

ARTICOLI ORIGINALI

Espressione del miRNA-155 in emodialisi cronica



Paolo Albrizio¹, M. Gnechi M^{2,3}, E. Cervio³, F. Mangione⁴, F. Fiorini⁵, RT. Rampino⁴, C. Libetta^{1,4}, A. Dal Canton^{1,4}

(1) *Cattedra di Nefrologia, Università degli Studi di Pavia, Pavia*

(2) *Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia*

(3) *S.C. di Cardiologia, Servizio di Cure Intensive Coronariche*

(4) *S.C. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto*

(5) *S.O.C. Nefrologia, Dialisi e Dietologia*

Abstract

PREMESSA: I microRNA (miR) sono frammenti di RNA non codificante, regolatori dell'espressione genica a livello post-trascrizionale e svolgono un ruolo essenziale in vari processi fisiopatologici. Scopo di questo studio è stato quello di analizzare l'espressione basale del miR-155 nelle Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) di pazienti cronicamente in emodialisi rispetto a individui sani, prima e dopo seduta emodialitica di 4 ore e dopo stimolazione in terreno di coltura.

METODI: Il miR-155 è stato isolato da PBMC di pazienti in emodialisi e da individui sani. I suoi livelli di espressione sono stati quantificati mediante Real-Time PCR; le reazioni di PCR sono state condotte in duplicato utilizzando apposito termociclatore e i valori di "cycle threshold" (Ct) sono stati calcolati utilizzando apposito software. Il sangue dei pazienti in dialisi cronica è stato prelevato alla fine del periodo interdialitico lungo. I dati sono espressi come M±ES; le significatività statistiche sono state calcolate mediante *t*-test.

RISULTATI: *Relative quantity* (RQ) del miR-155 pre-dialisi era 3,77±0,62 volte maggiore rispetto al gruppo controllo (*P*=0,003), non sono state riscontrate differenze tra inizio e termine della seduta emodialitica. L'RQ del miR-155 pre-dialisi estratto da PBMC stimulate con PHA era 1,79±0,59 volte maggiore rispetto alle cellule non stimulate (*P*=0,019).

CONCLUSIONI: Questi dati preliminari mostrano una significativa regolazione positiva del miR-155 nelle PBMC di pazienti in emodialisi se confrontato con un gruppo di controlli sani e un'ulteriore regolazione positiva nelle cellule coltivate con l'aggiunta di stimolante. Non sono invece state riscontrate differenze statisticamente significative tra pre e post-dialisi.

Parole chiave: Emodialisi, micro RNA, Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), Real time PCR

Micro RNA-155 expression in hemodialysis PBMC

INTRODUCTION: MicroRNAs (miR) are fragments of non-coding RNA acting at post-transcriptional level, which modulate gene expression, and play a key role in several pathophysiological pathways. The aim of this study is to analyze the expression of miR-155 in basal Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) of chronic hemodialysis (HD) patients, before and after standard 4-hour sessions, and after PHA stimulation compared with PBMC from healthy subjects.

METHODS: miR-155 was isolated from chronic HD patients' PBMC and from PBMC derived from healthy subjects. Expression levels were quantified with Real-Time PCR; PCR reactions were performed using a specific thermocycler and cycle threshold levels were calculated using dedicated software. Blood samples were taken from HD patients after the long inter-dialytic interval. Data were expressed as M \pm SE and statistical differences were calculated with t-test.

RESULTS: Relative quantity (RQ) of pre-dialysis MiR-155 was 3.77 \pm 0.62 times higher than the control group (P=0,003). There was no significant difference before and after hemodialysis sessions. Pre-dialysis mir-155 RQ in PHA PBMC was 1.79 \pm 0.59 times higher than non stimulated PBMC (P=0.019).

CONCLUSIONS: these preliminary data show a significant miR-155 up-regulation of HD PBMC when compared to PBMC from healthy individuals. An additional up-regulation was observed in HD PHA PBMC. Similar miR-155 expression was found in HD PBMC comparing pre and post-hemodialysis sessions.

Key words: Hemodialysis

Introduzione

I microRNA (miR) sono frammenti di RNA non codificante a singolo filamento, lunghi circa 20-30 nucleotidi, in grado di agire a livello post-trascrizionale nella modulazione dell'espressione genica, inibendo la traduzione o promuovendo la degradazione dell'mRNA bersaglio [1]. Per tale motivo, essi svolgono un ruolo essenziale in un gran numero di processi fisiologici e patologici [2] (full text). Alterazioni dei livelli di espressione intracellulare di vari miR sono stati descritti in numerose patologie [3] (full text). In particolare, il miR-155 è un riconosciuto *marker* in diversi linfomi a cellule B [4] e recenti lavori sperimentali hanno associato la sua regolazione positiva in seguito all'incremento della risposta infiammatoria in condizioni quali l'artrite reumatoide e la dermatite atopica [5]. L'aumentata espressione del mir-155 è stata anche correlata all'accresciuta incidenza di alcuni tumori solidi quali adenocarcinomi pancreatici, tumori di colon-retto, mammella, polmone e tiroide [6]. La sua regolazione negativa sembra essere implicata nel deficit della risposta immunitaria, sia a livello di cellule della memoria [7] sia nella produzione anticorpale [4], oltre che al maggior rischio cardiovascolare e all'ipertensione arteriosa.

