microRNA E ATEROSCLEROSI: UN GRANDE RUOLO PER PICCOLE MOLECOLE

DONATO SANTOVITO, FRANCESCO CIPOLLONE, ANDREA MEZZETTI

Centro Ricerca Clinica, Centro Scienze dell'Invecchiamento (Ce.S.I.), Università "G. d'Annunzio" Chieti

SOMMARIO

I microRNA (miRNA) sono brevi sequenze endogene di RNA non codificante, in grado di regolare l'espressione genica principalmente a livello post-trascrizionale. Recenti evidenze mettono in luce il loro ruolo nella fisiologia e nella patologia umana e, in particolare, nella patologia neoplastica. Tuttavia, il loro coinvolgimento nella biologia dell'apparato cardiovascolare è stato dimostrato per la prima volta nel 2005: da allora molti studi hanno dimostrato il ruolo dei miRNA nella modulazione di geni coinvolti sia nello sviluppo fisiologico del sistema cardiovascolare sia nei meccanismi fisiopatologici alla base delle malattie cardiovascolari (in particolare rimodellamento e insufficienza cardiaca, aritmie, fibrosi, aterosclerosi e ischemia miocardica e cerebrale). Alla luce di tali rilievi numerose strategie sono state sviluppate al fine di modulare l'espressione dei miRNA, nel tentativo di identificare e realizzare nuove terapie efficaci e mirate per il trattamento e la prevenzione delle malattie cardiovascolari. Obiettivo di questa rassegna è quello di definire il ruolo dei miRNA nella patologia aterosclerotica e di individuare, in tal modo, il razionale per il loro utilizzo come strumento diagnostico e prognostico o come potenziale target terapeutico.

Parole chiave: microRNA; miRNA; patologia cardiovascolare; aterosclerosi; neointima.

Introduzione

Fino agli anni ottanta del secolo scorso, si riteneva che gli RNA non-codificanti (RNA-nc) non svolgessero alcun ruolo biologico e che solo le proteine fossero in grado di modulare l'espressione genica nelle cellule eucariotiche.

Nel 1989 Sydney Altman e Thomas Cech hanno vinto il premio Nobel per la

Indirizzo per la corrispondenza
Donato Santovito
Centro Ricerca Clinica
Centro Scienze dell'Invecchiamento (Ce.S.I.)
Università "G. d'Annunzio"
66013 Chieti (CH), Italy
E-mail: donato.santovito@gmail.com

chimica scoprendo come alcuni RNA-nc potessero avere una attività enzimatica. Era solo il primo passo verso l'acquisizione di una maggiore "dignità" da parte di queste molecole che nel complesso rappresentano il 98% circa di tutti gli RNA cellulari (*Figura 1*).

Più di recente è stata identificata una nuova famiglia di RNA-nc che, per le picco-le dimensioni, è stata denominata "microR-NA" (miRNA): il primo miRNA descritto, il *lin-4*, è coinvolto nella regolazione dello sviluppo di *Caenorhabditis Elegans*.

I miRNA sono una famiglia di RNA-nc endogeni, brevi (19-25 nucleotidi), altamente conservati. Sono caratteristicamente in grado di appaiarsi con una sequenza complementare posta in una regione non tradotta (la 3'-untranslated region, 3'UTR) dell'RNA messaggero (mRNA) bersaglio al fine di provocarne il clivaggio o la repressione della traduzione in proteina.

Sono presenti in tutti i tipi di cellule e sono attualmente riconosciuti come una classe fondamentale di regolatori dell'espressione genica che, modulando circa un terzo dell'intero genoma, intervengono in molte attività biologiche che vanno dalla crescita e differenziazione delle cellule all'apoptosi.

La modifica del loro profilo di espressione si correla con l'insorgenza di numerosi condizioni patologiche, incluse le malattie cardiovascolari.

Obiettivo di questa rassegna è delineare il ruolo dei miRNA nella patologia cardiovascolare (CVD) e in particolare nell'aterosclerosi.

Biologia dei microRNA

Biosintesi

L'espressione dei miRNA è un processo biologico complesso. Nei mammiferi i geni codificanti per i miRNAs sono in genere "ospitati" all'interno di altri geni (codificanti o non codificanti proteine). A seconda che siano localizzati negli introni o negli esoni di tali geni, la loro espressione dipende, rispettivamente, dalla trascrizione del gene "ospitante" o dall'attivazione di un proprio promoter. Va tuttavia notato che molti miRNA condividono un promoter con almeno un altro membro della famiglia e vengono quindi trascritti in un'unica molecola di mRNA multicistronico contenente più miRNA che sono spesso, ma non sempre, funzionalmente correlati tra loro. La RNA polimerasi II, coinvolta nella trascrizione dell'mRNA anche dei geni codifi-

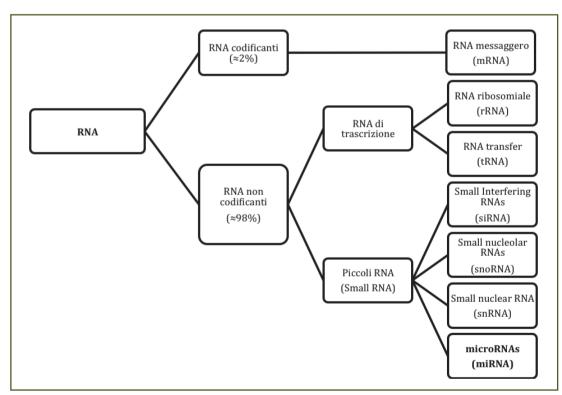


Figura I - Classificazione schematica degli RNA.

