

a cura di Francesco Purrello

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Università degli Studi di Catania

Inizia da questo numero della rivista una nuova Rubrica, che abbiamo chiamato “Medicina Traslazionale: applicazioni cliniche della ricerca di base”.

La Medicina Traslazionale si basa sulla capacità di trasferire nuove conoscenze dalla scienza di base a quella biomedica in modo da generare applicazioni diagnostiche e terapeutiche avanzate. Si occupa di tutto ciò che, in ambito medico, traduce la scoperta scientifica che avviene nei laboratori di ricerca in risultati clinici al letto del malato.

Questa nuova Rubrica vuole evidenziare lo stretto legame, anche in ambito diabetologico, tra due mondi apparentemente lontani, quello della ricerca di base e quello della pratica clinica, e vuole offrire ai lettori la possibilità di conoscere quegli ambiti di ricerca che risultano particolarmente innovativi e con prospettive più o meno immediate di applicazione clinica.

L'articolo presente in questo numero spiega come la scoperta dei microRNA (piccoli frammenti di RNA) abbia portato alla comprensione di meccanismi di regolazione della sintesi di proteine finora sconosciuti. I microRNA vengono oggi anche dosati in circolo, e quindi si prospetta la possibilità che, da un semplice prelievo di sangue effettuato al letto del malato, si possano ottenere preziose informazioni sullo stato di avanzamento della malattia diabetica e delle sue complicanze.

Francesco Purrello

MicroRNA circolanti: nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici nel diabete mellito

Guido Sebastiani¹, Laura Nigi²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche e Neuroscienze, U.O. Diabetologia, Università degli Studi di Siena; ²Fondazione Umberto Di Mario Onlus, TLS-Toscana Life Sciences, Siena

INTRODUZIONE

La scoperta di nuovi biomarcatori, costituisce ad oggi una sfida per la predizione, la diagnosi precoce e per il follow-up di pazienti affetti da diabete mellito al fine di prevenirne le complicanze e per sviluppare le migliori strategie diagnostiche e terapeutiche. Purtroppo, l'identificazione di nuovi biomarcatori in ambito diabetologico è resa difficile dall'assenza di specifiche molecole che, da un lato siano facilmente individuabili e misurabili in modo non-invasivo e, dall'altro, forniscano informazioni dettagliate sullo stato delle isole pancreatiche e degli altri organi e tessuti coinvolti in tale patologia.

Recentemente, è stata individuata una nuova classe di molecole, i microRNA, presenti all'interno della maggior parte delle cellule del nostro organismo e che potrebbero rappresentare degli ideali biomarcatori. Essi, all'interno delle cellule, hanno la funzione di inibire l'espressione dei geni che codificano per proteine e, perciò, partecipano attivamente alla regolazione di molti processi cellulari. La loro alterazione è stata osservata in molte patologie, rendendoli degli importanti target terapeutici. Inoltre, è stato scoperto che i microRNA possono essere secreti dalle cellule che li producono ed essere misurati nel sangue periferico. Questa caratteristica, li ha resi degli ottimi candidati come biomarcatori

periferici per diverse malattie, in quanto potrebbero potenzialmente rivelare in periferia le alterazioni eventualmente presenti nei tessuti colpiti da un determinato processo patologico.

In questo articolo, ci proponiamo di approfondire il concetto di microRNA come regolatori di funzioni fondamentali all'interno delle isole pancreatiche sia in condizioni normali che patologiche e di microRNA circolanti come futuri biomarcatori per la diagnosi precoce del diabete mellito.

COSA SONO I microRNA?

MESSAGGI CHIAVE

- I microRNA sono delle piccole sequenze di RNA (circa 20-22 nucleotidi) che non codificano proteine. La loro funzione è invece quella di regolare (prevalentemente inibire) gli RNA prodotti dai geni classici, impedendo che questi vengano usati per la sintesi delle proteine.
- Sebbene costituiscano soltanto l'1% dell'intero genoma umano, sono ritenuti responsabili della regolazione di circa il 50% del patrimonio genetico. Ciascun microRNA può potenzialmente inibire l'espressione di molti geni, mentre ogni RNA messaggero può essere bersaglio di più microRNA, creando in tal modo una complessa rete di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica.

I microRNA, scoperti per la prima volta nel 1993, rappresentano una classe di piccoli RNA non codificanti per proteine, costituiti da un singolo filamento della lunghezza di circa 20-22 nucleotidi. Essi regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, sia negli organismi animali che vegetali, tramite l'inibizione della traduzione in proteine dell'RNA messaggero o tramite la sua degradazione.

Negli ultimi anni è stata dimostrata la loro importanza nella regolazione di varie funzioni cellulari quali l'apoptosi, la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo embrionale e la "comunicazione" tra cellule.

Nell'uomo sono stati identificati più di 1500 microRNA, il cui numero è destinato a crescere; essi sono ritenuti responsabili della regolazione di circa il 50% del patrimonio genetico sebbene costituiscano soltanto l'1% dell'intero genoma umano (1).

