



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Tecniche di Laboratorio Biomedico

ANALISI DI MICRORNA NELLE
VESCICOLE EXTRACELLULARI

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Fabiola Olivieri

Tesi di Laurea di:
Emiliana Giancarli

A.A. 2020/2021

INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	LE VESCICOLE EXTRACELLULARI.....	4
1.2	BIOGENESI DELLE EVs	7
1.3	COMPOSIZIONE DEGLI ESOSOMI	11
1.4	EFFETTI BIOLOGICI MEDIATI DAGLI ESOSOMI	13
1.5	MICRORNA ASSOCIATI AGLI ESOSOMI	16
1.5.1	<i>MICRORNA</i>	16
1.5.2	<i>BIOGENESI MICRORNA</i>	19
1.5.3	<i>FUNZIONI BIOLOGICHE DEI MICRORNA</i>	21
1.5.4	<i>SORTING DEI MICRORNA NEGLI ESOSOMI</i>	22
1.6	ESOSOMI CIRCOLANTI NEI PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE DI TIPO 2.....	25
1.7	METODICHE DI ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI.....	26
1.8	SCOPO DELLA TESI.....	27
2.	MATERIALI E METODI.....	29
2.1	POPOLAZIONE DELLO STUDIO.....	29
2.2	PURIFICAZIONE DEGLI ESOSOMI DA PLASMA	30

2.3	ESTRAZIONE DELL'RNA DALLA FRAZIONE ARRICCHITA DI ESOSOMI	34
2.4	QUANTIZZAZIONE DELL'RNA MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO.....	36
2.5	RETROTRASCRIZIONE DEI MICRORNA.....	38
2.6	VALIDAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA TRAMITE RT-PCR.....	41
3	RISULTATI	44
4	CONCLUSIONI	49
5	BIBLIOGRAFIA	52

1 INTRODUZIONE

1.1 LE VESCICOLE EXTRACELLULARI

Le vescicole extracellulari (EV) sono vescicole rivestite da membrana di dimensioni variabili, diametro idrodinamico variabile dai 30 ai 2000 nm, che possono essere rilasciate nello spazio extracellulare da tutti i tipi cellulari degli esseri viventi, comprese le cellule eucariote. Poiché le loro dimensioni sono dell'ordine di nanometri vengono anche definite "nanoparticelle". Le funzioni biologiche delle EVs variano in base al tipo cellulare da cui esse derivano, e di conseguenza anche da ciò che esse contengono. Come è stato dimostrato per le EVs rilasciate dai procarioti, anche le EVs provenienti dalle cellule eucariotiche degli organismi pluricellulari rappresentano dei veicoli che consentono la comunicazione intercellulare, in grado di influenzare il comportamento delle cellule target in vari modi. Esse, infatti, possono agire fungendo da complesso segnalatorio, trasferendo recettori di membrana ed altre proteine alle cellule target, oppure modificandone il fenotipo mediante il trasferimento orizzontale di informazioni genetiche. Inoltre, rappresentano anche uno degli strumenti di difesa di cui le cellule si servono, per proteggersi dagli stress intracellulari ed extracellulari.

In base alle dimensioni le EVs si possono suddividere in tre tipologie: gli esosomi, le microvescicole, ed i corpi apoptotici. L'ultima categoria elencata, i corpi apoptotici, non saranno trattati in questa tesi.

In questa trattazione indicheremo con EVs prevalentemente esosomi e microvescicole. Queste vescicole, pur essendo molto diverse tra loro per

dimensioni e biogenesi, possono entrambe trasportare differenti molecole biologiche, quali acidi nucleici (DNA, RNA, ibridi) proteine e lipidi. Se in primo momento si è pensato che le EVs fossero un meccanismo cellulare per eliminare “spazzatura cellulare” ossia molecole danneggiate o non funzionanti, numerose evidenze suggeriscono invece come le EVs rappresentino un meccanismo di scambio di molecole funzionanti fra cellule anche di tipologie diverse. Lo scambio di materiale biologico attraverso le EVs può avvenire fra cellule della stessa tipologia facenti parte dello stesso tessuto o fra cellule di differenti tipologie, facenti parte di tessuti diversi e distanti fra loro.

Il forte interesse per le EVs ha portato ad una maggiore conoscenza dei meccanismi di biogenesi e di scambio fra le cellule, contribuendo ad alimentare la consapevolezza che potrebbero essere uno strumento utile e applicabile in diversi campi di ricerca e sperimentazione biomedica. Ci sono ancora alcuni ostacoli da superare e aspetti tecnici da mettere a punto prima di utilizzare le EVs come strategie diagnostiche o addirittura terapeutiche, ma i numerosi trials in corso indicano che questo potrebbe essere fattibile in un prossimo futuro.

Sfide tecnologiche importanti riguardano l'isolamento delle EVs per studiarne il contenuto e la loro visualizzazione delle EVs. Riguardo alle tecniche di isolamento delle EVs, queste vescicole si trovano nella quasi totalità dei fluidi biologici; il plasma è ricco di vescicole, che si possono ottenere facilmente da un prelievo di sangue periferico. Il plasma è però un campione biologico molto ricco di proteine, di lipoproteine HDL e LDL, sali, ioni, nutrienti e altri particolati, che devono essere rimossi prima dell'analisi delle EVs. I metodi tradizionali di isolamento delle EV, quali l'ultracentrifugazione e la precipitazione chimica sono

impegnativi dal punto di vista del tempo e dell'equipaggiamento richiesto. Proprio partendo da questa problematica, si è manifestata la necessità di un metodo rapido, semplice, ed economico per isolare le EV dal plasma. Metodi più recenti basati sulla Size Exclusion Chromatography hanno fornito risultati incoraggianti, ma i dati non sono ancora conclusivi.

Fra i vari componenti che possono essere presenti nelle EVs ci sono i non-coding RNA, definiti microRNA o miRNA, corte molecole ad RNA con funzione di regolazione dell'espressione genica. Dopo le iniziali scoperte sul ruolo dei miRNA nei tumori, cominciando ad indagare mediante l'uso di tecnologie innovative, quali gli array, si intuì che la modulazione dei miRNA era associata a numerose patologie umane.

Il lavoro presentato in questa tesi riguarda proprio l'applicazione di metodi cromatografici su piccola scala per separare frazioni di EVs presenti nel plasma di pazienti affetti da diabete di tipo 2 per analizzare i microRNA in esse contenuti.

1.2 BIOGENESI DELLE EVs

In base alle dimensioni le EVs si possono suddividere in tre tipologie:

- gli esosomi, le vescicole più piccole (dimensioni comprese tra i 30 e i 120 nm circa), che si formano seguendo la via endosomiale originando in strutture chiamate Corpi Multivescicolari (Multivesicular Bodies, MVB);
- le microvescicole, di dimensioni maggiori rispetto agli esosomi, che hanno un'origine più complessa: è verosimile che possano formarsi anche dalla fusione fra esosomi, ma la loro formazione più accreditata è attraverso una gemmazione dalla membrana plasmatica;
- i corpi apoptotici, le EVs con dimensioni maggiori, caratteristici delle cellule che stanno morendo per morte cellulare programmata denominata apoptosi.

La biogenesi degli esosomi inizia nel sistema endosomiale con la formazione di vescicole endocitiche che originano da regioni specializzate della membrana plasmatica. Questo processo può essere clatrina-dipendente, un esempio è dato dal recettore della transferrina, oppure clatrina indipendente meccanismo noto per le proteine ancorate a GPI (glicosilfosfatidilinositolo). Le vescicole così formate si staccano dalla membrana plasmatica e vengono indirizzate verso gli endosomi precoci con cui si fondono. Gli endosomi precoci matureranno poi in endosomi tardivi o corpi multivescicolare (MVB) (Figura 1) (Gurunathan et al., 2021). Un sistema di proteine definito endosome sorting complexes required for transport (ESCRT) gioca un ruolo importante nella formazione degli esosomi. Il

complesso ESCRTs include quattro distinti complessi proteici (ESCRT-0, -I, -II, and -III) e un complesso accessorio chiamato Vps4. I MVBs possono fondersi con i lisosomi, ed il loro contenuto venire degradato, o fondersi con la membrana plasmatica rilasciando all'esterno gli esosomi.

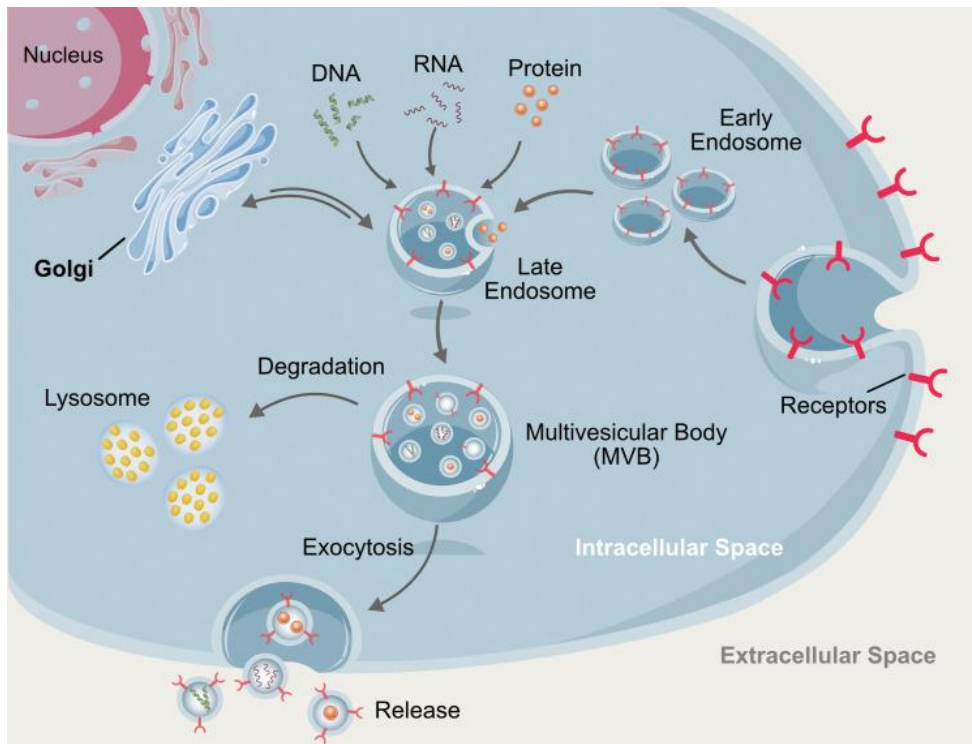


Figura 1. Biogenesi degli esosomi (Gurunathan et al., 2021).