canti proteine, è responsabile della trascrizione di un precursore RNA, lungo diverse migliaia di nucleotidi e dotato di forma a loop (a forcina), noto come "miRNA primario" (pri-miRNA). L'endonucleasi nucleare *Drosha* processa il pri-miRNAs clivando la porzione distale e realizzando catene più brevi (70-100 nucleotidi) (1). Si ottiene così il pre-miRNA, che viene trasportato nel citoplasma attraverso il recettore nucleare Esportina-5 (2). Una via biosintetica alternativa prevede che alcuni miRNA possano originare da specifici introni, i cosiddetti "mirtroni", delle dimensioni necessarie per sintetizzare direttamente i pre-miRNA permettendo di bypassare il passaggio catalitico dell'endonucleasi Drosha (3). Una volta nel citoplasma l'enzima Dicer processa il pre-miRNA per ottenere una breve (19-25 nucleotidi) seguenza di RNA a catena doppia. Successivamente una delle

due catene (la cosiddetta catena "stella", miRNA*) viene rapidamente degradata, mentre la rimanente rappresenta il miRNA maturo (4) (*Figura 2*).

L'espressione dei precursori dei miR-NA e la loro maturazione a miRNA maturi può avvenire in maniera tessuto-specifica. Pertanto, cellule di uno specifico tessuto possono presentare un profilo distintivo di miRNA (il cosiddetto "miRNoma").

Meccanismo d'azione

Una volta processati, i miRNA maturi possono interagire con Ago2, enzima della famiglia delle endonucleasi Argonaute, formando i cosiddetti complessi di silenziamento genico RNA-indotto (RNA-induced silencing complex, RISC) che consentono l'interazione tra il miRNA maturo e l'mRNA bersaglio affinché il miRNA possa espletare la sua funzione (degradazione o

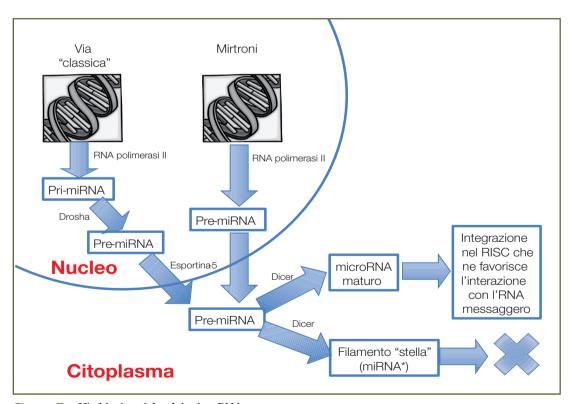


Figura 2 - Vie biosintetiche dei microRNA.

repressione traslazionale). Di solito il miR-NA si lega a una sequenza complementare situata nella regione 3'UTR del mRNA bersaglio, anche se recenti evidenze suggeriscono che il legame possa avvenire anche con la regione 5'UTR. La cosiddetta "seed region", compresa tra i nucleotidi 2 e 8 di un miRNA maturo, è necessaria per il riconoscimento del mRNA bersaglio.

Di assoluto rilievo è l'osservazione che un singolo miRNA può regolare l'espressione di centinaia di mRNA e che, viceversa, un mRNA può presentare numerose sequenze in grado di garantire l'interazione simultanea con multipli e differenti miRNA (5). Inoltre, bisogna considerare che i miR-NA non vengono immediatamente distrutti dopo l'interazione con un singolo bersaglio e, pertanto, possono agire modulando anche altri mRNA (6).

I meccanismi di repressione della traduzione o di degradazione dell'mRNA bersaglio non sono ancora del tutto noti. I RISC possono modulare l'espressione genica sia favorendo l'adesione del mRNA bersaglio, sia reprimendone la traduzione. Il grado di complementarietà tra miRNA e mRNA bersaglio è il principale fattore determinante: infatti il clivaggio del mRNA richiede una elevata complementarietà, laddove un minor grado è sufficiente per la repressione del processo traduzionale (7).

Tuttavia, uno studio sul miR-172 che regola il suo gene target (APETALA2) sopprimendone la traduzione nonostante una elevata complementarietà, suggerisce la presenza di altri fattori determinanti (8). La soppressione della sintesi proteica è generalmente realizzata senza modifiche rilevabili dei livelli di mRNA sebbene nei casi in cui si verifichi una inibizione maggiore del 30% si possa avere anche una destabilizzazione del mRNA (9). Inoltre, nonostante i miRNA regolino l'espressione genica per lo più a livello post-trascriziona-

le, alcuni (es. miR-29b) legano un motivo esanucleotidico che li dirige nel nucleo cellulare, ove regolano la trascrizione e/o lo splicing interagendo con specifici target nucleari (10).

Infine, evidenze sperimentali suggeriscono come i miRNA possano in alcuni casi promuovere, piuttosto che inibire, la traduzione proteica (11). Ulteriori studi saranno necessari per comprendere appieno il complesso meccanismo con cui i miRNA modulano l'espressione genetica.