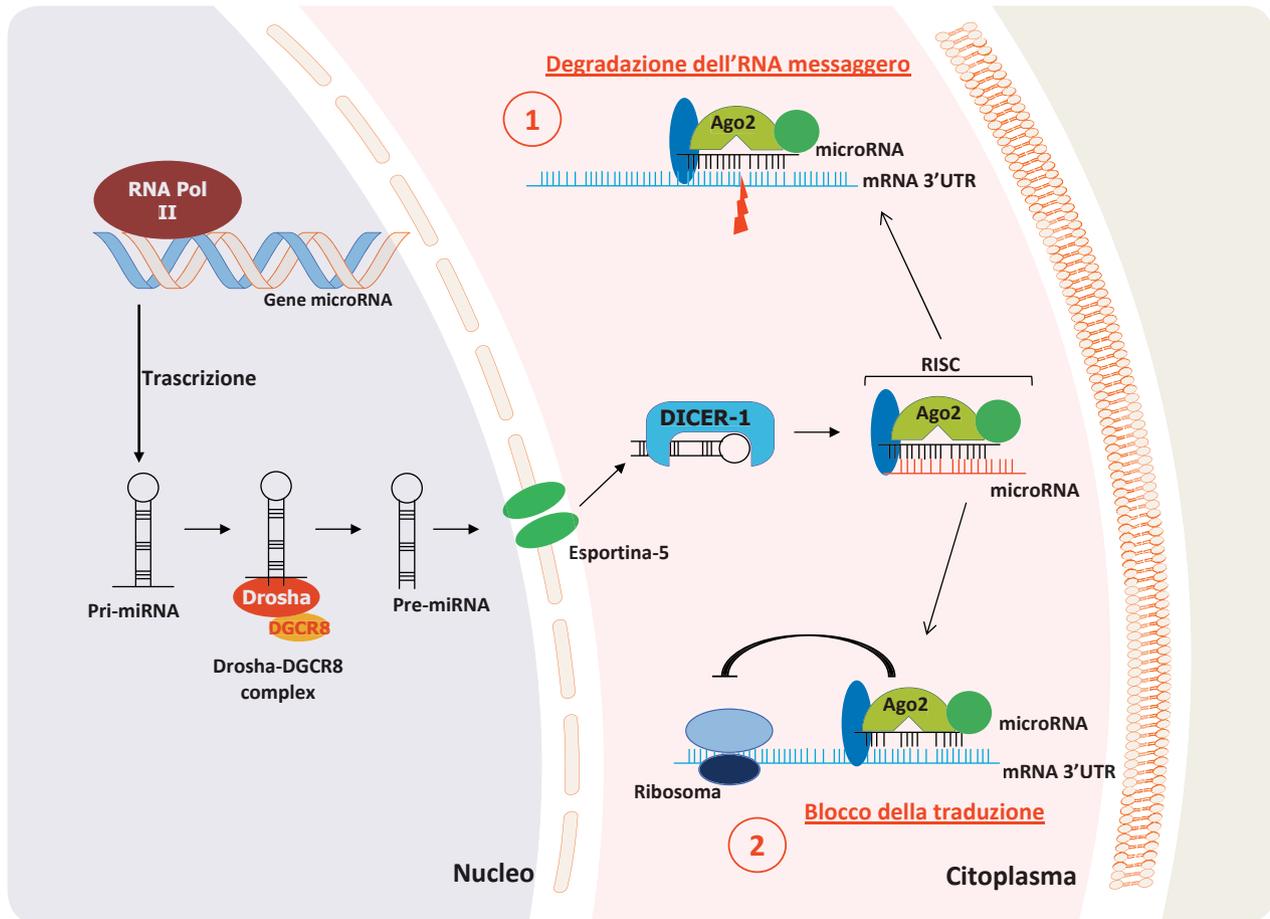
Le varie tappe di maturazione nel processo di biogenesi dei microRNA avvengono in parte nel nucleo e in parte nel citoplasma cellulare. A livello del nucleo, i microRNA vengono trascritti dall'enzima RNA polimerasi II a partire dai propri geni (2); la prima struttura non matura, prodotta in seguito alla trascrizione del gene del microRNA, viene chiamata pri-microRNA e viene processata nel nucleo cellulare dall'enzima ribonucleasi di tipo III (RNAsi III), Drosha, dando origine ai precursori dei microRNA (pre-microRNA), costituiti da circa 70 nucleotidi. L'RNAsi III Drosha per svolgere la sua funzione, necessita di un cofattore, la proteina DGCR8 (l'acronimo per DiGeorge Syndrome Critical Region 8), fondamentale per la maturazione dei microRNA.

I pre-microRNA vengono trasportati dal nucleo al citoplasma tramite la proteina Exportina-5 (uno dei recettori nucleari responsabili del trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma) e vengono processati ad opera dell'enzima RNAsi III-Dicer, a formare i microRNA maturi a doppio filamento, ciascuno comprendente circa 22 nucleotidi. I microRNA, affinché siano completamente maturi e funzionanti necessitano della separazione dei due filamenti complementari e dell'unione di un singolo filamento selezionato ad un complesso proteico (RISC- RNA-Induced Silencing Complex), principalmente costituito dalle cosiddette proteine Argonate, la cui funzione è quella di mediare l'inibizione dell'espressione genica guidata dal microRNA stesso.

L'attività di inibizione dell'espressione genica post-trascrizionale da parte dei microRNA, avviene esclusivamente in seguito alla loro incorporazione nel complesso proteico di silenziamento RISC (3). Tale attività si verifica nel momento in cui il microRNA, insieme al complesso RISC, tramite la sua sequenza specifica, si appaia a regioni particolari dell'RNA messaggero bersaglio. Il meccanismo di inibizione dell'espressione genica può essere mediato dal blocco della traduzione dell'RNA messaggero oppure dalla sua diretta degradazione da parte del complesso RISC. La scelta del mec-

Figura 1 ♦ **Processo di trascrizione e maturazione dei microRNA all'interno di una cellula**

L'attività di inibizione dell'espressione genica può svolgersi attraverso la diretta degradazione dell'RNA messaggero (1), in seguito ad un completo appaiamento del microRNA alla sequenza bersaglio, oppure attraverso blocco della traduzione proteica dell'RNA (2) in conseguenza di un parziale o incompleto appaiamento



canismo è strettamente dipendente dal tipo di appaiamento (completo o incompleto) del microRNA alla sequenza di riconoscimento (Fig. 1).

Da notare che ciascun microRNA può potenzialmente inibire l'espressione di molti geni, mentre ogni RNA messaggero può essere bersaglio di più microRNA creando una complessa rete di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica (3). In tal modo, la presenza dei microRNA risulta strettamente necessaria per il controllo dell'espressione genica e, di conseguenza, per l'omeostasi di interi processi cellulari come l'apoptosi, il differenziamento ed il ciclo cellulare.