La biogenesi delle microvescicole (MVs) ha inizio dalla gemmazione della membrana plasmatica verso lo spazio extracellulare (Figura 2). Tale gemmazione deriva da un processo attivo calcio dipendente, che comporta interazioni fra actina e tubulina presenti nel citoscheletro (Pap et al., 2009). L'ingresso di ioni calcio inoltre comporta una deregolazione dell'attività di tre enzimi: flippasi, floppasi e scramblasi; proteine transmembrana implicate nel mantenimento della distribuzione asimmetrica del doppio strato fosfolipidico.

Quando la concentrazione di calcio intracellulare aumenta, alcuni di questi enzimi vengono attivati, altri invece inibiti, comportando un cambiamento nelle posizioni dei fosfolipidi, i quali si concentrano maggiormente nel foglietto esterno.

Altri enzimi subiscono l'azione del Calcio, e sono gelsolina e calpaina; quando vengono attivati esercitano la loro azione sull'actina corticale, localizzata al di sotto della membrana plasmatica, promuovendone il disassemblaggio. Questi eventi, a carico di citoscheletro e del bilayer fosfolipidico, permettono il protendersi e l'incurvarsi della membrana plasmatica, con conseguente formazione e rilascio di vescicole (Teng e Fussenegger, 2020).

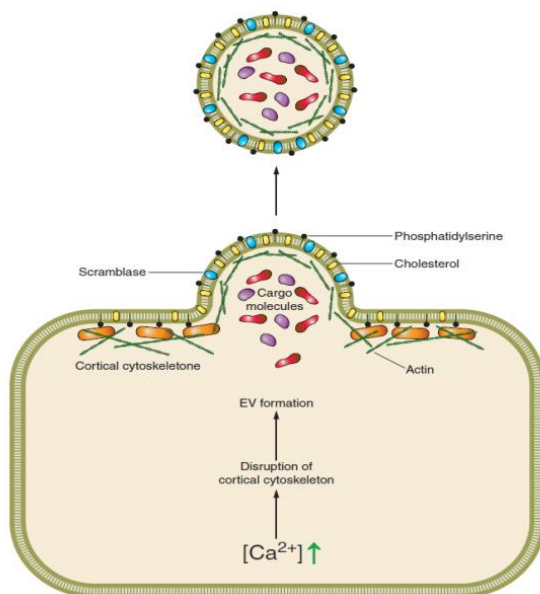


Figura 2. Biogenesi delle microvescicole (Turtutici et al, 2014)

Le ridotte dimensioni delle EVs, fanno sì che sia esosomi che microvescicole ricadano al di sotto del limite della diffrazione della microscopia ottica convenzionale, rendendo impossibile definirne le dimensioni e quindi limitando

l'utilizzo di queste tecniche all'identificazione delle diverse sotto-popolazioni di vescicole. Le tecniche di microscopia elettronica permettono di risolvere le singole vescicole, ma non rendono facile l'individuazione di più marcatori simultaneamente e sono limitate a campioni fissati. L'impiego delle tecniche di microscopia a super-risoluzione è di grande utilità nell'individuazione e visualizzazione di sotto-popolazioni di EVs e può fornire informazioni aggiuntive nello studio del ruolo delle EVs nella progressione di molte patologie.

1.3 COMPOSIZIONE DEGLI ESOSOMI

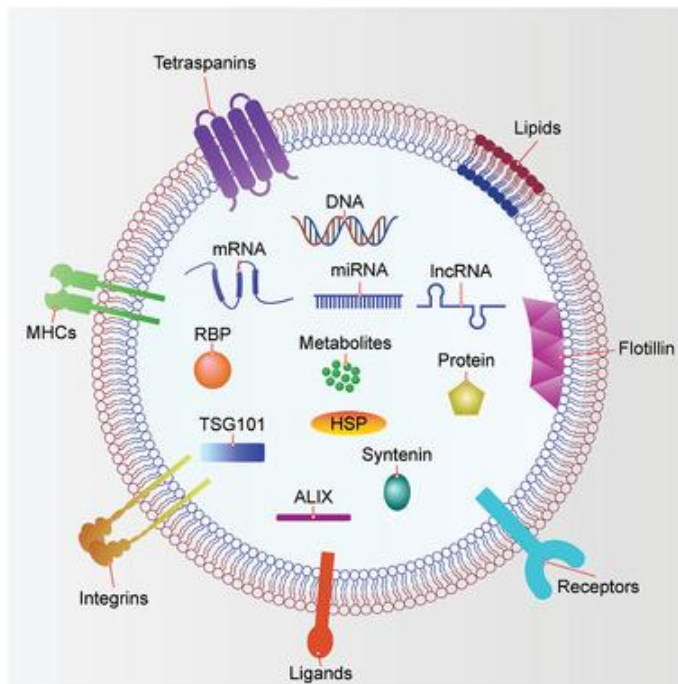


Figura 3. Composizione degli esosomi

Le EVs possono contenere diverse tipologie di molecole, quali proteine, lipidi e acidi nucleici. Il contenuto delle vescicole è specifico a seconda del tipo di cellula da cui derivano, e può essere modulato anche dalle condizioni cellulari. I lipidi e le proteine sono i componenti principali delle membrane esosomali, con livelli relativamente elevati di colesterolo, sfingomieline e ceramidi e microdomini di membrana definiti lipid rafts.

Le principali proteine transmembrana includono integrine e tetraspanine, tra cui CD63, CD81, CD82 e anche molecole MHC (Cocucci et al., 2009). TSG101 ed Alix sono considerati due marcatori degli esosomi. All'interno degli esosomi possono essere presenti varie tipologie di enzimi, proteine da shock termico (HSP), e vari metaboliti. Inoltre possono essere presenti acidi nucleici, quali DNA, RNA messaggeri e microRNA, ossia RNA non codificanti (Figura 3). Il

database EXOCARTA (<http://www.exocarta.org/>) è un data base pubblico dove sono elencate tutte le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici identificati nei vari tipi di vescicole identificate (Keerthikumar et al., 2016).

1.4 EFFETTI BIOLOGICI MEDIATI DAGLI ESOSOMI

È stato dimostrato come gli esosomi attivamente rilasciati da cellule vive siano in grado di essere internalizzati nelle cellule target con meccanismi ancora da chiarire ma che potrebbero comprendere sia modalità di internalizzazione aspecifiche, che recettore mediate, e quindi dotate di elevata specificità. È stata ipotizzata una selettività imputabile alla presenza di biomarcatori specifici per i diversi sottogruppi di EVs (tetraspanine, integrine e altre proteine) (Lyden et al 2015). Gli esosomi possono mediare il trasporto di secondi messaggeri, citochine o recettori di membrana. Il fenomeno del trasferimento di recettori è stato largamente studiato nelle EVs derivate dalle piastrine, capaci di trasferire alle cellule ematopoietiche molecole di adesione specifiche delle piastrine (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Baj-Krzyworzeka et al., 2002). È stato anche dimostrato che le vescicole di membrana dei leucociti possono trasferire il tissue factor (TF) sulla membrana delle piastrine attivate, secondo un meccanismo dipendente dai raft lipidici, per dare inizio al processo di coagulazione (del Conde et al., 2005). Un altro esempio di trasferimento di recettori di membrana tra le cellule è dimostrato dai linfociti B inattivi che acquisiscono i recettori per gli antigeni dalle EVs rilasciate dai linfociti B attivati, determinando così una rapida espansione delle cellule B capaci di presentare l'antigene ai linfociti T CD4+ (Quah et al., 2008). Nella figura 4 sono indicate le principali modalità di interazione delle vescicole con le cellule target.

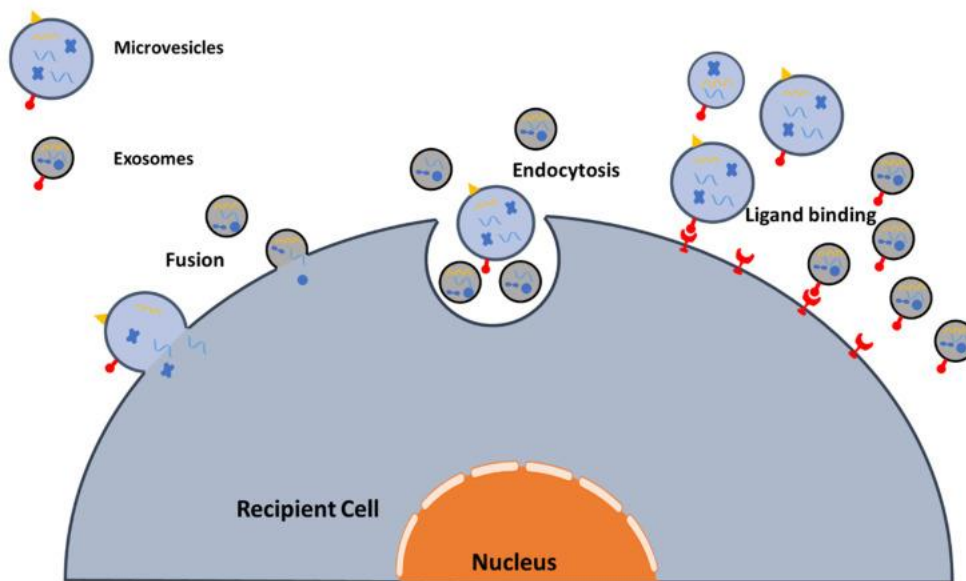


Figura 4. Interazione di esosomi e microvescicole con le cellule target (Hu et al., 2020).

L'aspetto più interessante nel campo della ricerca biomedica è che gli esosomi possono essere rilasciati sia da cellule sane che da cellule affette da disordini o infezioni, e potrebbero quindi trasportare e poi trasmettere anche carichi pericolosi, quali virus, tossine, proteine non degradabili come quelle associate a malattie neurodegenerative. Gli esosomi presenti nei fluidi biologici potrebbero quindi essere utili strumenti per migliorare la diagnosi o la prognosi di molte patologie umane.