Ovviamente, grande attenzione è stata posta nell'identificazione dei potenziali geni target dei miRNA. Numerosi algoritmi sono stati sviluppati al fine di prevedere il gene target dei miRNA basandosi sulla conservazione della sequenza, sulla complementarietà strutturale tra la sequenza nucleotidica del miRNA e la seguenza target e su complessi calcoli di stabilità termodinamica. Utilizzando tali algoritmi sono state realizzate delle banche dati disponibili on-line che comprendono, tra l'altro, informazioni sui singoli mRNA e sui loro geni bersaglio potenziali. Uno dei database più completo è il "miRBase" (http://www. mirbase.org/). Tuttavia, molti potenziali bersagli identificati dagli algoritmi non risultano modulati nei modelli sperimentali e viceversa. Quindi, l'identificazione dei target dei miRNA costituisce ancora una delle sfide più ambiziose in quanto è influenzata anche da parametri quali l'accessibilità della sequenza bersaglio e la struttura secondaria del mRNA (12).

miRNAs e patologia cardiaca

La prima correlazione tra l'alterazione dell'espressione dei miRNA e patologia umana è stata rilevata tra la ridotta espressione di miR-15 e miR-16 e lo sviluppo della leucemia linfatica cronica. Da allora numerosi lavori hanno identificato legami tra

l'espressione dei miRNA e vari ambiti patologici. Molti studi hanno dimostrato che i miRNA sono espressi nel tessuto cardiaco con caratteri di forte specificità tissutale e una fine modulazione temporale sin dalle prime fasi dell'embriogenesi. Il miR-1 è il principale miRNA espresso a livello cardiaco (circa il 40% di tutti i miRNA). Tra gli altri miRNA si annoverano: i membri della famiglia let-7 (circa 14%), miR-30 (circa il 5%), miR-29 (circa 4%), miR-26, miR-378, miR-133 (13). I miRNA sono modulati nella patologia cardiovascolare (14) essendo alcuni repressi (miR-1, miR-30, miR-133, miR-150), altri indotti (miR-21, miR-23, miR-125, miR-195, miR-199, miR-214) a seconda della specifica patologia. Uno studio sull'uomo volto a identificare il profilo di espressione miRNA ha identificato l'esistenza una vera e propria "firma" caratterizzante tre diverse malattie cardiache quali la stenosi aortica, la cardiopatia ischemica e la cardiomiopatia dilatativa (14). Infatti, analizzando l'espressione dei miRNA nel miocardio di pazienti con ognuna di queste patologie, gli autori hanno scoperto che laddove 7 miRNA risultavano modulati in tutte e tre le patologie (let-7c, miR-23a, miR-100, miR-103, miR-126*, miR-140, miR-214), 3 miRNA (miR-17-5p, miR-28, miR-106a) risultavano modulati esclusivamente nella cardiomiopatia dilatativa mentre 11 miRNA (let-7e, miR-10a, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-93, miR-126, miR145, miR-181a, miR-374, miR-423*, miR-451, miR-499) selettivamente in pazienti con stenosi aortica. Tali dati suggeriscono il potenziale ruolo determinante che l'alterata espressione di alcuni miRNA svolge nella fisiopatologia di queste patologie cardiache. Inoltre, numerose ulteriori evidenze si sono accumulate sul ruolo dei miRNA nel rimodellamento cardiaco, nell'apoptosi delle cellule miocardiche e nella patogenesi delle aritmie.

Infine, i miRNA regolano non solo la patogenesi delle patologie cardiache, ma anche la loro progressione verso la fase terminale. Ad esempio, l'espressione dei miRNA è regolata dinamicamente durante la progressione dell'ipertrofia cardiaca, dello scompenso e dell'ischemia miocardica. Inoltre, tali modifiche sembrano essere parzialmente reversibili con la terapia come dimostrato in pazienti con insufficienza cardiaca sottoposti a trattamento biomeccanico di supporto. (15) Alla normalizzazione della "firma" dei miRNA non corrisponde quella del profilo di mRNA suggerendo come i miRNA siano più sensibili degli mRNA nel riflettere le variazioni fisiopatologiche in acuto e supportando un ruolo fondamentale di queste molecole nella regolazione fine dell'espressione genica nelle malattie cardiovascolari.

miRNA e patologia vascolare

Il profilo di espressione arterioso dei miRNA risulta notevolmente differente da quello cardiaco con una espressione maggiore di miR-145, miR-125 e miR-23 piuttosto che dei miR-1, miR-133, miR-126, tipicamente espressi a livello cardiaco (16). I miRNA svolgono un ruolo determinante nella fisiologia e fisiopatologia vascolare sin dalle prime fasi dello sviluppo embrionale. Topi dicer-knockout, incapaci quindi di sintetizzare miRNA maturi, vanno incontro a morte in età embrionale tra i giorni 12,5 e 14,5 per anomalie dell'angiogenesi (17).

MicroRNAs e fisiopatologia dell'aterosclerosi Uno dei primi eventi dello sviluppo della lesione aterosclerotica è rappresentato dalla disfunzione endoteliale. Numerosi stimoli (colesterolo LDL ossidato, diabete mellito, ipertensione arteriosa e altri) agiscono aumentando la permeabilità endoteliale e l'espressione di molecole di adesione leucocitaria (es. E-selectina, VCAM-1), favorendo la migrazione dei leucociti nella parete vascolare. In questa fase le lesioni aterosclerotiche sono costituite prevalentemente da macrofagi e da cellule T che, attraverso il rilascio di citochine e fattori di crescita, promuovono, *inter alia*, la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce (VSMC) all'interno delle lesioni.