MicroRNA E DIABETE

MESSAGGI CHIAVE

Ruolo dei microRNA

- Negli ultimi anni è stata dimostrata la loro importanza nella regolazione di varie funzioni cellulari quali l'apoptosi, la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo embrionale e la "comunicazione" tra cellule. Alcune evidenze sperimentali hanno associato i microRNA ad aterosclerosi, patologie cardiovascolari e diabete mellito tipo 2 (DM2). In particolare, alcuni microRNA

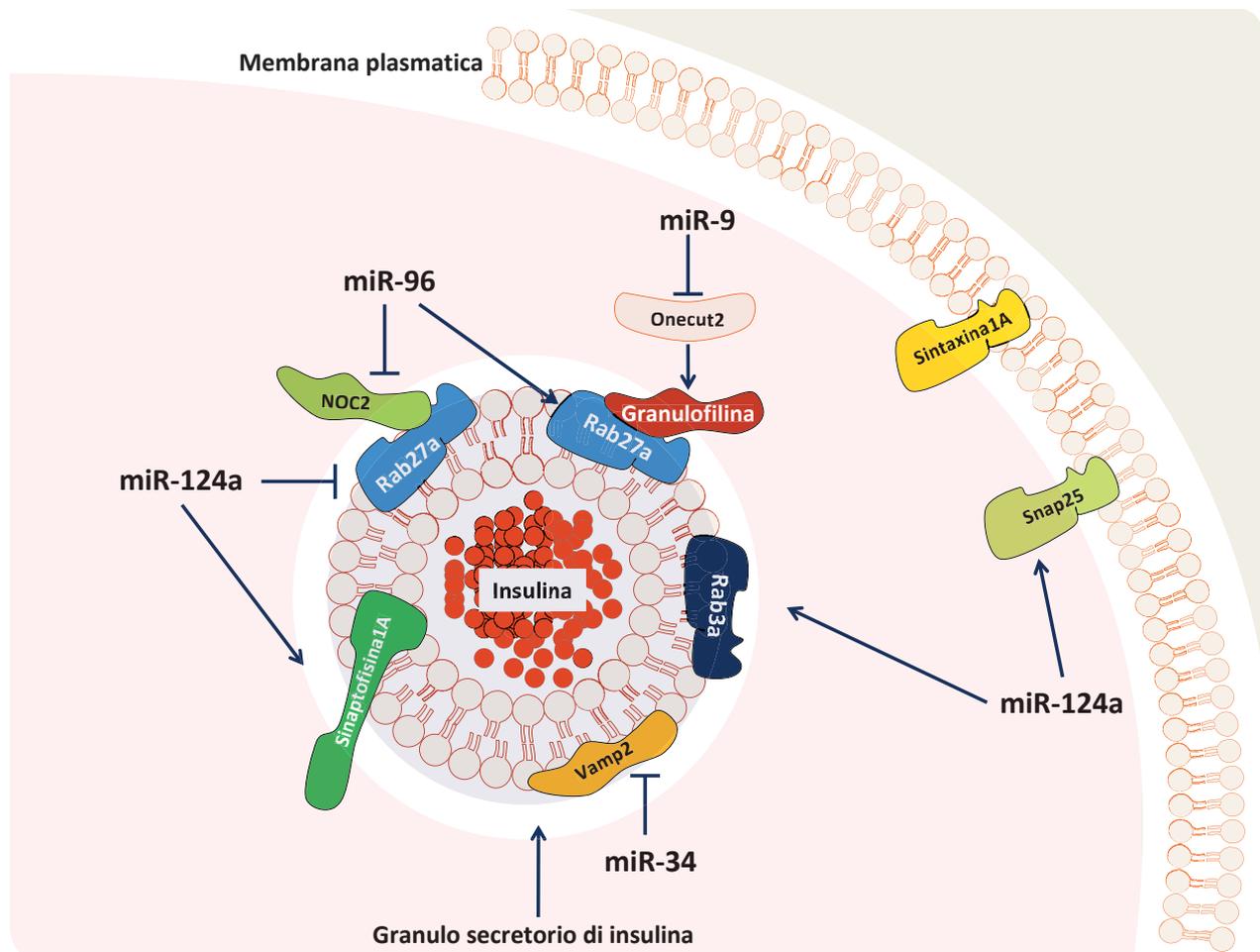
sono ritenuti fondamentali per il corretto funzionamento delle beta-cellule pancreatiche e dei tessuti bersaglio dell'insulina. Ad esempio, il miR-375 è un microRNA la cui espressione è particolarmente elevata e specifica a livello delle isole pancreatiche; esso è coinvolto nella regolazione della secrezione insulinica e nel controllo dell'espansione della massa beta-cellulare.

- Oltre al mantenimento di una corretta funzione delle isole pancreatiche, i microRNA sono coinvolti anche nell'omeostasi del sistema immunitario. Infatti, è stato dimostrato che alcuni microRNA sono degli importanti regolatori sia dello sviluppo del sistema immunitario che della risposta immunitaria.

Il coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi di diverse malattie è stato ampiamente confermato in letteratura (2). I dati più consistenti provengono dagli studi sul cancro. Infatti, è stato dimostrato che circa il 50% dei geni codificanti per i microRNA nel genoma umano sono localizzati in regioni classicamente associate alla tumorigenesi o comunque in siti fragili all'interno dei cromosomi. Esistono, tuttavia, evidenze sperimentali che associano i microRNA anche alla regolazione di diverse funzioni nell'ambito del sistema immunitario e, quindi, allo sviluppo di malattie a patogenesi immuno-mediata (4) come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la sclerosi multipla e il diabete

Figura 2 ♦ I microRNA regolano la secrezione insulinica

I microRNA sono in grado di regolare l'espressione di geni codificanti per proteine coinvolte nel processo di fusione del granulo di insulina alla membrana plasmatica. Al processo di regolazione partecipano diversi microRNA (miR-124a, miR-34, miR-96, miR-9) che direttamente o indirettamente, inibiscono o attivano la funzione di alcuni geni coinvolti nella secrezione



tipo 1 (DM1) (5), oppure a disordini metabolici e quindi nello sviluppo ad esempio di aterosclerosi, patologie cardiovascolari e diabete mellito tipo 2 (DM2) (6-7).

I microRNA sono fondamentali per il corretto funzionamento delle isole pancreatiche. In particolare la funzione delle beta-cellule e dei tessuti bersaglio dell'insulina è in parte determinata dall'espressione di specifici microRNA. Molti di questi sono comunemente espressi in diversi tessuti all'interno dell'organismo, con alcune importanti eccezioni. Il miR-375 è un microRNA la cui espressione è particolarmente elevata e specifica a livello delle isole pancreatiche; esso è coinvolto nella regolazione della secrezione insulinica e nel controllo dell'espansione della massa beta-cellulare. È stato dimostrato che l'iper-espressione del miR-375 in linee murine di beta-cellule, nonché in isole pancreatiche umane e di roditore, regola negativamente la secrezione insulinica glucosio-indotta, principalmente attraverso il controllo dell'espressione della miotrofina, una proteina coinvolta nell'esocitosi del granulo secretorio (8), mentre induce una riduzione della proteina PDK1 (3'phosphoinositide-dependent protein kinase-1), comportando una diminuzione nell'azione stimolatoria da parte del glucosio sull'espressione del gene dell'insulina e sulla sintesi di DNA. Inoltre, è stato osservato che topi omozigoti per la delezione del gene codificante il miR-375 presentano iperglicemia cronica, riconducibile principalmente alla riduzione della massa beta-cellulare e dei livelli di insulina (9).