Scopo di questo studio è stato quello di analizzare: a) l'espressione basale del miR-155 nelle Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) di pazienti cronicamente in emodialisi (HD), confrontando i dati ottenuti con un gruppo di controllo costituito da individui sani, al fine di valutare possibili alterazioni quantitative in una condizione di cronica stimolazione pro-infiammatoria [8]; b) l'espressione del miR-155 in HD PBMC prima e dopo una seduta emodialitica standard con filtro in polisulfone a bassa permeabilità al termine del periodo interdialitico lungo; c) l'espressione del miR-155 nelle HD PBMC in coltura senza e con stimolazione con PHA.

Materiali, pazienti e metodi

Per il primo scopo, il miR-155 è stato isolato da PBMC di 9 HD (età compresa tra 50 e 75 anni, 1 donna e 8 uomini; P=NS), al termine del periodo interdialitico lungo, e confrontato con 7 individui sani (gruppo di controllo, età compresa tra i 30 e i 50 anni, 3 donne e 4 uomini; P=NS). Per il secondo obiettivo, invece, il miR-155 è stato isolato dagli stessi 9 HD, prima e dopo seduta emodialitica standard. Per il terzo scopo, infine, il miR-155 è stato isolato da PBMC di 6 HD (3 uomini e 3 donne, età compresa tra i 50 e i 75 anni; P=NS). Al fine di verificare l'assenza di differenze intra-paziente, per ciascun soggetto sono stati analizzati due campioni differenti.

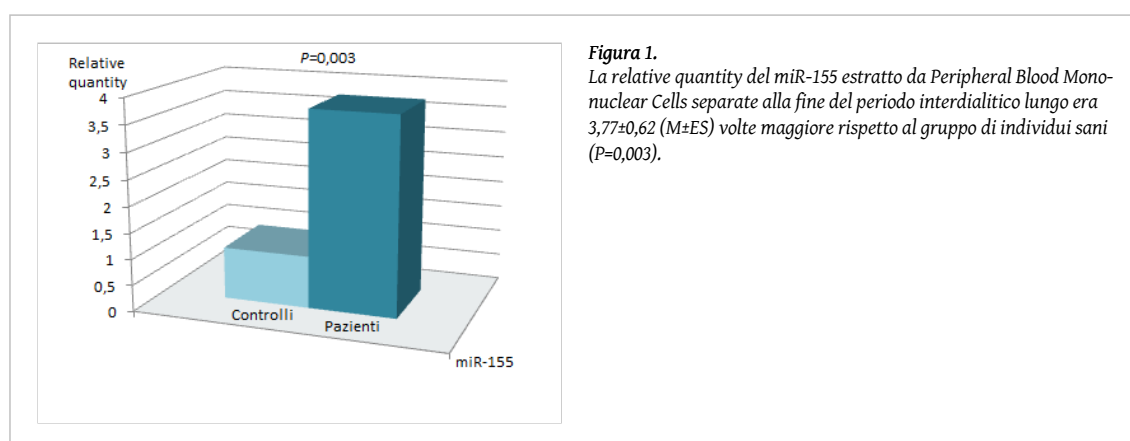
Nessun paziente presentava malattie ematologiche, infiammatorie o neoplastiche recenti (negli ultimi cinque anni). Le 6 HD PBMC dell'ultimo gruppo, sono state processate dopo 24 ore in terreno di coltura composto da RPMI (Roswell Park Memorial Institute, CA), FBS (siero fetale bovino) 10% e antibiotico (penicillina/streptomina) 1%, stimolando metà di ciascun campione con PHA (fitoemagglutinina), lectina mitogena di origine vegetale nota per la capacità *in vitro* di indurre proliferazione dei linfociti T, stimolandone le mitosi e la trasformazione in grandi cellule blastiche analoghe agli immunoblasti [9]. Il numero di PBMC isolate da ogni campione ematico era sovrapponibile per $M \pm ES$ e non sono state riscontrate differenze tra HD e controlli sani. In seguito all'isolamento delle PBMC, l'RNA totale comprensivo dei miRNA che veniva isolato con miRNeasy mini kit (Qiagen, Netherlands). I campioni di RNA, dopo essere stati quantificati mediante spettrofotometro, venivano, quindi, retro-trascritti in cDNA con Taqman microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, CA). Le reazioni PCR sono state condotte in duplicato utilizzando TaqMan microRNA real-time RT-PCR kit (Applied Biosystems, CA). I valori di "cycle threshold" (Ct) sono stati ottenuti utilizzando il software di analisi quantitativa per PCR, SDS versione 2.3 (Applied Biosystems, CA). I dati sono espressi come $M \pm ES$; le significatività statistiche sono state calcolate mediante t-test.