Questi processi contribuiscono all'evoluzione della placca aterosclerotica.

miRNA e disfunzione endoteliale

Data la notevole rilevanza del ruolo dei miRNAs nella regolazione dell'espressione genica, appare intuitivo come tali molecole giochino un ruolo cardine nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi (*Figura 3*). Di grande interesse è il ruolo del miR-126 che è in grado di sopprimere l'espressione endoteliale di VCAM-1, molecola fondamentale per l'infiltrazione leucocitaria nella parete vasale (18). L'espressione di miR-126 è incrementata dal fattore di trascrizione l'E26 Transformation-Specific (ETS)-1, indotto da agenti pro-infiammatori (es. TNF-α) (19). Tale osservazione supporta l'esistenza di un feedback negativo nel quale l'espressione di miR-126 indotta da ETS-1 contrasta la sintesi di VCAM-1 indotta da TNF-α.

Oltre ad un ruolo di regolazione della fibrosi cardiaca e dell'apoptosi, il miR-21 è implicato nella modulazione della risposta endoteliale allo stress emodinamico tangenziale unidirezionale (*shear stress*). L'in-

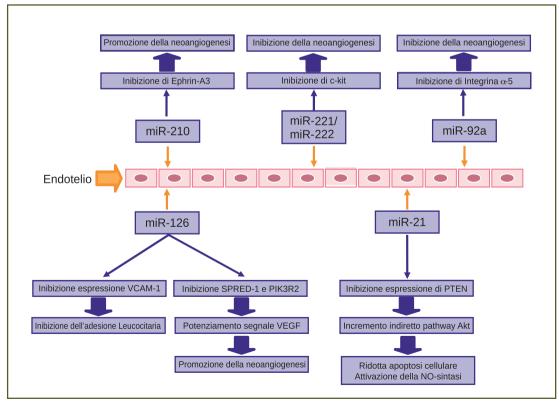


Figura 3 - Effetti dei principali microRNA che agiscono sulle cellule endoteliali (per ulteriori dettagli vedere il testo).

cremento dei valori di miR-21 si riflette in una ridotta espressione di PTEN, un noto bersaglio di tale miRNA, che a sua volta inibisce il pathway di Akt. Pertanto, il miR-21 incrementa indirettamente l'attività di Akt: ne risulta una ridotta apoptosi delle cellule endoteliali e la fosforilazione e attivazione della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) con aumento della produzione di ossido nitrico (NO) (20).

miRNA e cellule muscolari lisce: la formazione della neointima

Uno step determinante nella progressione della patologia aterosclerotica è la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce per formare la cosiddetta neointima (*Figura* 4). Anche in tale contesto è stato dimostrato un ruolo per il

miR-21. In uno studio su modello murino, il miR-21 è risultato il miRNA maggiormente incrementato dopo un insulto vascolare sperimentale (mediante angioplastica dell'arteria carotide) e la sua inibizione mediante nucleotidi antisenso ha ridotto la formazione della neointima in virtù di un effetto pro-proliferativo e anti-apoptotico mediato dall'attivazione indiretta del pathway PI3K/AKT dipendente dalla soppressione di PTEN (16).

Anche il miR-145 risulta coinvolto nello sviluppo della neointima in quanto è implicato nella differenziazione delle VSMC, nella organizzazione dei miofilamenti, nella modulazione dei flussi di calcio in risposta all'endotelina-1 e nella risposta all'insulto vascolare. Tali effetti sono conseguenza della sua azione su molteplici target quali

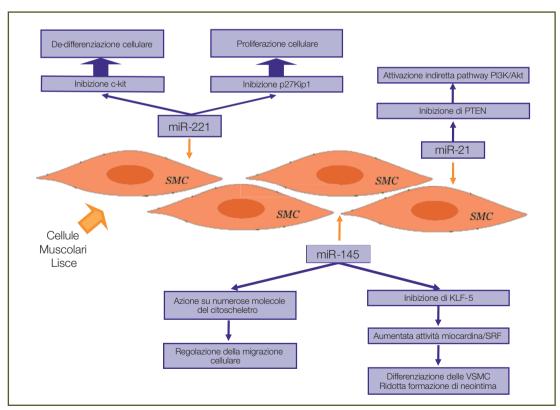


Figura 4 - Effetti dei principali microRNA che agiscono sulle cellule muscolari lisce della parete vascolare (per ulteriori dettagli vedere il testo).

il fattore Kruppel-like (KLF)-5, l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) e altri (21). La sua espressione è ridotta in seguito ad un insulto vascolare sperimentale, mentre la sua sovraespressione riduce la formazione di neointima (22). Le arterie di ratti knockout per i miR-143/ miR-145 (espressi in maniera bicistronica) sono caratteristicamente sottili e le VSMC presentano una minore formazione di actina in risposta allo stress con riduzione del tono vascolare e bassi valori della pressione sistolica (23). Tuttavia, il ruolo di miR-145 nella formazione della neointima non è ancora del tutto chiaro. Infatti, uno studio ha dimostrato come topi knockout per miR-145 presentino una minore formazione di neointima in seguito a insulto vascolare (legatura arteriosa) (23). La causa di questi dati apparentemente contrastanti è ancora sconosciuta.