Poiché gli esosomi sono, per caratteristica intrinseca, dei trasportatori, si è pensato anche di sfruttare questa loro capacità di attraversare le barriere cellulari per trasferire "carichi terapeutici" (farmaci, proteine, diversi tipi di RNA). Caricare farmaci in queste vescicole richiede però la manipolazione delle vescicole stesse (caricamento esogeno) o delle cellule da cui provengono (caricamento endogeno). Nella figura 5 sono indicati i principali effetti biologici mediati dagli esosomi (Gurunathan et al., 2021).

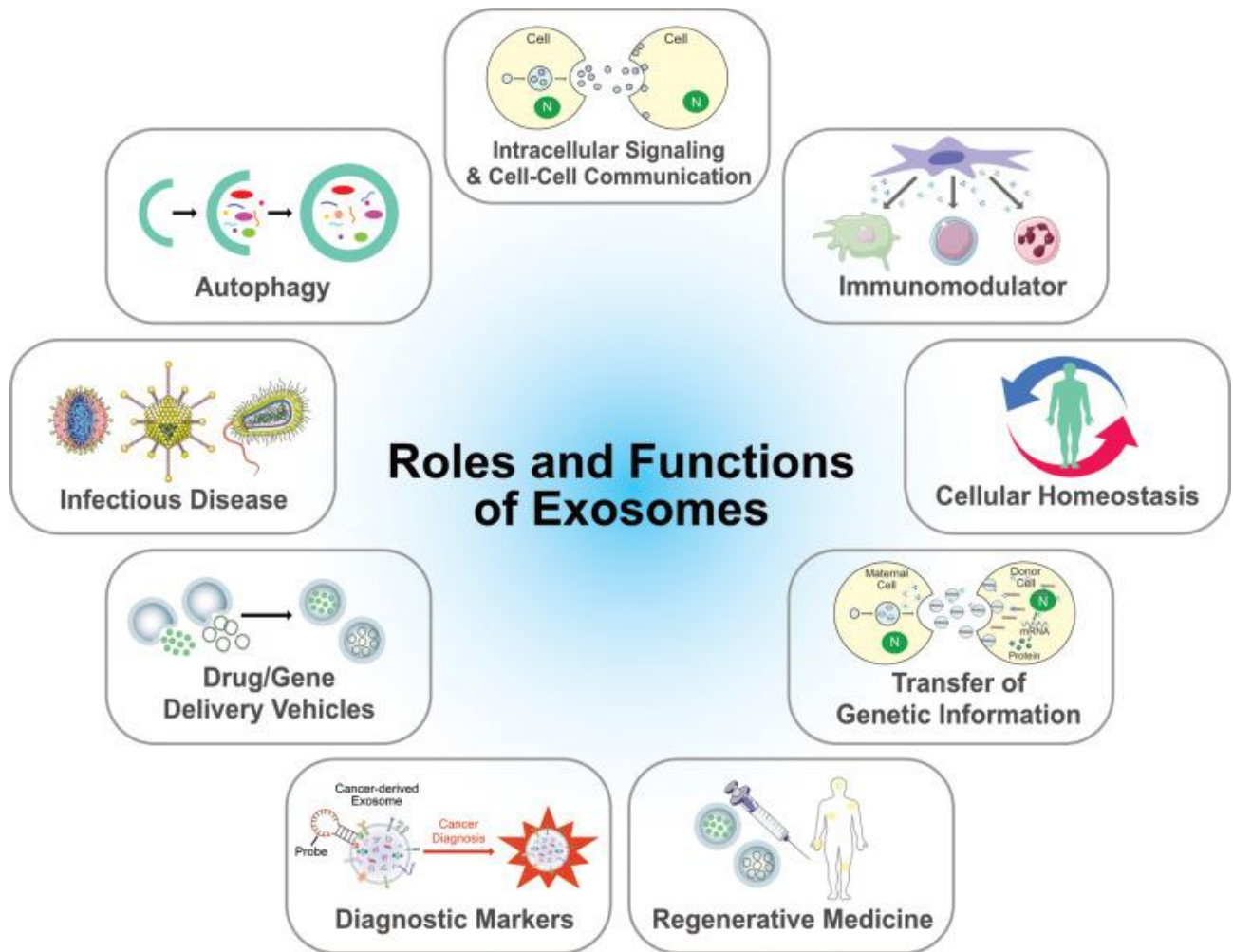


Figura 5. Effetti biologici mediati dagli esosomi (Gurunathan et al., 2021).

1.5 MICRORNA ASSOCIATI AGLI ESOSOMI

1.5.1 MICRORNA

I microRNA (miRNA) sono delle corte molecole di RNA a singolo filamento non codificanti, costituiti da 20-25 nucleotidi, regolatori negativi dell'espressione genica. Sono sequenze altamente conservate che legano l'mRNA bersaglio per inibire la produzione delle proteine.

Per molto tempo non sono stati presi in considerazione dagli studiosi, poiché non essendo produttori di proteine venivano spesso considerati come dei semplici prodotti di scarto di RNA codificanti più lunghi. Nel 1993 ci fu però una svolta, quando Victor Ambros, Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum, effettuando uno studio sul genoma di *Caenorhabditis elegans*, identificarono il primo miRNA. Isolarono il gene lin-4, conosciuto come regolatore dei tempi di sviluppo larvale, e si resero conto che non veniva prodotto un RNA messaggero, bensì venivano generati piccoli filamenti di RNA, tra cui ve ne era uno costituito da 22 nucleotidi e simile a sequenze ripetute presenti sul gene lin-14. (Lee et al., 1993).

Da allora sono state fatte ulteriori ricerche che hanno dimostrato come i microRNA abbiano effettivamente delle funzioni regolatorie anche in altri organismi tra cui l'uomo. (Lagos-Quintana et al., 2001).

Si stima che i miRNA rappresentino 1-5% del genoma umano e regolino almeno il 30% dei geni codificanti proteine. (Rajewsky et al., 2006 – Stanczyk et al. 2008). Nonostante ad oggi siano poche le notizie riguardanti i target dei miRNA

e le loro specifiche azioni biologiche, è indubbio che essi abbiano un ruolo importante nel controllo genico delle diverse vie cellulari e metaboliche. (Esau et al. 2006 - Krutzfeldt et al., 2005).

Lo studio dei miRNA venne inizialmente condotto in maniera invasiva sui tessuti umani; in seguito venne definito un metodo di analisi su plasma e quindi sui fluidi corporei che ne facilitò l'uso. Si poté verificare che nei pazienti affetti da patologie i miRNA nei fluidi corporei avevano profili differenti da quelli riscontrabili in soggetti sani, inoltre rimanevano stabili sia in caso di variazioni di pH che di variazioni di temperatura. Questi studi hanno suggerito la possibilità di usare i miRNA nei fluidi corporei per diagnosticare malattie. E' stato il riscontro di miRNA nell'ambiente extracellulare che ha permesso di teorizzare il "rilascio controllato" e/o l'uptake selettivo dei miRNA; se da una parte dopo un aumento di tossicità tissutale e relativa morte cellulare i miRNA sono rilasciati non selettivamente con un loro incremento nel sangue, (Zhang et al., 2010) dall'altra parte le cellule previo packaging di alcuni miRNA, li possono rilasciare in modo selettivo, sia associati a proteine che contenuti all'interno di EVs. Sebbene gli esosomi sono prodotti dalle cellule in modo costitutivo, condizioni di stress possono modulare la loro biogenesi e il loro rilascio. Dati recenti in letteratura ipotizzano una selezione delle proteine e dei miRNA all'interno degli esosomi che può cambiare dopo stimoli patologici, portando alla modifica del profilo proteomico e dell'RNA esosomiale e quindi, a rispecchiare il microambiente della cellula che li ha rilasciati. I meccanismi di sorting dei miRNA all'interno delle vescicole sono tuttora da scoprire. L'ipotesi più probabile è che il targeting

cellulare possa essere mediato dalle proteine di superficie esosomiali e che la fusione tra membrane cellulari e meccanismi di endocitosi diretta rappresentino i principali binari di esecuzione del rilascio vescicolare (Simons et al.,2009).

1.5.2 BIOGENESI DEI MICRORNA

La biogenesi dei miRNA comprende una prima fase nucleare e una seconda citoplasmatica. Il processo ha inizio con la trascrizione del DNA intergenico ad opera della polimerasi II (Lee et al., 2004) o III, con produzione di pri-miRNA, struttura a forcella che dopo maturazione porterà alla formazione di un miRNA maturo. Il pri-miRNA viene sottoposto all'azione di un complesso proteico noto come microprocessore, formato dall'endonucleasi RNasi III *Drosha* e dalla proteina DGCR8, con conseguente formazione di un pre-microRNA. Questa seconda struttura viene quindi esportata nel citoplasma tramite un trasportatore nucleocitoplasmatico costituito da Esportina 5 e Ran-GTP, che previene la degradazione nucleare e facilita la traslocazione nel citoplasma (Bohnsac et al., 2004).

Giunto nel citoplasma, il pre-miRNA viene scisso da *Dicer* (endonucleasi) con formazione di un miRNA duplex, costituito da un doppio filamento antiparallelo di circa 22 basi. Successivamente uno dei due filamenti, indicato come miRNA*, viene degradato mentre l'altro continua il processo per formare il microRNA maturo. L'ultima fase di maturazione prevede l'associazione tra microRNA e RISC. Nel RISC, Complesso di Silenziamento Indotto da RNA, formato da ribonucleoproteine effettrici e da proteine Argonaute che interagiscono in maniera specifica con i miRNA, avviene l'interazione tra miRNA e RNA bersaglio, con conseguente down regulation del target.

