang janin melalui pengikatannya dengan *insulin receptor*

substrate 1 (IRS1) dan phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang terkait dengan jalur sinyal insulin (Shah dkk., 2021). Di sisi lain, penurunan kadar mir-126-5p dikaitkan dengan timbulnya prediabetes dan DM tipe 2 serta berkorelasi negatif dengan aktivasi jalur *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) yang berperan pada proses inflamasi melalui jalur PI3K/Akt. Hasil ini mengisyaratkan peran mir-126 yang dapat berbeda antar sisi 5' dan 3' terhadap patofisiologi diabetes pada kehamilan sehingga memerlukan investigasi lebih lanjut (Dehghani dkk., 2020).

Korelasi positif antara hsa-miR-222-3p dengan kadar glukosa plasma puasa dan berat lahir diperlihatkan oleh studi yang dilakukan oleh Filardi dkk (2022). Seperti halnya miR-126, miRNA ini juga terlibat dalam jalur PI3K terutama *insulin receptor substrate 4* (IRS4) dan *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN). Selain itu, mir-222 juga dihubungkan dengan obesitas dan disfungsi sel beta pankreas yang mendasari timbulnya DMG (Vasu dkk., 2019).

Hasil analisis pengayaan pada studi ini menunjukkan bahwa ke-3 miRNA terkait dengan aktivitas pertukaran nukleotida guanil famili Rho dan Ras. Kedua protein Rho dan Ras termasuk dalam superfamili Ras yang berperan pada proses molekular penting seperti transduksi sinyal, proliferasi dan diferensiasi sel (Vigil dkk., 2010). Aktivitas kedua jalur tersebut pada dasarnya akan mengubah bentuk GDP bebas menjadi bentuk terikat GTP yang aktif pada membran sel, khususnya sel beta pankreas pada proses produksi insulin (Li dkk., 2015; Machin dkk., 2021). Meskipun begitu, protein famili Rho lebih banyak dihubungkan dengan pengaturan metabolisme glukosa dan lipid di pankreas, jaringan adiposa dan otot rangka dibandingkan famili Ras yang cenderung terlibat dalam proses inflamasi melalui jalur MAPK/NF- κ B, interaksi antar sel dan sel dengan matriks pada timbulnya diabetes beserta komplikasinya (Vigil dkk., 2010; Møller dkk., 2019; Huang dkk., 2022). Informasi ini menunjukkan bahwa efek ekspresi ke-3 miRNA dengan kedua jalur superfamili Ras pada timbulnya DMG masih perlu dibuktikan secara eksperimental mengingat terdapat perbedaan prediksi mekanisme molekular. Meskipun begitu, analisis *in silico* miRNA tersebut sangat membantu peneliti memilah kandidat miRNA yang akan diperiksa pada penelitian lanjutan terkait pengaruh miRNA terhadap kejadian DMG melalui pengaturan jalur sinyal tertentu.