Il miR-221, insieme al miR-222, è primariamente coinvolto nella regolazione della proliferazione delle cellule endoteliali. Tuttavia la sua espressione è indotta nelle VSMC dal fattore di crescita derivato dalle piastrine (Platelet Derived Growth Factor, PDGF). Quest'ultimo, legandosi al suo recettore, determina la transizione delle VSMC da un fenotipo differenziato ad uno "de-differenziato" con conseguente incremento della migrazione e proliferazione cellulare e progressione della lesione neointimale successiva all'insulto vascolare (24). Il miR-221 partecipa a questo processo modulando i suoi target c-kit (riducendo conseguentemente la differenziazione delle VSMC) e p27Kip1 (possibile responsabile della aumentata proliferazione cellulare). Sorprendentemente vi è un moderato aumento dell'espressione di miR-221 nella carotide di ratti dopo insulto vascolare (16): tale osservazione permette di individuare nel miR-221 un possibile target terapeutico per modulare la progressione dell'aterosclerosi. A tal riguardo, è interessante notare come l'atorvastatina (ma non la pravastatina) riduca i livelli di miR-221 e miR-222 nelle cellule progenitrici endoteliali dei pazienti con malattia coronarica (25).

miRNA e infiammazione

L'infiammazione svolge un ruolo di primaria importanza nello sviluppo e nell'evoluzione dell'aterosclerosi. Sebbene pochi studi abbiano indagato il ruolo dei miRNA nell'infiammazione vascolare, numerosi ne hanno chiarito il ruolo nella differenziazione e nella modulazione delle cellule infiammatorie. Ad esempio, il miR-424, sovraespresso nei precursori mieloidi, promuove la differenziazione monocitaria modulando l'espressione del fattore di trascrizione NFI-A. (26) Anche il miR-146 è coinvolto nella risposta infiammatoria, la sua espressione è incrementata dal lipopolisaccaride batterico (LPS) e da alcuni mediatori pro-infiammatori (es. TNF-α e IL-1 β) in maniera dipendente da NF-kB. Nei monociti umani l'aumentata espressione di miR-146 inibisce l'espressione del recettore di IL-1 associato alla chinasi-1 (IRAK-1) e del TRAF-6 (TNF receptorassociated factor-6), due molecole chiave della trasduzione del segnale dei Toll-like receptor (TLR) e dei recettori per le citochine (27). Studi condotti su pazienti affetti da artrite reumatoide (AR) hanno rilevato una sovra-espressione di miR-146 rispetto a soggetti sani o affetti da artrosi. (28) Inoltre, in pazienti affetti da artrosi, l'elevata espressione di miR-146a correla con la ridotta espressione di metalloproteinasi di matrice (MMP)-13 mediata probabilmente da un meccanismo di feedback negativo che coinvolge IRAK-1 e TRAF-6 (29). Tale dato desta notevole interesse per il ruolo di alcune MMP nella destabilizzazione della placca aterosclerotica.

Il TLR-4 riveste un ruolo da attore protagonista nello sviluppo e nella destabilizzazione della placca aterosclerotica. La sua espressione è modulata dai miRNA in un modello sperimentale di colangite da Cryptosporidium parvum (30). Inoltre, la stimolazione del TLR-4 induce l'espressione di miR-147, che mediante la sua attività inibitoria sul rilascio di citochine pro-infiammatorie (es. Il-6, TNF-α), può contribuire alla modulazione dell'infiammazione. (31) Un ruolo protettivo di questo miRNA è ulteriormente supportato dall'osservazione che la sua espressione è 4 volte inferiore nei monociti circolanti di pazienti con malattia coronarica (32). Tale ruolo dovrà essere confermato da studi disegnati appositamente.

MicroRNA e angiogenesi

L'angiogenesi è coinvolta nel ripristino del flusso ematico dopo una lesione ischemica ed è importante per l'evoluzione della placca aterosclerotica verso un fenotipo vulnerabile. Essa è risultante dell'equilibrio tra proliferazione e apoptosi delle cellule vascolari, in particolare VSMC. Come già visto, i miRNA sono essenziali per la differenziazione, la proliferazione e la funzionalità delle VSMC e, in particolare, *miR-126*, *miR-145*, *miR-210*, *miR-221* e *miR-222* svolgono un ruolo da protagonisti nel processo di angiogenesi e neoangiogenesi.

Oltre ai già citati effetti sull'espressione di molecole di adesione, il *miR-126* è dotato di una attività pro-angiogenica poiché è in grado di modulare la risposta delle cellule endoteliali al fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), un potente fattore pro-angiogenico (33). Tra i target di questo miRNA si annoverano due inibitori del pathway intracellulare di VEGF (SPRED-1 e la subunità regolatrice 2 fosfatidilinositolo-3-chinasi (PIK3R2)). Nel modello murino la delezione di *miR-126* determina una

profonda alterazione del sistema vascolare e morte dell'embrione. (34) Inoltre, i topi che sopravvivono vanno incontro a rottura vascolare dopo un infarto miocardico per un deficit dell'angiogenesi e della stabilizzazione vascolare che normalmente si verificano nel tessuto infartuato (34).

Anche *miR-210* sembra dotato di un importante ruolo pro-angiogenico ed è tipicamente aumentato in condizioni di ipossia in vitro (35). La sua soppressione è associata al blocco della formazione del network capillare in risposta all'ipossia attraverso una modulazione di ephrin-A3. D'altra parte, la sovra-espressione di miR-210 sembra correlata a una crescita più rapida dei vasi sanguigni in condizioni di normale tensione di ossigeno (36). Tra i miRNA con proprietà pro-angiogeniche vanno citati anche il *miR-130* (che ha come target GAX-2 e Hoxa-5) e il *miR-378* (che agisce regolando l'espressione di Sufu).