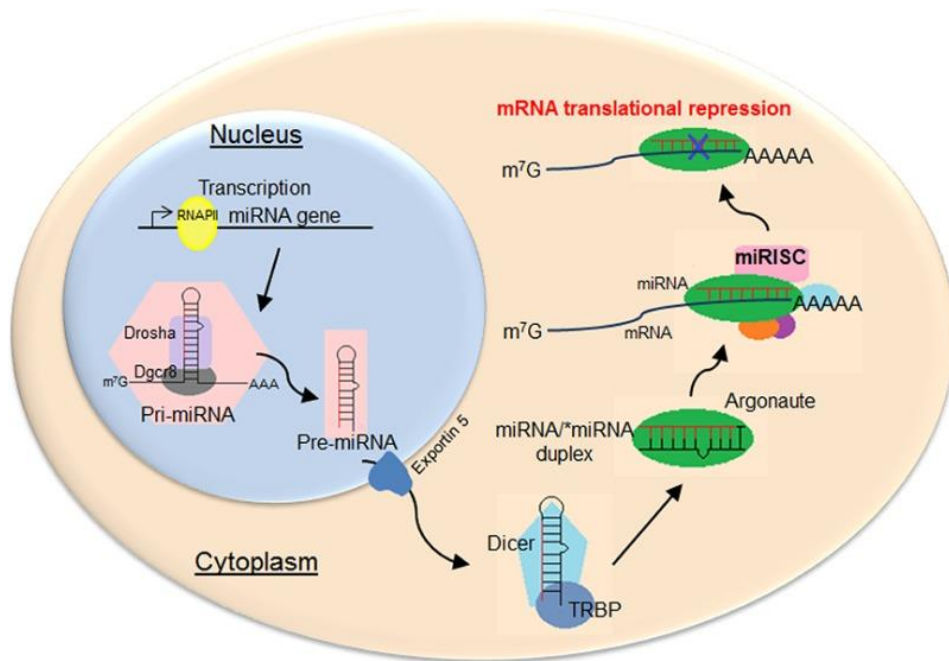


Figura 6. Biogenesi dei microRNA (Sachin Hajarnis et al., 2015)

Tuttavia è importante annoverare un altro meccanismo di formazione di microRNA, che prevede la trascrizione di miRNA a partire da introni di geni codificanti per proteine, da parte della polimerasi II come parte del pre-mRNA (Rodriguez et al., 2004). Tramite lo splicing vengono generati direttamente i pre-miRNA che seguono poi il normale processo di maturazione (Pasquinelli et al., 2012).

1.5.3 FUNZIONI BIOLOGICHE DEI MICRORNA

Il miRNA maturo presenta una specificità per l'mRNA target determinata dalla regione chiamata "seed sequence" del microRNA, costituita da soli sei nucleotidi. Quindi un solo miRNA può regolare diversi mRNA bersaglio e più miRNA possono agire in cooperazione su un singolo RNA messaggero (Bartel et al., 2004). Dopo il riconoscimento tra sequenze complementari il microRNA va ad esplicare la sua attività sull'RNA bersaglio tramite due possibili meccanismi. Entrambi hanno come effetto finale il silenziamento genico, ma in un caso si ha la degradazione dell'mRNA, nell'altro il blocco della traduzione. Alcuni studi hanno dimostrato che se avviene un appaiamento completo tra miRNA e mRNA allora l'mRNA viene degradato. Se l'appaiamento non è completo la conseguenza sarà il blocco della traduzione (Lim LP et al., 2005).

1.5.4 SORTING DEI MICRORNA NEGLI ESOSOMI

I microRNA sono presenti nell'ambiente intracellulare dove svolgono le loro funzioni, ma possono essere rilasciati nello spazio extracellulare e quindi sono presenti in grande quantità in tutti i fluidi biologici, quali sangue, saliva, urina, liquor e anche latte materno (Vlassov et al., 2012). I microRNA circolanti nei fluidi corporei presentano la peculiarità di resistere all'attività delle ribonucleasi endogene, probabilmente grazie all'impacchettamento all'interno di EVs, soprattutto degli esosomi (Mitchell et al., 2008; Boon et Vickers, 2013).

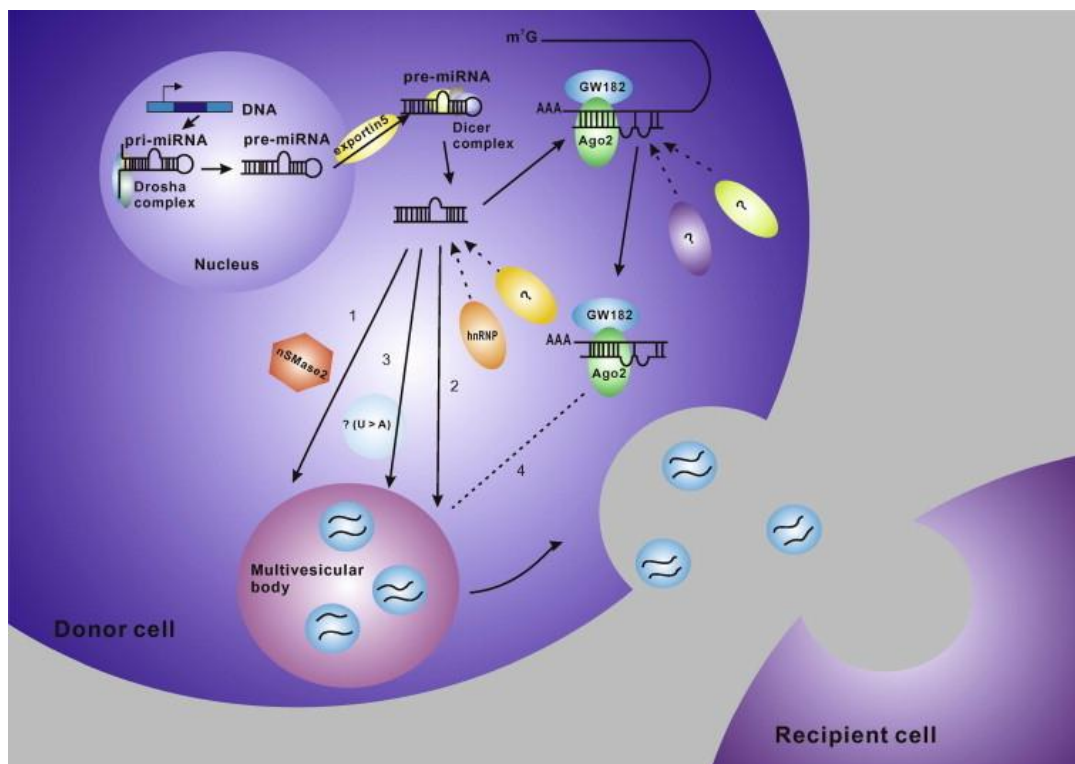


Figura 7. Modalità con cui i microRNA maturi vengono indirizzati agli esosomi (Zhang et al., 2015).

Recenti evidenze suggeriscono che i miRNA non sono impacchettati in modo casuale all'interno degli esosomi, ma esistono dei sistemi di sorting non ancora

ben definiti (Guduric-Fuchs et al., 2012). Le cellule d'origine attiverebbero un meccanismo di selezione per veicolare specifici miRNA intracellulari negli esosomi. Sulla base della letteratura, sono stati evidenziati 4 potenziali percorsi per il sorting dei miRNA negli esosomi (Figura 7, Zhang et al., 2015):

1) pathway che dipendono dalla sfingomielinasi neurale 2 (nSMase2). nSMase2 è stata la prima molecola ad essere correlata con la secrezione dei miRNA negli esosomi. L'espressione di nSMase2 correla con il numero di miRNA esosomali (Kosaka et al., 2013).

2) pathway dipendenti da hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins). hnRNPA2B1 sumoilata potrebbe essere in grado di riconoscere il motivo GGAG in posizione 3' sulla sequenza dei miRNA e guidare l'impacchettamento di specifici miRNA negli esosomi. Allo stesso modo, altre due proteine della famiglia hnRNP, hnRNPA1 e hnRNPC, potrebbero legare i miRNA esosomali, ed essere coinvolte nel sorting dei miRNA (VillarroyaBeltri et al., 2013).

3) pathway dipendenti dalla sequenza al 3'-terminale del miRNA. I miRNA con l'estremità 3' uridilata sono stati trovati di preferenza negli esosomi mentre miRNA con l'estremità 3' adenilata sembrano essere prevalenti all'interno delle cellule (Koppers-Lalic et al., 2014). Queste osservazioni suggerirebbero come le sequenze terminali in posizione 3' dei miRNA potrebbe contenere una sequenza chiave per il sorting dei miRNA negli esosomi.

4) **pathway dipendenti da miRISC.** I miRNA maturi interagiscono con le proteine a formare il complesso chiamato miRISC. I componenti principali di miRISC includono miRNA, mRNA target, GW182 (famiglia di proteine che interagisce con le proteine Ago) (Braun et al., 2013) e Ago2. La proteina Ago-2 nell'uomo si lega alle basi U (Uracile) o A (Adenina) all'estremità 5' dei miRNA (Frank et al., 2010).

1.6 ESOSOMI CIRCOLANTI NEI PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE DI TIPO 2

Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia metabolica, caratterizzata da uno stato di iperglicemia dovuta a condizione di insulino-resistenza. È la malattia metabolica più diffusa nel mondo, soprattutto in Occidente, dove l'incremento di casi di obesità e lo stile di vita sedentario, favoriscono la sua crescente incidenza. È stato inoltre dimostrato che a questa condizione morbosa è associato uno stato di infiammazione endoteliale, il quale può portare a una disfunzione dell'endotelio stesso.

Questa relazione tra insulino-resistenza, infiammazione e disfunzione endoteliali ha posto le basi per un quesito concernente la secrezione di EVs da parte delle cellule endoteliali. Sono stati effettuati diversi studi sulle vescicole rilasciate dalle cellule endoteliali di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (Jensen F. et al., 2016). Numerosi microRNA esosomali, quali miR-23a e miR-192, sono stati identificati come deregolati nei pazienti affetti da T2DM (Liu et al., 2021). Alcuni lavori indicano una deregolazione dei miRNAs esosomali in pazienti diabetici affetti da obesità (Kim et al., 2020).

1.7 METODICHE DI ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI

Sono state descritte molte tecniche per isolare e caratterizzare gli esosomi dai liquidi biologici umani. Le principali tecniche includono:

- **Ultracentrifuga:** metodo di elezione per la purificazione di esosomi, ma favorisce la formazione di aggregati proteici e lipoproteici che co-precipitano con gli esosomi, e di detriti cellulari, con la deformazione/rottura delle vescicole (“splat factor”). La metodica è laboriosa, richiede strumentazione dedicata (ultracentrifuga) ed è poco adatta a lavorare con molti campioni o con piccoli volumi.
- **Precipitazione Polimerica:** metodo rapido per l'isolamento degli esosomi, senza ultracentrifuga.
- **Immunoprecipitazione:** permette di isolare gli esosomi mediante anticorpi specifici per proteine di superficie, anche in abbinamento alle metodiche descritte sopra.
- **Size Exclusion:** filtrazione e cromatografia. La cromatografia di esclusione di dimensione (SEC) separa le componenti presenti in un campione complesso in base alla loro dimensione molecolare.