Risultati

I dati raccolti hanno evidenziato che la *relative quantity* (RQ) del miR-155, estratto da HD PBMC prima della seduta emodialitica e processate subito dopo il prelievo, era $3,77 \pm 0,62$ volte maggiore rispetto al gruppo di soggetti sani utilizzato come controlli. Tale dato presentava una significatività statistica ($P=0,003$; figura 1). Non sono state invece riscontrate differenze statisticamente significative tra i livelli di espressione del miR-155 in HD PBMC prima e dopo la seduta emodialitica. La RQ nei pazienti nel post-dialisi vs. controlli era infatti pari a $3,49 \pm 0,70$, dato sovrapponibile al confronto tra pre-dialisi vs. controlli, rispetto al quale non si evidenziava alcuna differenza statisticamente significativa ($P=NS$ vs. pre-HD; figura 2). Le HD PBMC raccolte dopo essere state poste in coltura per 24 ore suddividendo ogni campione in due terreni, con o senza PHA, hanno mostrato come la RQ del miR-155 pre-dialisi, nelle PBMC sottoposte a stimolazione, presentasse valori $1,79 \pm 0,59$ volte maggiori rispetto alle stesse cellule in coltura semplice. Tale riscontro presentava anch'esso una significatività statistica ($P=0,019$; figura 3).

Discussione

I miRNA rappresentano per la comunità scientifica un vasto campo di ricerca in considerazione dell'ampio spettro di processi biologici in cui risultano implicati. Questa capacità di



influenzare una moltitudine di condizioni fisio-patologiche li rende oggetto di studi volti a dimostrare le peculiarità di ciascun miR, non solo per meglio comprendere alterazioni che eventualmente portano allo sviluppo di processi patologici. Una miglior conoscenza di questi aspetti potrebbe, infatti, fornire utili elementi sia nella diagnosi precoce di diverse condizioni morbose, sia nel *follow-up* clinico e potrà eventualmente consentire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Il miR-155, fra i vari miR noti, è già stato dimostrato possedere un ruolo importante in diversi processi patologici. Il nostro lavoro si è focalizzato sullo studio dei livelli d'espressione di questo specifico miR nella popolazione di pazienti in emodialisi extracorporea. La dialisi è nota per essere uno stimolo pro-infiammatorio e molti studi considerano gli HD come pazienti che sviluppano una condizione di infiammazione cronica [10] (full text). I dati da noi raccolti in questo lavoro hanno evidenziato come ciò alteri i livelli d'espressione del miR-155 rispetto a soggetti sani non sottoposti a tale metodica. Tuttavia, gli stessi dati, hanno anche evidenziato come questa alterazione non sembri essere conseguente a uno stimolo imputabile alla singola seduta emodialitica. Occorrerà quindi approfondire tale tematica con ulteriori ricerche per meglio sostanziare questo riscontro.

Tra i processi in cui il miR-155 risulta essere maggiormente implicato, vi è la regolazione dell'attività del sistema immunitario. La stimolazione in coltura delle HD PBMC con PHA, ha comportato un'elevazione dei livelli d'espressione del miR-155 rispetto alla semplice incubazione in coltura. Anche questo dato, concorde con quelli in letteratura [11] (full text), potrebbe essere meritevole di ulteriori approfondimenti al fine di evidenziarne eventuali sviluppi in senso diagnostico-terapeutico.

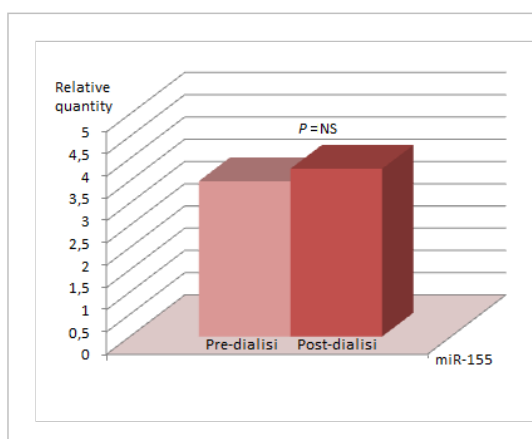


Figura 2.
La relative quantity del miR-155 estratto da Peripheral Blood Mononuclear Cells separate alla fine del periodo interdialitico lungo, prima e dopo la seduta emodialitica non evidenziava alcuna differenza statisticamente significativa ($P=NS$).