Al contrario, altri miRNA inibiscono la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali svolgendo un ruolo anti-angiogenico. Tra questi vanno inclusi i miR-221 e miR-222 che svolgono il loro ruolo antiangiogenico diretto mediante l'inibizione di c-kit (recettore dello stem cell factor) e indiretto tramite modulazione dell'espressione di eNOS (37). Recenti evidenze suggeriscono inoltre un coinvolgimento del miR-222 nell'inibizione del rimodellamento vascolare mediato dall'infiammazione dovuto alla modulazione dell'espressione del fattore di trascrizione "signal transducer and activator of transcription 5A" (STA-T5A) nelle cellule endoteliali umane (38).

Più complesso è invece il ruolo del cluster miR-17-92 che può avere un ruolo proo anti-angiogenico in relazione alla cellula che lo esprime. In particolare il miR-92a è sovraregolato nelle cellule endoteliali dopo un'ischemia e modula negativamente l'integrina α5 (ITGA5) svolgendo un ruolo

anti-angiogenico. Coerentemente con questa osservazione, l'antagonismo in vivo di miR-92a favorisce una rapida angiogenesi determinando un miglior recupero funzionale dopo un'ischemia (39).

Al contrario, *miR-19* e *miR-18*, membri del medesimo cluster, promuovono l'angiogenesi nelle cellule tumorali (40). Ulteriori evidenze saranno necessarie per valutare l'espressione e il ruolo di questi ultimi nel contesto dell'aterosclerosi.

miRNA e segnale dell'angiotensina

Oltre ai ben noti effetti emodinamici (aumento della sintesi di aldosterone, contrazione delle VSMC,...) l'angiotensina II esercita molte attività chiave anche nel rimodellamento cardiaco, nell'insufficienza cardiaca e nell'aterosclerosi (stimolazione dell'espressione di VCAM-1 nelle cellule endoteliali e dell'ossidazione delle LDL, degradazione dell'ossido nitrico, ...).

Il miR-155 ricopre un interessante ruolo nella patologia cardiovascolare grazie alla sua capacità di modulare l'espressione del recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R) nelle cellule endoteliali e nelle VSMC. Tale miRNA è espresso a livello del cromosoma 21 e la sua espressione maggiore nella sindrome di Down può in parte spiegare l'ipotensione di tali pazienti (41).

È interessante notare che il polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP) di AT1R, caratterizzato dalla trasversione A/C in posizione 1166 a livello 3'UTR di questo gene, si associa a una maggior incidenza di malattie cardiovascolari (come l'ipertensione, l'infarto miocardico, l'insufficienza cardiaca), probabilmente a causa di un incremento degli effetti dell'angiotensina II mediati da AT1R.

Tale polimorfismo, infatti, inibisce l'accoppiamento della regione 3'UTR del mRNA con il miR-155 riducendo l'azione di inibizione post-trascrizionale (42). La più

alta incidenza di malattie cardiovascolari nei soggetti portatori di questo fenotipo supporta indirettamente un ruolo ateroprotettivo del miR-155.

Potenziali applicazioni nella pratica clinica

Alla luce di quanto finora detto, appare chiaro come la ricerca sui miRNA possa condurre allo sviluppo di nuovi mezzi diagnostici, prognostici e terapeutici anche nell'ambito della medicina cardiovascolare, come già sta avvenendo in ambito oncologico.

I miRNA come marker di danno cardiovascolare

Numerosi studi hanno mostrato una stabilità dei miRNAs nel siero: pertanto una loro alterata espressione (incrementata o ridotta) può riflettere la presenza di una patologia. I miRNA circolanti si sono dimostrati validi marker di alcune neoplasie e del danno epatico indotto da farmaci.

Dato il ruolo chiave nella fisiopatologia cardiovascolare, l'analisi del profilo di espressione di miRNA potrebbe migliorare sensibilità e specificità degli attuali modelli diagnostici e prognostici.

Ad esempio, il miR-1 costituisce il miR-NA maggiormente espresso nelle cellule cardiache e la sua espressione aumenta anche a livello sierico in corso di ischemia miocardica acuta delineando un possibile ruolo di tale miRNA come marcatore di miocardiocitonecrosi (43).

Per di più i valori di miR-1 si correlano direttamente con la durata del QRS e, quindi, con anomalie della conduzione che mettono i pazienti infartuati a rischio di sviluppare aritmie potenzialmente fatali.

Inoltre. la valutazione del profilo di espressione dei miRNA nel sangue di soggetti con coronaropatia stabile ha eviden-

ziato una riduzione dei livelli di miR-126, miR-17-92 (famiglia di miR espressi nelle cellule endoteliali), e miR-155 (implicati nella modulazione dell'infiammazione) e un incremento di espressione di miR-133a e miR-208, notoriamente espressi nei cardiomiociti (44). Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato come l'incrementata espressione a livello della placca aterosclerotica dei miR-100, miR-127, miR-133a. miR-133b correli, nell'uomo, con l'evidenza clinica di instabilità di placca lasciando presupporre un ruolo di tali miRNA nella modulazione dei processi di destabilizzazione della placca e, quindi, nello sviluppo di eventi aterotrombotici (45).

Inoltre, un piccolo studio ha ipotizzato una correlazione tra il profilo di espressione di miRNA sierici con la diagnosi di ictus cerebri ischemico nell'uomo (138 miRNA sovraespressi e 19 miRNA ridotti) e con il suo sottotipo (sec. Classificazione TOAST) (46). Si tratta, tuttavia, solo di uno studio pilota, che include meno di 20 soggetti asiatici: pertanto, prima di applicare tali nozioni alla pratica clinica, è necessario ottenere dati da studi più ampi e multicentrici.

miRNA: obiettivo e strumento terapeutico

Dato che l'alterata espressione, in senso positivo e negativo, di uno o più miRNA contribuisce allo sviluppo e alla progressione di specifiche patologie cardiovascolari, esiste la possibilità che una "correzione" dei miRNA espressi in maniera aberrante possa essere in grado di invertire il processo patologico: ciò pone le basi per l'utilizzo dei miRNA come target terapeutico.