Anche altri microRNA sembrano partecipare al processo di secrezione insulinica tramite il controllo dei livelli di espressione di alcuni componenti chiave del meccanismo di esocitosi. Tra questi il miR-124a, espresso nelle beta-cellule e nelle cellule nervose. Esso è principalmente coinvolto nel processo di sviluppo embrionale delle isole pancreatiche attraverso la regolazione del fattore di trascrizione FOXA2 (coinvolto nella differenziazione beta-cellulare), ma risulta anche implicato nel processo di secrezione dell'insulina tramite la regolazione di geni quali la miotrofina e la GTPasi RAB27A (10). È stato dimostrato che anche altri microRNA possono regolare il processo di secrezione insulinica, bersagliando geni con diverse funzioni ed operanti in vari stadi del processo di esocitosi (Fig. 2).

L'avvento delle nuove piattaforme di screening dei microRNA ha messo in evidenza l'importanza dell'identificazione di una loro alterata espressione a livello tissutale. Nelle isole pancreatiche di donatori multi-organo affetti da DM2 sono state osservate alterazioni dell'espressione di alcuni microRNA che probabilmente contribuiscono alle disfunzioni beta-cellulari spesso osservate in questi pazienti. In particolare, è stata dimostrata l'alterazione dell'espressione di un intero *cluster* di microRNA (i cui geni sono situati nel locus DLK1-MEG3) che sono specificamente ipo-espressi nelle beta-cellule di donatori DM2 e che regolano geni coinvolti nell'apoptosi (TP53INP1) e nella produzione di amiloide (IAPP), portando ad un aumento dei fenomeni di morte cellulare e quindi ad una riduzione della massa beta-cellulare (11).

L'alterazione dei profili di espressione dei microRNA è stata inoltre osservata in isole pancreatiche di donatori multi-organo che presentavano una ridotta tolleranza al glucosio (12). In questo caso, gli autori hanno individuato alcuni microRNA (miR-375, miR-184, miR-127a) la cui espressione in soggetti privi di alterazioni a carico del metabolismo glucidico era correlata positivamente alla biosintesi dell'insulina (miR-375, miR-127a) e negativamente alla secrezione insulinica glucosio-indotta (miR-184). Tali correlazioni non si evidenziavano invece nei soggetti con ridotta tolleranza al glucosio (HbA1c>6,1), dimostrando un ruolo attivo dei microRNA nei processi coinvolti nella funzionalità dell'unità gluco-sensoria (12).

L'alterazione dell'espressione dei microRNA è stata riscontrata anche in isole pancreatiche provenienti da modelli animali di diabete autoimmune. In particolare, diversi studi hanno dimostrato un aumento dell'espressione di alcuni microRNA in isole di topi NOD (Non-Obese Diabetic) prediabetici; tra i microRNA iper-espressi sono stati identificati il miR-146, il miR-34, il miR-29 e il miR-21 i quali influiscono in maniera fortemente negativa sulla funzione e sulla vitalità delle beta-cellule. Inoltre, l'espressione di tali microRNA può essere indotta in vitro in varie linee beta-cellulari, nonché in isole pancreatiche, in seguito a trattamento con citochine pro-infiammatorie, dimostrando come essi possano anche rappresentare dei mediatori del danno infiammatorio riscontrabile nel DM1 (13).

Oltre al mantenimento di una corretta funzione delle isole pancreatiche, i microRNA sono coinvolti anche nell'omeostasi del sistema immunitario. Infatti, è stato dimostrato che alcuni microRNA sono degli importanti regolatori sia dello sviluppo del sistema immunitario che della risposta immunitaria. Per esempio, nei linfociti T, una corretta

espressione del miR-155 è necessaria per un adeguato differenziamento e per un'ottimale attivazione di tali cellule. Infatti, è stato dimostrato che topi transgenici mancanti del miR-155 mostravano sintomi di immunodeficienza e difetti nella funzione dei linfociti B, T e delle cellule dendritiche (14). Altri microRNA, come quelli facenti parte del cluster miR-17-92, sono fondamentali per lo sviluppo dei linfociti B ed una loro alterazione è in grado di generare disordini autoimmunitari (es. DM1, sclerosi multipla, encefalomielite autoimmune) (15).

Recentemente, diversi studi hanno dimostrato un'alterazione dell'espressione dei microRNA in cellule del sistema immunitario provenienti dal sangue periferico (PBL) di pazienti affetti da DM1. In uno studio del 2011 abbiamo analizzato i livelli di espressione del miR-326 a livello dei linfociti estratti dal sangue periferico di pazienti con diabete tipo 1, con e senza positività anticorpale (anti decarbossilasi dell'acido glutammico e anti proteina tirosin-fosfatasi IA-2). I livelli di miR-326, già descritti come iperespressi a livello linfocitario nell'ambito della sclerosi multipla e correlati con la gravità di malattia, risultavano incrementati nei pazienti con positività anticorpale rispetto a quelli con anticorpi negativi (15). Più recentemente, sono stati identificati ben 44 microRNA la cui alterazione nei PBL era associata alla presenza di diabete autoimmune, rafforzando l'ipotesi di un coinvolgimento dei microRNA anche a livello del sistema immunitario in presenza di DM1 (16).