1.8 SCOPO DELLA TESI

La scoperta di vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule eucariotiche nello spazio extracellulare e quindi presenti in tutti i fluidi biologici ha stimolato la ricerca sulla loro composizione e sul loro possibile ruolo quali biomarcatori per patologie umane. Fra le numerose molecole contenute nelle vescicole extracellulari grande interesse è stato dedicato ai microRNA, corte molecole di RNA non codificante che regolano l'espressione genica. Numerose ricerche hanno cercato di identificare i microRNA circolanti che potrebbero essere utili ausili diagnostici o prognostici per molte patologie umane, compreso il diabete di tipo 2. La ricerca di microRNA presenti all'interno delle vescicole extracellulari è ad oggi un aspetto molto innovativo, ed è stata incrementata dalla recente disponibilità di tecniche standardizzate per l'isolamento di vescicole dai fluidi biologici, compreso il plasma.

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare l'efficienza di separazione delle vescicole plasmatiche mediante l'utilizzo della "size exclusion chromatography" (SEC), ossia di una tecnica cromatografica che permette di separare le vescicole plasmatiche in base alle dimensioni. Utilizzando colonne cromatografiche di piccole dimensioni disponibili sul mercato e volumi ridotti di plasma, si cercherà di individuare la frazione di eluizione più arricchita di vescicole. Da tali frazioni verrà estratto l'RNA e verranno quantificati con tecnica Real-Time PCR alcuni specifici microRNA.

L'analisi verrà condotta su plasma di soggetti sani e di pazienti affetti da diabete di tipo 2, allo scopo di identificare nuovi microRNA esosomiali potenzialmente utili per la diagnosi o la prognosi del diabete di tipo 2.

2. MATERIALI E METODI

2.1 POPOLAZIONE DELLO STUDIO

Le vescicole extracellulari sono state purificate da campioni di plasma di soggetti selezionati da una casistica di campioni biologici già esistente e reclutati dall' Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani, INRCA, di Ancona (Testa et al., 2011; Mensà et al., 2019). Sono stati selezionati i plasmi di soggetti sani di tre diverse fasce d'età, quali 41-64, ≥ 65 e centenari. Sono stati inoltre selezionati pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 di età compresa fra 41-64 anni.

età	Soggetti sani n. 12	Pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 n. 4
41-64	CTR 41-64 n. 4	T2DM 41-64 n. 4
≥ 65	CTR ≥ 65 n. 4	
≥ 100	CENTENARI n. 4	

Tabella 1. Caratteristiche e numerosità dei campioni utilizzati nello studio. CTR 41-64, soggetti di età compresa tra i 41 e i 64 anni che non presentano patologie; T2DM 41-64, pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 di età compresa tra i 41 e i 64 anni; CTR ≥ 65 , soggetti di età compresa tra i 65 e i 99 anni che non presentano patologie; CENTENARI, soggetti di età uguale o superiore a 100 anni che non presentano patologie acute.

2.2 PURIFICAZIONE DEGLI ESOSOMI DA PLASMA

La purificazione degli esosomi da plasma è stata eseguita mediante cromatografia di esclusione molecolare (size exclusion chromatography, SEC). Questa tecnica prevede la separazione delle molecole in base al peso molecolare. Vengono utilizzate colonnine qEVOoriginal, della ditta Izon Science, le quali permettono di recuperare le vescicole plasmatiche nel range di dimensioni comprese fra i 70nm e i 1000 nm. L'isolamento delle vescicole può essere eseguito a partire da differenti fluidi biologici, tra cui saliva, urina e plasma, e anche da surnatante di colture cellulari.

Le qEVOoriginal contengono una matrice porosa polisaccaridica che intrappola proteine libere, lipidi e altri soluti eventualmente presenti nel campione, e lascia fluire le vescicole in base alle loro dimensioni. Il principio di funzionamento prevede che i soluti con un volume maggiore eluiscano dalla colonna in tempi minori rispetto alle sostanze con volume minore. Le particelle con peso molecolare poco elevato vengono intrappolate nei pori della fase stazionaria, perciò la loro eluizione sarà ritardata rispetto alle molecole che hanno dimensioni maggiori rispetto al diametro dei pori della fase stazionaria.

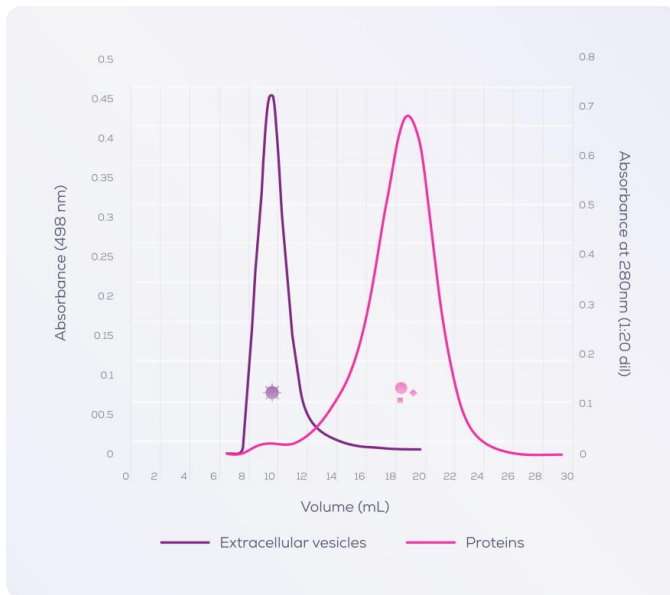


Figura 8. <https://www.izon.com/qev/overview>

Partendo da un campione di plasma di 0.5 ml si possono ottenere sette frazioni da 500 μ l, numerate da 7 a 13, di cui le frazioni 8 e 9 risultano le pi \dot{u} arricchite in esosomi, con diametro compreso fra i 70 e i 150 nm.



Figura 9. Strumentazione iZON per purificazione di esosomi

Procedimento:

La colonna cromatografica viene conservata in frigorifero a 4°C. prima di utilizzare la colonna va quindi equilibrata a temperatura ambiente. Si procede come segue:

1. Fissare la colonna sul supporto
2. Rimuovere tappo superiore e posizionare la provetta tipo falcon sotto la colonna per raccogliere la fase mobile
3. Rimuovere tappo inferiore ed aggiungere il buffer (PBS) fino ad un volume totale di 10 ml; cronometrare il tempo di eluizione a partire da 2 ml di volume fino a 7 ml di volume
4. Richiudere la colonna ed eliminare il buffer rimanente sopra la resina
5. Aggiungere 500 µl di campione di plasma
6. Togliere il tappo, aspettare che tutto il campione abbia superato il filtro, quindi far passare il PBS
7. Far eluire nella falcon 3ml, quantità equivalente a 6 frazioni, che verranno scartate perché prive di vescicole
8. Raccogliere 7 frazioni da 500 µl (numerate da 7 a 13) in provette eppendorf
9. Lavare la colonna con 10 ml di PBS; cronometrare tempo di eluizione da 2 ml di volume a 7 ml e verificare che il tempo intercorso sia uguale a quello del punto 3
10. Conservazione la colonna a 4°C, posizionando EtOH 20% sulla parte superiore della colonna

Le frazioni 8 e 9 vengono considerate dal produttore delle colonne come quelle più arricchite di vescicole extracellulari di dimensioni corrispondenti a quelle degli esosomi.

2.3 ESTRAZIONE DELL'RNA DALLA FRAZIONE

ARRICCHITA DI ESOSOMI

Le frazioni di eluizione numerate 8 e 9 vengono indicate come le più arricchite di esosomi. L'RNA presente in tali frazioni di eluizione viene estratto tramite l'utilizzo del kit "total RNA purification" della ditta Norgen Biotek Corp. Il kit si compone di colonnine cromatografiche che contengono una resina che funge da matrice di separazione a cui si lega l'RNA; questo metodo permette di purificare l'RNA dagli altri componenti molecolari senza l'uso di Fenolo o Cloroformio, che sono sostanze tossiche e altamente irritabili.

La procedura viene eseguita a temperatura ambiente, in una postazione dedicata ed esclusiva per l'estrazione, usando tutti gli accorgimenti necessari per ridurre il rischio di degradazione dell'RNA, quali indossare guanti, utilizzare puntali con filtro e utilizzare contenitori in plastica RNasi-free (contenuta nel kit). Tutte le provette da 1,5 ml non contenute nel kit devono essere prima autoclavate, per degradare gli enzimi RNasi, che sarebbero altrimenti in grado di degradare l'RNA.

Procedimento

1. Trasferire 100 μ l di campione in una provetta tipo eppendorf
2. Aggiungere 300 μ l di Buffer RL e vortexare per 10 secondi
3. Aggiungere 3 μ l di cell-miR39 (un microRNA non umano), utilizzato come controllo interno della resa dell'estrazione
4. Aggiungere 400 μ l di EtOH e vortexare per 10 secondi
5. Assemblare la colonnina con la provetta di raccolta

6. Aggiungere 600 μ l della mix e centrifugare per 1 minuto a 6000 RPM
7. Ripetere il passaggio 6 fino a esaurimento del campione
8. Aggiungere 400 μ l di EtOH e centrifugare per 1 minuto a 6000 RPM
9. Ripetere i lavaggi con EtOH per altre 2 volte, centrifugando ogni volta per 1 minuto a 6000 RPM ed eliminando di volta in volta il centrifugato dalla provetta di raccolta
10. Centrifugare per 2 minuti a 13000 RPM per asciugare la resina
11. Assemblare colonnina e provetta di eluizione ed aggiungere 50 μ l di Elution Solution A
12. Centrifugare per 2 minuti a 2000 RPM e poi per 1 minuto a 13000 RPM, quindi porre subito in ghiaccio.
13. Conservazione l'RNA a -80°C

2.4 QUANTIZZAZIONE DELL'RNA MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO

Per valutare la presenza e la purezza dell'RNA estratto dai campioni di esosomi purificati da plasma si ricorre all'uso della spettrofotometria, tecnica che sfrutta la capacità della luce di essere assorbita, a frequenze diverse, dalle sostanze chimiche e biologiche, secondo la legge di Lambert e Beer: $A = \epsilon c l$. Nelle pratiche di laboratorio questa legge viene utilizzata da strumenti che prendono il nome di spettrofotometri, i quali riescono a determinare quantitativamente una sostanza grazie alla correlazione esistente tra concentrazione e assorbanza.