Modulazione positiva: "miRNA mimics"

Se una patologia correla con una riduzione di espressione dei miRNA, l'utilizzo di analoghi sintetici dei miRNA può rivelarsi un approccio efficace, peraltro già impiegato negli studi di ricerca di base con buoni

risultati. Tuttavia, come già detto, un miR-NA può avere come target molti mRNA e, quindi, l'attività di un miRNA esogeno può essere non-specifica.

Al fine di determinare una modulazione il più possibile gene-specifica sono stati sviluppati i cosiddetti "miRNA-mimic", acidi nucleici sintetici in grado di legare esclusivamente una specifica seguenza a livello 3'UTR degli mRNA bersaglio, agendo come modulatori post-trascrizionali, così come i miRNA endogeni. I miRNA-mimic sono sequenze di RNA a doppia catena: uno dei due filamenti, denominato "filamento guida", è identico alla sequenza del miRNA maturo, mentre l'altro è solo in parte complementare al "filamento guida" ed è legato al colesterolo per migliorarne la captazione cellulare. La struttura duplice è necessaria per un efficace riconoscimento e caricamento del filamento guida da nel RISC. Evidenze su modello animale suggeriscono un ruolo promettente di questa tecnica per la modulazione dell'espressione genica. Tuttavia, anche se i miRNA mimic sono ampiamente utilizzati in studi in vitro, il loro utilizzo in vivo appare piuttosto complesso.

Regolazione negativa: oligonucleotidi antisenso

L'inibizione dell'espressione miRNA può essere ottenuta usando tecniche diverse. Il metodo più conosciuto consiste nell'utilizzo di un singolo filamento di oligonucleotidi complementari ai miRNA o alle sequenze dei loro precursori, i cosiddetti AMO (anti-miRNA oligonucleotides).

I meccanismi di azione non sono stati ancora pienamente compresi: probabilmente includono l'inibizione dell'incorporazione dei miRNA nel RISC o il blocco della sintesi di miRNA (47). Al fine di ottenere un profilo farmacocinetico più favorevole, gli AMO possono essere chimicamente mo-

dificati. Ad esempio, nel formare gli antagomiR, gli AMO sono coniugati con molecole di colesterolo all'estremità 3' e con un fosforotioato ad entrambe le estremità per evitarne la degradazione a opera delle nucleasi: questo approccio facilita l'uptake da parte delle cellule e, quindi, la possibilità di una somministrazione sistemica in grado di realizzare un'ampia diffusione in tutti i tessuti, tranne il cervello. Molti studi di base hanno dimostrato l'effetto terapeutico di un'infusione endovenosa di antagomiR nelle patologie cardiovascolari, alimentando le speranze di un possibile uso clinico efficace. Al fine di migliorare la specificità di AMO, è stata sviluppata una tecnica di "mascheramento del miRNA", per ottenere una piena complementarietà con il sito di legame per il miRNA in regione 3'UTR del mRNA bersaglio: in tal modo, le "maschere" possono inibire selettivamente l'abbinamento di un dato miRNA con un mRNA target selezionato, senza interferire con il legame di altri target.

Buoni risultati sono stati ottenuti anche con l'uso di LNA (Locked Nucleic Acid)antimiRs: si tratta di oligonucleotidi contenenti legami fosforotioato al posto dei legami fosfodiestere standard. Ad esempio, l'infusione endovenosa di LNA-antimiR-122, induce una riduzione efficace dei livelli epatici di miR-122 e una up-regulation di molti dei target previsti (48). È interessante notare come LNA-antimiR-122 sia in grado di ridurre di ridurre i livelli di colesterolo plasmatico di primati non umani in maniera dose-dipendente, senza evidenza di tossicità o modifiche istopatologiche (49). Tali osservazioni costituiscono l'humus di cui si nutrono le speranze per un possibile utilizzo di queste molecole nel trattamento dell'ipercolesterolemia.

Tuttavia, gli AMO agiscono come inibitori competitivi dei miRNA: i loro effetti sono transitori e dose-dipendenti e richiedono alte dosi (almeno 80 mg/kg) per una inibizione efficace. Nel tentativo di superare questo limite, è stata sviluppata un'altra strategia, quella dei miRNA "spugna" (miRNA sponges): si tratta sequenze di RNA che, a livello 3'UTR, presentano multiple sequenze in grado di legare i miRNA. Essi agiscono come inibitori competitivi dei target e possono essere progettati in modo da interagire con tutti i membri di una cluster di miRNA, al fine di raggiungere una inibizione di un intera classe funzionale (50).

Principali limitazioni terapeutiche

Sebbene i risultati emersi dagli studi preclinici siano incoraggianti, restano ancora molti limiti da superare prima di un utilizzo terapeutico nella pratica clinica quotidiana. In primo luogo negli studi, la via di somministrazione dei miRNA-mimic e degli antagonisti dei miR è l'infusione endovenosa. Pur garantendo una distribuzione sistemica, i livelli maggiori si ottengono negli organi di clearance (rene e fegato). Serviranno quindi tecnologie che garantiscano una selettiva distribuzione al sistema cardiovascolare, ad esempio coniugando queste molecole con peptidi che determinino un uptake selettivo da parte di cellule selezionate oppure mediante la somministrazione locale (es. durante angiografia selettiva). In secondo luogo, come sopra descritto, lo sviluppo di patologia si associa più frequentemente all'alterata espressione di molteplici miRNA. Si dovrebbe pertanto considerare l'interazione tra i diversi miRNA prima di agire sul singolo.