KESIMPULAN

Analisis berbasis *data mining* dari database HMDD dan miRDB memperlihatkan bahwa miR-126, miR-222 dan miR-27a berpotensi menjadi prediktor diabetes melitus gestasional (DMG), khususnya miR-27a yang terkait dengan fungsi molekular jalur aktivitas *Ras & Rho guanyl-nucleotide exchange factor*. Penelitian lebih lanjut terkait pengembangan kandidat miRNA tersebut sebagai target *biomarker* atau terapi dapat dilakukan dalam rangka implementasi pendekatan *personalized medicine* pada penatalaksanaan DMG.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih khususnya kepada Kepala Pusat Riset Biomedis Organisasi Kesehatan BRIN untuk dukungan moral penulisan manuskrip ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, J. Q., Papp, G., Szodoray, P., and Zeher, M., (2016), The Role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases, *Autoimmunity Reviews*, 15(12), 1171–1180.
- Condrat, C.E., Thompson, D.C., Barbu, M.G., Bugnar, O.L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S.M., and Voinea, S.C., (2020), miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*, 9(276), 1–32.
- Dehghani, M., Zarch, S.M.A., Mehrjardi, M.Y.V., Nazari, M., Babakhanzadeh, E., Ghadimi, H., Zeinali, F., and Talebi, M., (2020), Evaluation of miR-181b and miR-126-5p expression levels in T2DM patients compared to healthy individuals: relationship with NF- κ B gene expression. *Endocrinologia, Diabetes y Nutricion*, 67(7), 454–460.
- Filardi, T., Catanzaro, G., Grieco, G.E., Splendiani, E., Trocchianesi, S., Santangelo, C., Brunelli, R., Guarino, E., Sebastiani, G., Dotta, F., and Morano, S., (2022), Identification and validation of miR-222-3p and miR-409-3p as plasma biomarkers in gestational diabetes mellitus sharing validated target genes involved in metabolic homeostasis, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4276), 1–16.
- Huang, S., Wang, J., Zhang, L., Tian, S., Wang, Y., Shao, X., Zhou, S., and Yu, P., (2022), Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 promotes renal inflammatory injury in type 2 diabetes mellitus, *Metabolism: Clinical and Experimental*, 131(155177), 1–10.
- Lee, K.W., Ching, S.M., Ramachandran, V., Yee, A., Hoo, F.K., Chia, Y.C., Wan Sulaiman, W.A., Suppiah, S., Mohamed, M.H., and Veettil, S.K., (2018), Prevalence and risk factors of gestational diabetes mellitus in asia: a systematic review and meta-analysis, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1), 1–20.
- Li, J.Y., Tao, F., Wu, X.X., Tan, Y.Z., He, L., and Lu, H., (2015), Common RASGRP1 gene variants that confer risk of type 2 diabetes, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(8), 439–443.
- Li, X., Liu, X., Zuo, Y., Gao, J., Liu, Y., and Zheng, W., (2021), The Risk factors of gestational diabetes mellitus in patients with polycystic ovary syndrome: what should we care?, *Medicine*, 100(31), 1–5.
- Li, Y., and Kowdley, K.V., (2012), MicroRNAs in common human diseases, *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 10(5), 246–253.
- Machin, P.A., Tsonou, E., Hornigold, D.C. and Welch, H.C., (2021), Rho family GTPases and Rho GEFs in glucose homeostasis, *Cells*, 10(4), 1–27.
- Major, J.L., Bagchi, R.A., and da Silva, J.P., (2021), Application of microRNA database mining in biomarker discovery and identification of therapeutic targets for complex disease, *Methods and Protocols*, 4(1), 1–11.
- Mitra, R., Lin, C.C., Eischen, C.M., Bandyopadhyay, S., and Zhao, Z., (2015), Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p Arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study, *RNA (New York, N.Y.)*, 21(6), 1055–1065.
- Møller, L.L.V., Klip, A., and Sylow, L., (2019), Rho GTPases-emerging Regulators of glucose homeostasis and metabolic health, *Cells*, 8(5), 1–21.
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI), (2021), Pedoman diagnosis dan penatalaksanaan hiperglikemia dalam kehamilan, Cetak pertama (Juli 2021), *PB. PERKENI*, Jakarta, 1–15.
- Raets, L., Beunen, K., and Benhalima, K., (2021), Screening for gestational diabetes mellitus in early pregnancy: what is the evidence?, *Journal of Clinical Medicine*, 10(6), 1–16.
- Rahmawati, F., Natosba, J., and Jaji., (2016), Skrining diabetes mellitus gestasional dan faktor risiko yang mempengaruhinya, *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*, 3(2), 33–43.
- Shah, K.B., Chernausek, S.D., Teague, A.M., Bard, D.E., and Tryggstad, J.B., (2021), Maternal diabetes alters microRNA expression in fetal exosomes, human umbilical vein endothelial cells and placenta, *Pediatric Research*, 89(5), 1157–1163.

- Tabrizi, Z.P.F., Miraj, S., Tahmasebian, S., and Ghasemi, S., (2020), Plasma levels of miR-27a, miR-130b, and miR-301a in polycystic ovary syndrome, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 9(3), 198–206.
- Vasu, S., Kumano, K., Darden, C.M., Rahman, I., Lawrence, M.C., and Naziruddin, B., (2019), MicroRNA signatures as future biomarkers for diagnosis of diabetes states, *Cells*, 8(1533), 1–32.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J., (2010), Ras superfamily GEFs and GAP: validated and tractable targets for cancer therapy?, *Nature Reviews Cancer*, 10(12), 842–857.
- Widyaputri, F., Lim, L.L., Utami, T.P., Harti, A.P., Agni, A.N., Nurdianti, D.S., Widayanti, T.W., Wardhana, F.S., Prayogo, M.E., and Sasongko, M.B., (2022), Prevalence of diabetes in pregnancy and microvascular complications in native Indonesian women: the jogjakarta diabetic retinopathy initiatives in pregnancy (Jog-DRIP), *Plos One*, 17(6), 1–11.
- Yurikova, O.Y., Aisina, D.E., Niyazova, R.E., Atambayeva, S.A., Labeit, S., and Ivashchenko, A.T., (2019), The interaction of miRNA-5p and miRNA-3p with the mRNAs of orthologous genes, *Molecular Biology*, 53(4), 612–623.
- Zhao, Y., Dong, D., Reece, E.A., Wang, A.R., and Yang, P., (2018), Oxidative stress-induced miR-27a targets the redox gene Nrf2 in diabetic embryopathy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(1), 136.e1-136.e10.
- Zheng, W., Chen, A., Yang, H., and Hong, L., (2020), MicroRNA-27a inhibits trophoblast cell migration and invasion by targeting SMAD2: potential role in preeclampsia, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(28), 2262–2269.
- Zhu, L., and Liu, Z., (2021), Serum from patients with hypertension promotes endothelial dysfunction to induce trophoblast invasion through the miR-27b-3p/ATPase plasma membrane Ca²⁺ transporting 1 axis, *Molecular Medicine Reports*, 23(319), 1–10.