Per la determinazione quali-quantitativa degli RNA estratti è stato utilizzato lo spettrofotometro ND-100 (NanoDrop® Technologies Inc., Wilmington, DE, USA), che consente l'analisi di acidi nucleici a partire da volumi molto piccoli di campione, quale 1µl di campione.

Prima di posizionare il volume di campione richiesto bisogna selezionare il tipo di sostanza che si vuole analizzare nel menù dello strumento, in questo caso RNA, quindi si procede pipettando al termine di una fibra ottica-fibra ricevente 1µl di Milli-Q (acqua purificata e deionizzata) o di soluzione di eluizione (solvente dei campioni dello studio) per fare il bianco, ovvero tarare lo strumento. Si esegue a questo punto l'analisi dei campioni, posizionando il campione nel pozzetto dedicato (al termine di una fibra ottica-fibra ricevente); pochi istanti dopo lo strumento restituisce tre valori: la concentrazione di acido nucleico espressa in ng/µl; l'indice della contaminazione da proteine, dato dal rapporto tra l'assorbanza a 260nm e 280nm; e l'indice della contaminazione da

carboidrati e fenoli (solventi), dato dal rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 230 nm. Un campione di RNA si considera puro quando ha come risultati di questi rapporti dei valori compresi rispettivamente tra 1.8-2.0 e 2.2.

2.5 RETROTRASCRIZIONE DEI MICRORNA

Dopo aver constatato la presenza e la purezza di RNA nel campione si procede con la sua retrotrascrizione, ovvero quella reazione che permette di ottenere una sequenza di DNA a singolo filamento (cDNA) a partire da una sequenza di RNA. La quantità di campione da retrotrascrivere viene calcolata tramite i valori delle concentrazioni ottenute dallo strumento Nanodrop. Utilizzando come valore di riferimento il campione con la concentrazione di RNA più bassa, gli altri campioni vengono diluiti con acqua secondo la formula $C_1V_1 = C_2V_2$, per ottenere le stesse concentrazioni.

Il protocollo per preparare l'RT mix prevede l'utilizzo di reagenti che sono conservati in congelatore a -20.

Nel dettaglio la mix è composta da:

- Deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs) 100mM; i nucleotidi prima di essere messi nella mix devono essere diluiti 1:10 con acqua.
- Buffer; nel quale sono presenti ioni Magnesio.
- Primers; si legano in corrispondenza della sequenza di RNA che si vuole retrotrascrivere. Si utilizza in ogni seduta il primer per il miR-39, controllo interno, e poi altri specifici per i miR che si vogliono ricercare.
- Trascrittasi inversa (RT); enzima caratteristico dei retrovirus che catalizza la reazione di retrotrascrizione per la formazione del cDNA.
- Inibitori delle RNasi; gli inibitori devono essere diluiti 1:10 in acqua; bisogna eseguire la diluizione ogni volta e preparare i reagenti in ogni

seduta per evitare che i cicli di congelamento e scongelamento ne riducano l'efficienza.

- Acqua; che deve essere autoclavata e filtrata per evitare contaminazioni.

Reagenti	Volumi
dNTPS 1:10	1 μ l
Buffer	1 μ l
Primers	2 μ l
Trascrittasi inversa	0.67 μ l
Inibitore RNasi 1:10	1.26 μ l
H ₂ O	0.73 μ l
Campione RNA	3.34 μ l

Tabella 2. Volumi dei reagenti per ogni mix costituite durante la restrotrascrizione. La somma del volume dei reagenti e del campione iniziale di RNA, restituisce un volume totale di 10 μ l.

La reazione avviene in provette da 200 µl, le quali vengono centrifugate e inserite nel termociclatore (PTC-200 Peltier Thermal Cycller), strumento che varia ciclicamente la temperatura per consentire il verificarsi delle reazioni. Dal menù dello strumento viene selezionato il programma RT-mix, che prevede il seguente profilo di temperatura:

- 16°C per 30 minuti
- 42°C per 30 minuti
- 85°C per 5 minuti
- 4°C fino a spegnimento manuale dello strumento

In questo lavoro sono stati retrotrascritti i seguenti microRNA:

- miR-39, analizzato in tutti i campioni poiché inserito durante la procedura di estrazione dell'RNA quale controllo interno
- miR-146a
- miR-126-3p
- miR-210
- miR-451a
- miR-486
- miR-27b-3p

2.6 VALIDAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA TRAMITE RT-PCR

Per validare l'espressione dei microRNA presenti nelle EVs si utilizza la Real Time PCR, metodica che consente di amplificare sequenze specifiche di cDNA e di determinare la loro concentrazione. È una tecnica quantitativa-qualitativa e, come suggerito dal nome, permette l'osservazione dell'amplificato in tempo reale. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, costituite da oligonucleotidi sintetici in grado di legare ed evidenziare i segmenti amplificati, poiché presentano una sequenza complementare a quella dei primers specifici utilizzati nella retrotrascrizione.

Il segnale che si ottiene è direttamente proporzionale alla quantità di RNA presente nel campione di partenza e viene rilevato grazie a un lettore ottico presente nel termociclature, il quale invia il segnale ad un software che converte l'entità della fluorescenza in valore numerico.

Durante le fasi di preparazione del campione si lavora sotto cappa e con materiale dedicato. È importante inoltre che campioni, sonde, reagenti e piastra siano mantenute a basse temperature, per questo motivo si lavora in ghiaccio e con piastra refrigerata, mantenuta in frigo a 4°C.

Si lavora in doppio, quindi si prepara la mix per il numero dei campioni moltiplicato per due.

La mix è composta da:

- Sonde TaqMan, stoccate in congelatore a -20°C
- Mix, conservata in frigorifero a 4°C, contenente la Taq-polimerasi

- Acqua, autoclavata e filtrata

Sonda	0.5 μ l
Mix	5 μ l
H2O	1.84 μ l
cDNA	2.66 μ l

Tabella 3. Valori reagenti per ogni mix costituita durante RT-PCR. La somma del volume dei reagenti e del campione di cDNA, restituisce un volume totale di 10 μ l.

Dopo aver preparato la mix, si centrifuga e si dispensano 7.34 μ l di volume per ogni campione. Si aggiungono 2.66 μ l di cDNA e si inseriscono nel termociclatore "Rotor-Gene Q Qiagen", nel quale verrà selezionato il protocollo specifico per i microRNA.

Si ottengono dei profili di espressione dei microRNA che vengono ricavati dalla visualizzazione degli amplificati, grazie alle sonde utilizzate che, una volta legate alla sequenza specifica emettono il segnale fluorescente.

Nel dettaglio in questo studio sono state utilizzate sonde TaqMan, costituite da un fluoroforo (componente che emette fluorescenza) e un quencer (una sostanza che scherma l'emissione del segnale). Sono sonde che dipendono dall'attività della Taq polimerasi e quindi dalle temperature elevate.

Dopo il legame sonda-sequenza di cDNA non avviene subito il rilascio di fluorescenza, occorre infatti l'intervento dell'enzima Taq polimerasi, che, oltre a svolgere la sua azione di sintesi, va anche a degradare la sonda, separando il quencer dal fluoroforo con conseguente emissione di fluorescenza.

Nelle curve di amplificazione che si ottengono per ogni campione si vanno a distinguere tre fasi principali: fase esponenziale, fase lineare e plateau. Da questo andamento si ricavano parametri fondamentali per l'analisi finale; si individuano: la *linea di base*, valore al di sopra del quale inizia l'accumulo dell'amplificato; il *threshold*, valore scelto dall'operatore, standardizzato a 0.025, in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale per ricavare l'altro parametro, il *CT*, ciclo soglia, ovvero il numero del ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello del threshold. È un indicatore fedele della quantità iniziale di microRNA, su cui si baseranno le analisi dei dati ottenuti.

3 RISULTATI

L'RNA è stato estratto dalle due frazioni di eluizione 8 e 9 ottenute mediante separazione cromatografica dei campioni di plasma effettuata con colonne qEVOoriginal, della ditta Izon Science. La scelta delle due frazioni 8 e 9 è stata effettuata in base alla segnalazione dei produttori quali frazioni più arricchite in esosomi e più povere in proteine libere. L'RNA estratto dalle due frazioni è stato tenuto separato e sono stati amplificati specifici microRNA in entrambe le frazioni, per valutare il recupero dei microRNA e anche possibili andamenti età-associati e patologia-associati. La selezione dei microRNA da analizzare si è basata su dati precedentemente ottenuti mediante smallRNAseq eseguita sugli stessi campioni di plasma da cui sono state separate le frazioni 8 e 9 arricchite in esosomi.

Livelli di espressione di specifici microRNA presenti nelle frazioni 8 e 9 ottenute da separazione cromatografica del plasma di soggetti sani di differente età

La quantificazione dei microRNA selezionati è stata effettuata su campioni di soggetti sani di diversa età, per valutare possibili andamenti età-associati. In figura 1 sono riportati i livelli di espressione del miR-451a nelle frazioni 8 e 9 in tre gruppi di soggetti sani suddivisi per fasce d'età, quali 41-64 anni, 65-99 anni e >99 anni (centenari).

Come è possibile osservare nella figura 1 la frazione 8 è risultata la più arricchita del miR-451a almeno nei gruppi di 65-99 anni e >99 anni.

Inoltre il dosaggio del miR-451a presente nella frazione 8 ha permesso di identificare un chiaro trend in aumento associato con l'età, caratterizzato da livelli significativamente incrementati del miR-451a nei centenari rispetto ai soggetti più giovani.

Tale andamento non è rilevabile dall'analisi di espressione del miR-451a effettuata a partire dalla frazione 9.