I microRNA CIRCOLANTI

MESSAGGI CHIAVE

- Oltre a svolgere un ruolo nella regolazione dell'espressione genica all'interno delle cellule che li producono, alcuni microRNA possono essere secreti e quindi possono essere trovati nella maggior parte dei fluidi biologici (ad es. plasma, siero, saliva, urine).
- Nella pratica clinica, così come enzimi, isoenzimi e proteine, anche i microRNA potrebbero essere utilizzati come biomarcatori per la diagnosi, la prognosi e la risposta al trattamento in molte patologie, tra cui il diabete e le sue complicanze coniche. Resta ancora da chiarire con esattezza l'origine dei microRNA circolanti. Al momento si alternano due ipotesi principali: la prima sostiene che i microRNA vengono passivamente rilasciati in circolo da parte di cellule appartenenti a tessuti che hanno subito un danno; la seconda ipotesi, invece, prevede la secrezione attiva dei microRNA all'interno di microvescicole.

Oltre a svolgere un ruolo nella regolazione dell'espressione genica all'interno delle cellule che li producono, alcuni microRNA possono essere secreti e quindi possono essere trovati nella maggior parte dei fluidi biologici (plasma, siero, saliva, urine, liquido seminale, latte materno, liquido amniotico, liquido cefalo-rachidiano, liquido pleurico e peritoneale ecc.).

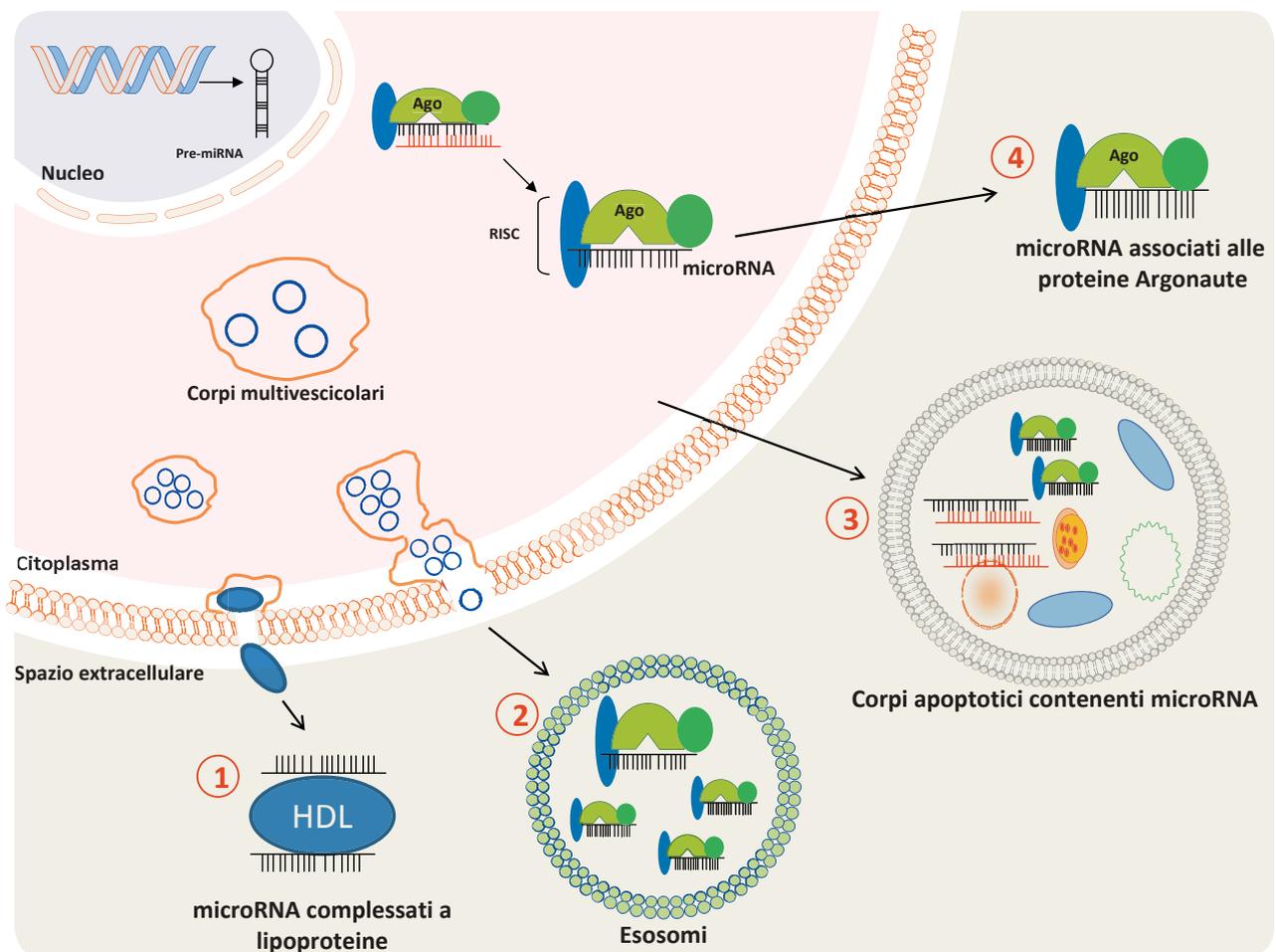
Nella pratica clinica, così come enzimi, isoenzimi e proteine, anche i microRNA potrebbero essere utilizzati come biomarcatori per la diagnosi, la prognosi e la risposta al trattamento in molte patologie, tra cui il diabete e le sue complicanze coniche, come viene ampiamente suggerito in ambito oncologico. La presenza dei microRNA nei fluidi biologici è stata descritta per la prima volta nel 2008 da Chim et al. che hanno dosato, nel plasma materno, specifici microRNA placentari (17) e da Latrie et al. che hanno rilevato la presenza di microRNA tumore-associati nel siero di pazienti con linfoma a cellule B diffuso (18).