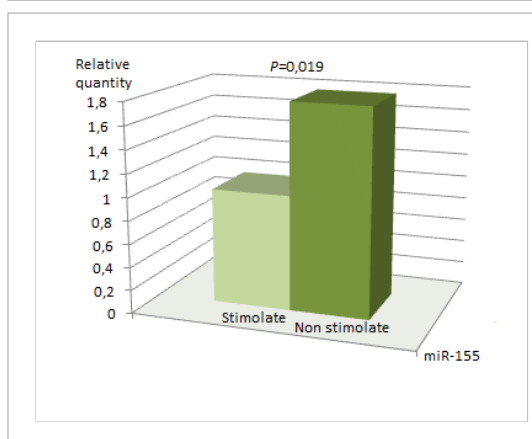


Figura 3.
La relative quantity del miR-155 estratto da Peripheral Blood Mononuclear Cells separate alla fine del periodo interdialitico lungo e sottoposte a stimolazione con fitoemagglutinina, presentava valori di $1,79 \pm 0,59$ ($M \pm ES$) volte maggiori rispetto alle stesse cellule in coltura semplice ($P=0,019$).

Conclusioni

Questi risultati preliminari su HD PBMC di pazienti emodializzati, mostrano una significativa regolazione positiva del miR-155 in corso di insufficienza renale cronica in fase dialitica quando confrontati con quelli di un gruppo di controlli sani. Tale riscontro appare coerente con i dati già presenti in letteratura circa il ruolo pro-infiammatorio del Mir-155 [12] (full text) e potrebbe essere riconducibile a una condizione d'infiammazione cronica che scaturisce dal trattamento emodialitico sostitutivo cronico. Tuttavia, gli stessi risultati, indicanti l'assenza di differenze statisticamente significative tra pre e post-dialisi, ci inducono a ipotizzare che la stessa esposizione dell'individuo alla condizione d'insufficienza renale cronica appaia influire sull'espressione del miR-155 comportandone una regolazione positiva. Ulteriori approfondimenti potrebbero valutare l'espressione del Mir-155 prima dell'inizio del trattamento sostitutivo dialitico. Un'ulteriore sviluppo della ricerca riguarderà eventuali differenze tra le diverse metodiche emodialitiche e i diversi filtri in commercio.

La regolazione positiva del miR-155 riscontrata nelle cellule HD coltivate con PHA, conferma ulteriormente come l'attività del miR-155 risulti verosimilmente connessa a meccanismi patogenetici di carattere proliferativo e/o infiammatorio. Questi dati rappresentano alcuni degli aspetti di natura nefrologica su cui ci proponiamo di indagare circa il ruolo del miR-155 in tali meccanismi.

CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI: Il progetto dello studio è stato finanziato dalla Società Italiana di Nefrologia essendo stato il dott. Paolo Albrizio vincitore della categoria "Bando di ricerca SIN 2011".

APPROVAZIONE COMITATO ETICO: Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico «San Matteo» di Pavia.

Bibliografia

- [1] Bartel DP MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009 Jan 23;136(2):215-33
- [2] Kusenda B, Mraz M, Mayer J et al. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2006 Nov;150(2):205-15 (full text)
- [3] Jiang Q, Wang Y, Hao Y et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic acids research* 2009 Jan;37(Database issue):D98-104 (full text)
- [4] Calame K MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity* 2007 Dec;27(6):825-7
- [5] Sonkoly E, Janson P, Majuri ML et al. MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010 Sep;126(3):581-9.e1-20
- [6] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta* 2009 Jun;1792(6):497-505
- [7] Rodriguez A, Vigorito A, Clare S et al. Report Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science*. 2007 Apr;Vol. 316 no. 5824 pp. 608-611.
- [8] Lacquaniti A [Malnutrition-inflammation syndrome in dialysis: in search of new biomarkers]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Società italiana di nefrologia* 2011 May-Jun;28(3):250
- [9] Mire-Sluis AR, Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV et al. Human T lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin undergo a single round of cell division without a requirement for interleukin-2 or accessory cells. *Immunology* 1987 Jan;60(1):7-12
- [10] Yao Q, Axelsson J, Heimbürger O et al. Systemic inflammation in dialysis patients with end-stage renal disease: causes and consequences. *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology* 2004 Sep;56(3):237-48 (full text)
- [11] Anglicheau D, Sharma VK, Ding R et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 Mar 31;106(13):5330-5 (full text)
- [12] Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 2011 Jul
5;108(27):11193-8 (full text)