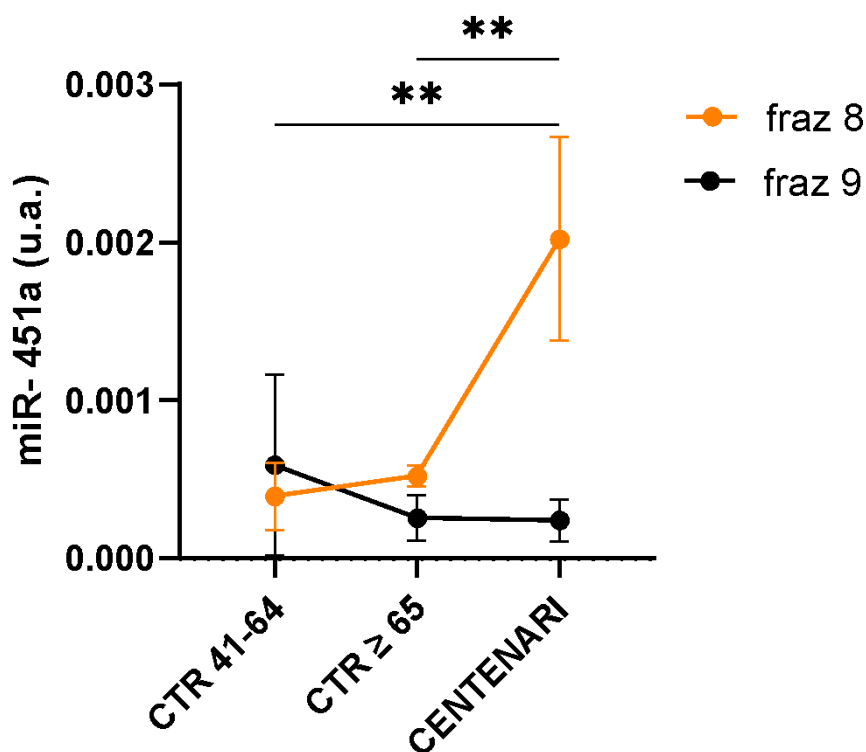


Figura 1. Livelli di espressione del miR-451a nelle frazioni 8 (rosso) e 9 (nero) in tre gruppi di soggetti sani di differente età, quali i soggetti di età compresa fra 41-64 anni, 65-99 anni e >99 anni (indicati come CENTENARI). Il livello di espressione del miR-451a è stato riportato come "espressione relativa espressa in unità arbitrarie (a.u.)".

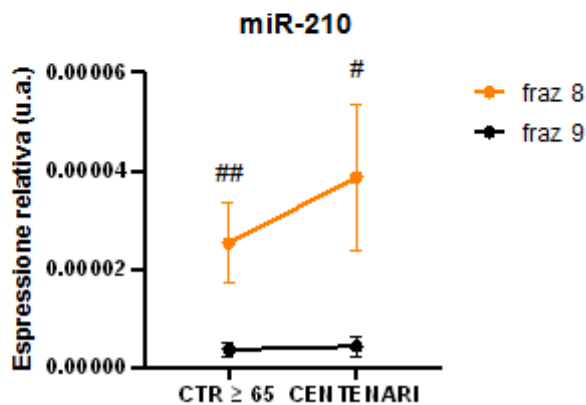
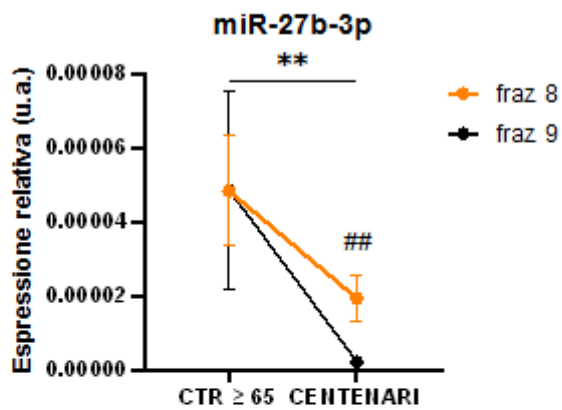
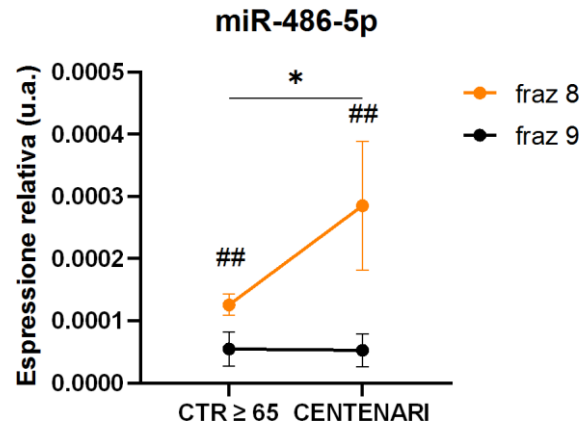


Figura 2. Livelli di espressione dei miR-27b-3p, miR-210 e miR-486-5p nelle frazioni 8 (rosso) e 9 (nero) in due gruppi di soggetti sani di differente età, quali soggetti di età compresa fra 65-99 anni e >99 anni (indicati come CENTENARI). Il livello di espressione dei tre miRNAs analizzati è stato riportato come “espressione relativa espressa in unità arbitrarie (a.u.)”.

Come è possibile osservare nella figura 2, anche per gli altri tre microRNA analizzati, quali il miR-27b-3b, il miR-210 ed il miR-486-5p, la frazione 8 si è dimostrata essere significativamente più arricchita rispetto alla frazione 9.

Analizzando gli andamenti dei livelli di espressione dei tre miRNA nella frazione 8 nei campioni dei CENTENARI rispetto ai soggetti di età compresa fra 65 e 99, si possono osservare tre differenti trends:

- 1) i livelli di espressione del miR-27b-3b sono significativamente ridotti nel gruppo dei centenari rispetto ai livelli presenti nel gruppo di soggetti più giovani;
- 2) i livelli del miR-210 non mostrano differenze significative fra centenari e soggetti più giovani;
- 3) i livelli del miR-486-5p sono significativamente aumentati nei centenari rispetto ai soggetti più giovani.

Livelli di espressione di specifici microRNA presenti nelle frazioni 8 e 9 ottenute da separazione cromatografica del plasma di soggetti sani e di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (T2DM)

È stata analizzata anche l'espressione di altri due microRNA contenuti nelle frazioni 8 e 9 del plasma di un campione di pazienti affetti da T2DM ed è stata confrontata con quella di soggetti sani di età confrontabile rispetto a quella dei pazienti (41-64 anni).

Come è possibile osservare in figura 3, sia il miR-126-3p che il miR-146a contenuti nella frazione 8 sono risultati essere significativamente aumentati nei pazienti diabetici (T2DM) rispetto ai soggetti sani di pari età.

La stessa analisi condotta sulla frazione 9 non permette di evidenziare differenze significative nell'espressione dei due microRNA fra soggetti sani e pazienti diabetici.

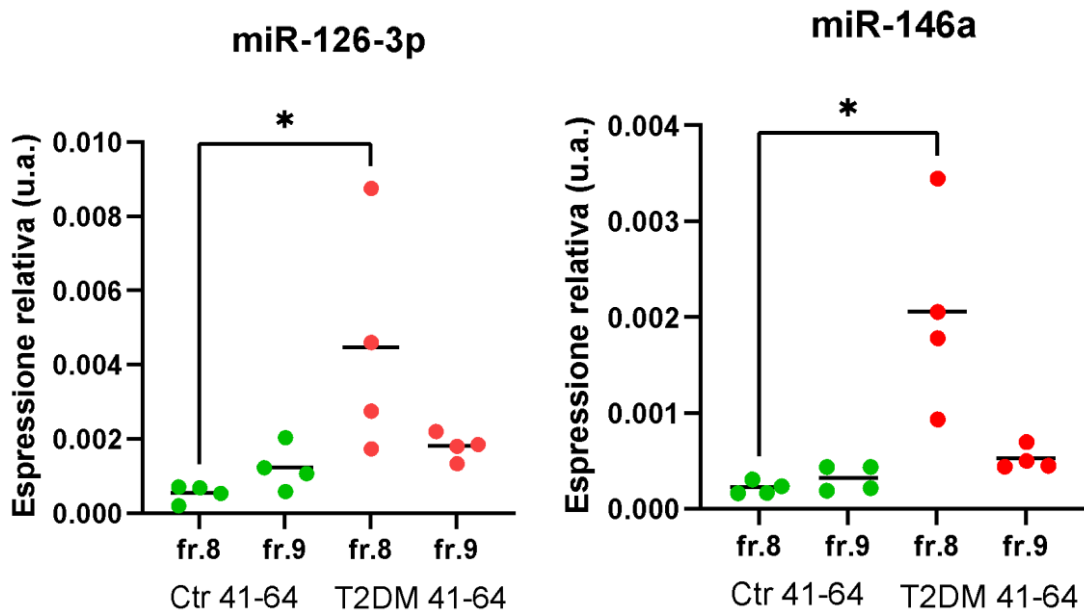


Figura 3. Livelli di espressione del miR-126a e del miR-146a nelle frazioni 8 (rosso) e 9 (nero) in soggetti sani e pazienti affetti da diabete di tipo 2 (T2DN), entrambi di età compresa fra 41 e 64 anni. Il livello di espressione dei due miRNAs analizzati è stato riportato come “espressione relativa espressa in unità arbitrarie (a.u.)”.

4 CONCLUSIONI

L'analisi dell'espressione dei microRNA presenti nel plasma sta acquisendo sempre più interesse nel campo della ricerca di nuovi marcatori utili nel fornire informazioni predittive, diagnostiche e/o prognostiche nel contesto dei processi di invecchiamento e dello sviluppo di patologie associate all'invecchiamento, incluso il diabete di tipo 2.

Se infatti l'osservazione clinica ed i biomarcatori ad oggi disponibili nella pratica clinica possono consentire di caratterizzare il paziente affetto da patologie età associate, è ancora complesso poter capire quale traiettoria di invecchiamento un soggetto giovane-adulto possa intraprendere nel corso della propria vita, così come resta difficile poter predire quali complicanze svilupperà un paziente affetto da malattie età-associate.

In questo contesto i microRNA circolanti nel plasma si sono distinti come biomarcatori minimamente invasivi, dosabili cioè in un prelievo di sangue periferico, capaci di fornire informazioni aggiuntive sul processo di invecchiamento e sullo sviluppo di malattie età-associate o delle loro complicanze.