I microRNA possono circolare nel sangue complessati alle proteine Argonaute, a particelle HDL (High Density Lipoprotein) (19) oppure all'interno di vescicole. In tal modo, essi sono protetti dalla degradazione ad opera degli enzimi ribonucleasi, abbondantemente presenti nel siero (3, 19), e perciò risultano molto stabili. Tuttavia è ancora da chiarire con esattezza l'origine dei microRNA circolanti. Al momento si alternano due ipotesi principali: la prima sostiene che i microRNA vengono passivamente rilasciati in circolo da parte di cellule appartenenti a tessuti che hanno subito un danno (un esempio è il miRNA-208 che è tipicamente espresso a livello del miocardio e che può essere rilevato a livello sierico in seguito ad una lesione tissutale cardiaca) e che risultano complessati a proteine argonaute; la seconda ipotesi, invece, prevede la secrezione attiva dei microRNA all'interno di microvescicole (Fig. 3). Esistono tre diversi tipi

di vescicole contenenti microRNA: i corpi apoptotici, le vescicole di fusione e gli esosomi. Questi ultimi derivano dai corpi multivescicolari citoplasmatici la cui formazione ed il conseguente rilascio possono essere indotti da stimoli extracellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche (20). Essi sembrano svolgere diverse funzioni biologiche come la presentazione dell'antigene, il trasporto di RNA e proteine e la comunicazione cellula-cellula (19, 21). È possibile quindi ipotizzare che i microRNA possano essere appositamente secreti, trasportati alla cellula/tessuto bersaglio e rilasciati tramite la fusione degli esosomi con la membrana plastica della cellula ricevente (oppure tramite il legame a specifici recettori), in modo da poter svolgere la loro funzione di regolazione dell'espressione genica a livello degli RNA messaggero bersaglio anche a "distanza" dalla cellula produttrice (21-23). Una terza ipotesi, che si aggiunge alle precedenti, sostiene infine che i microRNA circolanti potrebbero derivare dalle cellule presenti nel torrente circolatorio come reticolociti, linfociti B/T ecc. (24).

Figura 3 ♦ I microRNA vengono secreti dalle cellule

La secrezione dei microRNA può avvenire attraverso diverse modalità: (1) essi possono essere secreti dalle cellule complessati a lipoproteine (HDL) ed essere trasportati in circolo attraverso questa modalità; (2) possono essere inglobati negli esosomi e secreti dalle cellule in seguito alla formazione dei corpi multivescicolari; (3) in seguito alla formazione dei corpi apoptotici, in conseguenza della morte cellulare, i microRNA insieme ad altri residui intracellulari, vengono incorporati in queste particolari vescicole e rilasciati in circolo; (4) i microRNA in complesso con le proteine Argonaute vengono secreti dalle cellule per fusione di vescicole intracellulari alla membrana plasmatica



MICRORNA CIRCOLANTI E DIABETE

Esistono ad oggi pochi studi pubblicati in letteratura, sull'espressione dei microRNA nel siero/plasma di soggetti affetti da diabete mellito. Per quanto riguarda il DM2, in uno studio prospettico del 2010 sono stati determinati i livelli di espressione plasmatica dei microRNA in una popolazione di 800 soggetti, di cui 80 con DM2 all'inizio dello studio e 19 che lo svilupparono nel corso dei successivi 10 anni di follow-up. Tale studio ha portato all'identificazione di 13 microRNA che risultavano essere differenzialmente espressi nei soggetti diabetici, di cui 5 (miR-15a, miR-126, miR-320, miR-223, miR-28-3p) già alterati prima della manifestazione della malattia. La determinazione dell'alterazione dell'espressione dei microRNA appartenenti a questo cluster era sufficiente all'identificazione di circa il 70% dei soggetti con DM2 (25). Inoltre, l'alterazione dell'espressione di tali 5 microRNA permetteva di predire l'insorgenza della patologia in circa il 52% dei soggetti inizialmente reclutati come normoglicemici e che la svilupparono nel corso del follow-up, dimostrando la qualità dei microRNA come biomarcatori diagnostici. Altri autori hanno successivamente confrontato il profilo di espressione dei 5 microRNA precedentemente descritti e differenzialmente espressi in soggetti suscettibili allo sviluppo di DM2, nel plasma di pazienti con DM2 o con alterata glicemia a digiuno rispetto a soggetti di controllo. Dai risultati dello studio è emerso che i livelli plasmatici del microRNA miR-126 risultavano significativamente ridotti nei pazienti con DM2 e con alterata glicemia a digiuno rispetto ai controlli (26).

In un altro studio sono stati arruolati 56 soggetti, suddivisi in tre gruppi (19 soggetti normoglicemici, suscettibili allo sviluppo di DM2, 19 soggetti con alterata glicemia a digiuno e/o ridotta tolleranza ai carboidrati e 18 soggetti con DM2 neodiagnosticato) allo scopo di valutare il significato clinico dell'espressione a livello sierico di 7 microRNA coinvolti nella patogenesi del DM2. L'analisi dei risultati ha dimostrato che tutti i 7 microRNA risultavano iper-espressi nei soggetti diabetici rispetto ai normoglicemici e che 5 erano iper-espressi rispetto ai soggetti pre-diabetici (27). Nel 2012, invece, Karolina et al., in uno studio il cui scopo era quello di caratterizzare il profilo di espressione dei microRNA nel sangue e negli esosomi di 265 pazienti con sindrome metabolica, hanno osservato l'iper-espressione dei microRNA miR-150, miR-192, miR-375, miR-27a e miR-320a in una coorte di pazienti con DM2 (28). Recentemente, è stato pubblicato uno studio che suggerisce il ruolo predittivo del microRNA miR-146a nella diagnosi di DM2. Infatti, gli autori hanno osservato un'iper-espressione di tale microRNA nel plasma di 90 pazienti diabetici neodiagnosticati rispetto a 90 soggetti di controllo. Il miR-146a potrebbe contribuire alla patogenesi del DM2 poiché coinvolto nell'espressione dell'enzima eme ossigenasi-1 (HO-1), e quindi, indirettamente nello stress ossidativo causato dal metabolismo del ferro, che sappiamo essere implicato nello sviluppo del DM2 (29). Infine, uno studio pubblicato molto recentemente ha valutato il profilo di espressione di 14 microRNA nel plasma di 152 soggetti, 84 nati in Iraq e poi trasferiti in Svezia e 68 nati in Svezia ed ivi residenti, di cui 19 appartenenti al primo gruppo e 14 appartenenti al secondo gruppo con DM2. Considerando la popolazione totale in studio, i microRNA plasmatici miR-24 e miR-29b sono risultati iper-espressi nei pazienti con DM2 rispetto ai controlli, mentre, suddividendo i partecipanti allo studio in base al paese d'origine, il miR-144 è risultato significativamente più elevato nel plasma dei pazienti nati in Svezia e affetti da DM2 (30).