I microRNA possono circolare nel plasma sia associati a proteine plasmatiche che racchiusi all'interno di vescicole circondate da membrana, che possono essere di varie dimensioni e avere biogenesi diversa. Si ritiene che proprio i microRNA contenuti nelle vescicole extracellulari siano quelli dotati di maggiore significato biologico. La possibilità di separare rapidamente le vescicole più piccole dal plasma, gli esosomi, e di poter analizzare i microRNA in essi

contenuti, è stata fino a poco tempo fa esclusiva di laboratori specializzati poiché richiedeva procedure molto complesse. Da poco tempo sono disponibili in commercio colonne cromatografiche che permettono rapidamente di separare gli esosomi da piccole quantità di plasma. Le informazioni sul contenuto di microRNA delle varie frazioni di plasma che si ottengono da questo procedimento sono ancora molto scarse.

Il lavoro svolto in questa tesi è stato quindi quello di analizzare l'espressione di alcuni microRNA in due frazioni diverse ottenute utilizzando le colonne cromatografiche. Le due frazioni analizzate sono state quelle indicate come le più arricchite in esosomi dai produttori.

Abbiamo inizialmente dimostrato come la frazione 8 sia quella più arricchita in microRNA.

Abbiamo poi confrontato l'espressione di specifici microRNA presenti nelle due frazioni in campioni di plasma di soggetti sani di differente età, incluso un campione di centenari sani. I centenari rappresentano senza dubbio un gruppo molto selezionato di soggetti che sono andati incontro ad un invecchiamento di successo, raggiungendo cioè le età estreme senza aver sviluppato malattie disabilitanti. Quindi identificare i microRNA modulati nei centenari rispetto ai soggetti più giovani potrebbe contribuire ad identificare nuovi biomarcatori di invecchiamento di successo.

Abbiamo dimostrato che l'analisi di microRNA presenti nella frazione 8 può identificare sia variazioni in aumento che in diminuzione di specifici microRNA nei centenari rispetto ai soggetti più giovani, mentre le stesse analisi condotte sulla frazione 9 non hanno evidenziato differenze significative per età. Un dato

interessante riguarda il miR-451a che è risultato essere aumentato significativamente negli esosomi dei centenari. Il miR-451 è stato dimostrato regolare il processo infiammatorio riducendo l'attivazione di NF- κ B, il fattore di trascrizione nucleare maggiormente coinvolto nella produzione di citochine proinfiammatorie (Hua et al., 2019).

In questo contesto i centenari avrebbero un livello aumentato di miR-451a in circolo che potrebbe denotare un ambiente sistemico di tipo "antiinfiammatorio".

Abbiamo analizzato anche l'espressione di due microRNA associati in precedenza con il diabete di tipo 2, quali il miR-126 (Olivieri et al., 2014; 2015) ed il miR-146a (Mensà et al., 2019). Le precedenti analisi erano state effettuate su plasma in toto e su casistiche molto ampie. Abbiamo osservato l'aumento di espressione del miR-126-3p nei pazienti diabetici rispetto ai controlli sani. Quando l'analisi è stata condotta sulla frazione 8 ma non sulla 9. Per quanto riguarda il miR-146a abbiamo osservato lo stesso andamento del miR-126-3p, ossia un significativo aumento nei diabetici rispetto ai controlli, che si osserva solo dal confronto dei livelli di espressione ottenuti dall'analisi dell'RNA della frazione 8.

Possiamo quindi concludere che la frazione di eluizione 8 ottenuta utilizzando colonne cromatografiche Izon per la separazione di frazioni plasmatiche arricchite di esosomi, permette il maggior recupero di microRNA e consente di individuare sia andamenti età-associati che patologia-associati.

Il nostro lavoro confermerebbe come la frazione di microRNA contenuta negli esosomi plasmatici sia di fatto quella con maggiore significato biologico.

5 BIBLIOGRAFIA

Amy E Pasquinelli. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13;13(4):271-82. doi: 10.1038/nrg3162.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281–297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;10:185–191. doi: 10.1261/rna.5167604.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009 Feb;19(2):43-51. doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.003.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell*

Frank F., Sonenberg N., Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature.* 2010;465:818–822

Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of

microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*. 2012 Aug 1;13:357. doi: 10.1186/1471-2164-13-357.

Gurunathan S, Kang MH, Kim JH. A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16:1281-1312. doi: 10.2147/IJN.S291956. eCollection 2021.

Hu W, Song X, Yu H, Sun J, Zhao Y. Therapeutic Potentials of Extracellular Vesicles for the Treatment of Diabetes and Diabetic Complications. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 21;21(14):5163. doi: 10.3390/ijms21145163.

Hua Wei, Jianzhou Li, Yanhua Li, Jian Song. MicroRNA-451 inhibits inflammation and proliferation of glomerular mesangial cells through down-regulating PSMD11 and NF- κ B p6. *Biosci Rep*. 2019 Oct 30; 39(10): BSR20191455. Published online 2019 Oct 25. doi: 10.1042/BSR2019145e1

Ian Del Conde, Miguel A Cruz, Hui Zhang, José A López, Vahid Afshar-Kharghan. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):871-9. doi: 10.1084/jem.20041497.

Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016;428:688-692. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.019.

Kim H, Bae YU, Lee H, Kim H, Jeon JS, Noh H, Han DC, Byun DW, Kim SH, Park HK, Ryu S, Kwon SH. Effect of diabetes on exosomal miRNA profile in patients with obesity. *BMJ*

Koppers-Lalic D., Hackenberg M., Bijnsdorp I.V., van Eindhoven M.A., Sadek P., Sie D. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014;8:1649–1658

Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K., Yoshioka Y., Takeshita F., Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.* 2013;288:10849–10859

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005;438:685–689.

Lee RCFR, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23:4051–4060. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some

microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):769-73. doi: 10.1038/nature03315.

Liu C, Gao Y, Wu J, Zou J. Exosomal miR-23a and miR-192, Potential Diagnostic Biomarkers for Type 2 Diabetes. *Clin Lab*. 2021;67. doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.200612.M Lagos-Quintana 1, R Rauhut, W Lendeckel, T Tuschl. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8. doi:10.1126/science.1064921

Mensà E, Giuliani A, Maticchione G, Gurău F, Bonfigli AR, Romagnoli F, De Luca M, Sabbatinelli J, Olivieri F. Circulating miR-146a in healthy aging and type 2 diabetes: Age- and gender-specific trajectories. *Mech Ageing Dev*. 2019 Jun;180:1-10. doi: 10.1016/j.mad.2019.03.001.

Mensà Emanuela, Angelica Giuliani, Giulia Maticchione, Felicia Gurău, Anna Rita Bonfigli, Fabio Romagnoli, Maria De Luca, Jacopo Sabbatinelli, Fabiola Olivieri Circulating miR-146a in healthy aging and type 2 diabetes: Age- and genderspecific trajectories *Mech Ageing Dev*. 2019 Jun; 180:1-10. doi: 10.1016/j.mad.2019.03.001.

Mikael Simons, Graça Raposo. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Aug;21(4):575-81. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson

PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105.

Monika Baj-Krzyworzeka, Marcin Majka, Domenico Pratico, Janina Ratajczak, Gaston Vilaire, Jacek Kijowski, Ryan Reca, Anna Janowska-Wieczorek, Mariusz Z Ratajczak. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002 May;30(5):450-9. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00791-9.

Nikolaus Rajewsky. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006 Jun;38 Suppl:S8-13. doi: 10.1038/ng1798.

Open Diabetes Res Care. 2020 ;8:e001403. doi: 10.1136/bmjdr-2020-001403.

Olivieri Fabiola, Liana Spazzafumo, Massimiliano Bonafè, Rina Recchioni, Francesco Prattichizzo, Fiorella Marcheselli, Luigina Micolucci, Emanuela Mensà, Angelica Giuliani, Gabriele Santini, Mirko Gobbi, Raffaella Lazzarini, Massimo Boemi, Roberto Testa, Roberto Antonicelli, Antonio Domenico Procopio, Anna Rita Bonfigli. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. *Oncotarget*. 2015 Nov 3; 6(34): 35372–35382. Published online 2015 Oct 19. doi: 10.18632/oncotarget.6164

Olivieri Fabiola, Massimiliano Bonafè, Liana Spazzafumo, Mirko Gobbi, Francesco Prattichizzo, Rina Recchioni, Fiorella Marcheselli, Lucia La Sala,

Roberta Galeazzi, Maria Rita Rippo, Gianluca Fulgenzi, Sabrina Angelini, Raffaella Lazzarini, Anna Rita Bonfigli, Francesca Brugè, Luca Tiano, Stefano Genovese, Antonio Ceriello, Massimo Boemi, Claudio Franceschi, Antonio Domenico Procopio, Roberto Testa. Age- and glycemia-related miR-126-3p levels in plasma and endothelial cells. *Aging (Albany NY)* 2014 Sep; 6(9): 771–786. Published online 2014 Oct 7. doi: 10.18632/aging.100693.

Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. Review Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res.* 2009 Jan; 58(1):1-8.

Reinier A Boon, Kasey C Vickers. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Feb;33(2):186-92. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14:1902–1910. doi: 10.1101/gr.2722704.

Sachin Hajarnis, Ronak Lakhia, Vishal Patel, Xiaogang Li, editors. *MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease*. In: *Polycystic Kidney Disease* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2015 Nov. Chapter 13. Bookshelf ID: NBK373371 DOI: 10.15586/codon.pkd.2015.ch13

Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. Altered expression of MicroRNA in synovial

fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1001–1009.

Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci (Weinh).* 2020;8:2003505. doi: 10.1002/advs.202003505.

Testa R, Olivieri F, Sirolla C, Spazzafumo L, Rippo MR, Marra M, Bonfigli AR, Ceriello A, Antonicelli R, Franceschi C, Castellucci C, Testa I, Procopio AD. Leukocyte telomere length is associated with complications of type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2011 Nov;28(11):1388-94. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03370.x.

Villarroya-Beltri C., Gutierrez-Vazquez C., Sanchez-Cabo F., Perez-Hernandez D., Vazquez J., Martin-Cofreces N. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013;4:2980.

Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul;1820(7):940-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.

Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner A R, Ratajczak J, Emerson S G, Kowalska M A, Ratajczak M Z. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance

their engraftment. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):3143-9. doi:
10.1182/blood.v98.10.3143.

Zhang Xiaoxiao, Yan Zeng. The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov;38(21):7689-97. doi: 10.1093/nar/gkq645.