In riferimento al diabete di tipo 1, in uno studio del 2012, abbiamo confrontato il profilo di espressione dei microRNA circolanti di 20 pazienti con DM1 alla diagnosi, con quello di soggetti di controllo ed abbiamo dimostrato che dei 206 microRNA rilevati nel siero, 64 risultavano differenzialmente espressi nei pazienti con DM1. Tali microRNA risultano implicati nella regolazione della funzione beta-cellulare e di cellule appartenenti al sistema immunitario (31). Nielsen et al. hanno invece confrontato il profilo di espressione dei microRNA nel siero di bambini affetti da DM1 e di soggetti di controllo ed hanno individuato 12 microRNA (tra i quali alcuni implicati nel processo di apoptosi delle beta cellule) che risultavano iper-espressi nei pazienti diabetici (miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210, miR-27a, miR-29a, miR-26a, miR-27b, miR-25, miR-200a). Inoltre, i livelli circolanti del miR-25, erano correlati con la funzione beta-cellulare residua (valutata tramite la misurazione del c-peptide) e con un controllo glicemico adeguato (valutato tramite la determinazione dei livelli di emoglobina glicata) a tre mesi dall'insorgenza di malattia (32).

Recentemente, uno studio su un modello animale di diabete autoimmune (topo NOD), ha dimostrato il potenziale ruolo del miR-375 (specificamente ed abbondantemente espresso nelle isole pancreatiche) come biomarcatore per la ri-

levazione della distruzione beta-cellulare. Gli autori hanno dimostrato che i livelli plasmatici di tale microRNA erano molto alti nelle 2 settimane che precedevano l'insorgenza della patologia in topi NOD. Inoltre, la distruzione, sperimentalmente indotta, delle beta-cellule in topi normali, ha portato ad un drastico aumento plasmatico del miR-375 dimostrando la diretta provenienza di tale microRNA dalla distruzione delle beta-cellule. Tali dati suggeriscono un potenziale ruolo del miR-375 nel rilevare possibili danni a carico delle isole pancreatiche, già prima dell'esordio clinico della malattia e potrebbe quindi essere utilizzato in futuro come biomarcatore per il DM1 (33).

MicroRNA CIRCOLANTI E COMPLICANZE CRONICHE DEL DIABETE

MESSAGGI CHIAVE

- Per quanto riguarda il DM2, sono stati identificati alcuni microRNA che risultavano essere differenzialmente espressi nei soggetti diabetici, di cui alcuni già alterati nei soggetti con pre-diabete, quindi prima della manifestazione clinica della malattia.
 - Per quanto riguarda il DM1, alcuni microRNA coinvolti nella regolazione della funzione beta-cellulare e di cellule appartenenti al sistema immunitario, e nel processo di apoptosi, sono risultati iper-espressi nei soggetti diabetici rispetto ai controlli.
 - Alcuni studi hanno anche trovato un'alterazione dell'espressione di alcuni microRNA nei pazienti con complicanze macro- e microvascolari, rispetto a quelli senza complicanze.
-

Alcuni studi hanno correlato la presenza delle complicanze del diabete all'alterazione dell'espressione sierica/plasmatica dei microRNA. Nello studio condotto da Zampetaki et al., citato in precedenza, è stato osservato che i ridotti livelli plasmatici di miR-126 (microRNA che sembra svolgere un'importante funzione nell'integrità delle strutture vascolari) in pazienti con DM2, correlavano con la presenza di vasculopatia (25). Caporali et al. hanno descritto invece una iper-espressione del miR-503 nel plasma di pazienti diabetici con ischemia vascolare periferica (34); inoltre, tale microRNA, era risultato iperespresso a livello muscolare in ratti diabetici con ischemia periferica. Infine, in uno studio pubblicato nel 2013 abbiamo analizzato il profilo di espressione di 384 microRNA nel siero di pazienti affetti da DM2 con e senza complicanze croniche. I risultati hanno indicato un'alterazione dell'espressione dei microRNA nei pazienti con complicanze macro- e microvascolari, rispetto a quelli senza complicanze. In particolare, il miR-31 è risultato iper-espresso nei pazienti con complicanze microvascolari rispetto agli altri due gruppi (35); dati presenti in letteratura suggeriscono che tale microRNA potrebbe essere implicato nella permeabilità dei vasi e nell'angiogenesi, rivelando un suo possibile ruolo nel danno vascolare in corso di diabete.

DOSAGGIO DEI microRNA CIRCOLANTI

Attualmente, sono disponibili diverse metodiche che permettono la misurazione (specifica o in massa) dei microRNA. Tra queste spiccano certamente la PCR (Polymerase Chain Reaction), ed il sequenziamento di nuova generazione (NGS miRNA-seq). La misurazione dei microRNA circolanti prevede il medesimo procedimento comunemente utilizzato per il dosaggio dei microRNA cellulari (estrazione dell'RNA, produzione di cDNA, analisi attraverso PCR o RNAseq). Tuttavia, la preparazione del campione su cui effettuare la misurazione, risulta essere un passaggio di fondamentale importanza, soprattutto per quanto riguarda siero o plasma derivanti da sangue periferico. È stato dimostrato che i livelli di espressione dei microRNA circolanti possono variare considerevolmente in relazione a fattori pre-analisi che riguardano la preparazione del campione di siero o plasma. Uno dei fattori fondamentali nella preparazione del campione è la separazione, attraverso centrifugazione, della parte corpuscolata del sangue dalla parte liquida di interesse. In questo caso, essendo i microRNA trasportati mediante diverse modalità nel circolo sanguigno, la velocità di centrifugazione potrebbe influenzare notevolmente la presenza di alcuni microRNA a discapito di altri.

La valutazione dell'esame emocromocitometrico, risulta essere anch'essa di fondamentale importanza; infatti, variazioni considerevoli della presenza di particolari tipi di cellule del sangue potrebbero influenzare l'espressione di alcuni specifici microRNA.

Infine, altro parametro da tenere in considerazione, è il livello di emolisi del campione da analizzare che potrebbe portare ad un'elevata contaminazione nel siero/plasma di microRNA intracellulari.

CONCLUSIONI

I microRNA circolanti potrebbero offrire un importante contributo alla diagnosi, alla prognosi e all'identificazione dei soggetti a rischio per lo sviluppo di molte malattie, in quanto possiedono molte caratteristiche attribuibili ad un biomarcatore ideale.

Attualmente, molti kit in commercio consentono di effettuare il dosaggio dei microRNA sia su plasma che su siero, dove si mantengono piuttosto stabili e risultano particolarmente resistenti a valori estremi di pH, a temperature di ebollizione, a multipli cicli di congelamento-scongelo e a lunghi periodi di conservazione (24). Inoltre, alcuni microRNA sono altamente tessuto-specifici e peculiari nell'ambito di determinate patologie, pertanto la ricerca della loro espressione a livello sierico sta prendendo sempre più piede, come indicano gli innumerevoli studi in campo oncologico, nella diagnosi precoce, nella prognosi e nell'andamento di malattia.

In riferimento al diabete ma anche alla fase che precede l'insorgenza di malattia, l'utilizzo dei microRNA come biomarcatori, che permettano di effettuare la diagnosi o l'identificazione di soggetti a rischio per lo sviluppo della malattia ancor prima della loro manifestazione clinico-strumentale, potrebbe svolgere un ruolo fondamentale. Nell'ambito ancor più specifico delle complicanze croniche del diabete, che rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità dei pazienti affetti da tale patologia, una diagnosi precoce potrebbe senz'altro contribuire a prevenire o limitare i danni a carico degli organi bersaglio, con un enorme impatto sul miglioramento della qualità della vita dei pazienti che ne risultano affetti. Attualmente infatti non sono presenti dei biomarcatori sierici/plasmatici in grado di identificare la presenza delle varie complicanze del diabete, o ancor meglio di anticiparne la diagnosi rispetto alle indagini strumentali o alla comparsa delle manifestazioni cliniche.

Tuttavia un'importante sfida per il futuro sarà quella di confermare i dati emersi da studi condotti sul dosaggio dei microRNA in piccole popolazioni, in popolazioni più ampie determinando, in tal modo, l'impronta digitale certa dei microRNA circolanti durante il diabete.

Al momento restano ancora molte domande: non si conoscono le funzioni svolte da molti dei microRNA circolanti e non sempre esiste una correlazione tra i livelli di certi microRNA a livello tissutale e a livello sierico/plasmatico. Non sappiamo quanto rapidamente le eventuali modifiche dei livelli circolanti dei microRNA che in teoria rispecchiano quelle a livello tissutale, si verifichino (22). Inoltre, sebbene sia già possibile dosare in maniera accurata i microRNA circolanti, ancora non esistono dei protocolli altamente standardizzati che permettano di trovare un punto di incontro a livello tecnico tra diversi laboratori, generando, in tal modo, risultati anche diversi tra loro (22, 24).

In conclusione, i microRNA circolanti rappresentano degli ottimi candidati a divenire ideali biomarcatori che permettano di predire l'insorgenza del diabete e di poterne seguire l'andamento nel tempo e di individuare, anzitempo, le complicanze prima della loro manifestazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Hussain M. Ul. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* 349: 405-413, 2012.
2. Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics* 15(1): 1-19, 2012.
3. Guay C, Roggli E, Nesca V et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational Research* 157: 253-264, 2011.
4. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews* 10: 111-122, 2010.

5. Sebastiani G, Vendrame F, Dotta F. MicroRNAs as new tools for exploring type-1 Diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy. *Transplantation Proceedings* 43(1): 330-332, 2011.
6. Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in β -Cell Biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes* 60: 1825-1831, 2011.
7. Rottiers V, Näär A M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 239-250, 2011.
8. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432(7014): 226-230, 2004.
9. Poy MN, Spranger M, Stoffel M. MicroRNA and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 67-73, 2007.
10. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK et al. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 282(27): 19575-19588, 2007.
11. Kameswaran V, Bramswig NC, McKenna LB. Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell Metabolism* 19(1): 135-145, 2014.
12. Bolmeson C, Esguerra JL, Salehi A. Differences in islet-enriched miRNAs in healthy and glucose intolerant human subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 404(1): 16-22, 2011.
13. Roggli E, Gattesco S, Caille D. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 61(7): 1742-1751, 2012.
14. Seddiki N, Brezar V, Ruffin N. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology*. [Epub ahead of print], 2013.
15. Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev* 27(8): 862-866, 2011.
16. Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene* 1119(14): 152-158, 2014.
17. Chim SS¹, Shing TK, Hung EC et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 54: 482-490, 2008.
18. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 141: 672-675, 2008.
19. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences* 37(11): 460-465, 2012.
20. Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet* 3: 56, 2012.
21. Ajit S. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signalling molecules. *Sensors* 12(3): 3359-3369, 2012.
22. Brase JC, Wutting D, Kuner R et al. Serum microRNA as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular Cancer* 9: 306, 2010.
23. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 9(9): 513-521, 2013.
24. Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin. Function and application. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 31: 38, 2012.
25. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I et al. Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss of Endothelial MiR-126 and Other MicroRNAs in type 2 Diabetes. *Circulation Research* 107: 810-817, 2010.
26. Zhang T, Lv C, Li L et al. Plasma miR-126 is a potential biomarker for early prediction of type 2 Diabetes Mellitus in susceptible individuals. *BioMed Research International* 2013: 761617, 2013.
27. Kong L, Zhu J, Han W et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetologica* 48: 61-69, 2011.

28. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A et al. Circulating miRNA profiles in patients with Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E2271-E2276, 2012.
29. Rong Y, Bao W, Shan Z et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *PLOS ONE* 8(9): e73272, 2013.
30. Wang X, Sundquist J, Zöller et al. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without Diabetes Mellitus type 2. *PLOS ONE* 9(1): e86792, 2014.
31. Sebastiani G, Spagnuolo I, Patti A et al MicroRNA expression fingerprint in serum of type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 55: S48, 2012.
32. Nielsen LB, Whang C, Sørensen K et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Experimental Diabetes Research* 2012: 896362, 2012.
33. Erener S, Mojibian M, Fox JK et al. Circulating miR-375 as a biomarker of β -cell death and diabetes in mice. *Endocrinology* 154(2): 603-608, 2013.
34. Caporali A, Meloni M, Völlenkle C et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* 123(3): 282-291, 2011.
35. Sebastiani G, Nigi L, Spagnuolo I et al. MicroRNA profiling in sera of patients with type 2 diabetes mellitus reveals an upregulation of miR-31 expression in subjects with microvascular complications. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 6: 58-64, 2013.