Infine, alcuni potenziali target individuati mediante gli algoritmi già citati, potrebbero non essere regolati dalle concentrazioni fisiologiche dei miRNA; invece una modulazione farmacologica potrebbe realizzare concentrazioni notevolmente superiori a quelle fisiologiche e di conseguenza regolare target solitamente non modulati. A tal proposito, è rimarchevole la differenza di risultati ottenuti con la modulazione mediata da antimiR o miRNA-mimic piuttosto che con delezione genica. Studi preclinici e clinici saranno necessari per portare la terapia basata sui miRNA dal laboratorio al letto del paziente.

conoscenza del loro ruolo nelle malattie cardiovascolari, sebbene sia solo all'inizio, è in rapida crescita. In futuro, l'analisi dei "miRNA signature" potrebbe fornire molti dati diagnostici e prognostici e condurre allo sviluppo di efficaci terapie per ogni condizione.

Conclusioni

I miRNA svolgono una funzione centrale nei principali processi biologici. La

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare la dott. ssa Camilla Paganelli per l'importante contributo nella stesura della presente rassegna.

Glossario

RNA non-codificanti: sequenze di RNA che non codificano per alcuna proteina a livello cellulare. Rappresentano circa il 98% di tutti gli RNA delle cellule eucariotiche e comprendono gli RNA implicati nella traduzione proteica (RNA ribosomiali, RNA transfer) e gli "small-RNA" che comprendono, tra gli altri i microRNA.

MicroRNA (miRNA): brevi sequenze endogene di RNA non codificante che agiscono come regolatori dell'espressione genica prevalentemente a livello post-trascrizionale mediante l'interazione con specifiche sequenze localizzate nel 3'UTR degli RNA messaggeri dei geni bersaglio.

Introne: sequenza di nucleotidi all'interno di un gene che, sebbene venga trascritta dalla RNA polimerasi, viene rimossa durante la sintesi dell'RNA messaggero maturo mediante il processo di splicing: pertanto non contribuisce alla struttura della proteina codificata dal gene.

Esone: sequenza di nucleotidi all'interno di un gene che codificano per una sequenza di aminoacidi durante la sintesi della proteina codificata dal gene stesso.

Promoter: regione di DNA localizzata a monte di uno specifico gene, contenente sequenze specifiche alla quale può legarsi la RNA polimerasi per avviare la trascrizione del gene. **Splicing:** meccanismo di maturazione dell'RNA caratterizzato dalla rimozione degli introni dal trascritto primario e, di conseguenza, dalla costituzione di una sequenza di RNA maturo costituito dalle sole sequenze codificanti (esoni).

MicroRNA mimic: sequenza di nucleotidi di sintesi analoghi ad uno specifico miRNA. Vengono utilizzati per incrementare i livelli di un miRNA a livello sperimentale e potenzialmente per fini terapeutici

Oligonucleotide antisenso: sequenza di nucleotidi sintetici complementare ad uno specifico miRNA. Vengono utilizzati per diminuire i livelli "funzionali" di un miRNA cellulari e inibirne l'azione.

Bibliografia

- 1. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H et al.The nuclear RNAse III Drosha initiates microRNA processing. Nature 2003; 425: 415-419.
- 2. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen B. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microR-
- NAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 2003; 17: 3011-3016.
- 3. Okamura K, Hagen J, Duan H, Tyler DM et al. The mirtron pathway generates microR-NA-class regulatory RNAs in Drosophila. Cell 2007: 130: 89-100.
- 4. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy

- E, Norman J, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 2005: 436, 740–744.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 2005; 3: e85.
- 6. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science 2002; 297: 2056-2060.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP et al. Prediction of mammalian microR-NA targets. Cell 2003; 115: 787-798.
- 8. Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by amicroR-NA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell 2003: 10: 10.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, et al. The impact of microRNA on protein output. Nature. 2008; 455: 64-71.
- Kim DH, Saetrom P, Snøve O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2008; 105: 16230-16235.
- 11. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science. 2007; 318: 1931-1934.
- 12. Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for mirNA-target interactions. Nat. Struct. Mol. Biol. 2006; 13: 849-851.
- 13. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Circulation Research 2009; 105(6): 585-594.
- Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. Physiol Genomics. 2007; 31: 367-373.
- 15. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. Circulation 2009; 119(9): 1263-1271.
- 16. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroR-NA in vascular neointimal lesion formation. Circ Res. 2007; 100: 1579-1588.
- 17. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, et al. Dicer is required for embryonic angiogen-

- esis during mouse development. J Biol Chem. 2005; 280; 9330-9335.
- Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule
 Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 1516-1521.
- 19. Harris TA, Yamakuchi M, Kondo M, Oettgen P et al. Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of microRNA-126 in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30: 1990-1997.
- 20. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. Biochemical and Biophysical Research Communications 2010; 393: 643-648.
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. Nature. 2009; 460: 705-710.
- 22. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, et al. MicroR-NA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. Circ Res. 2009; 105:158-166.
- 23. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. Genes Dev. 2009: 23: 2166-2178.
- 24. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, et al. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. J Biol Chem. 2009; 284:3728 –3738.
- 25. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. Eur J Clin Invest 2009; 39: 359-367
- 26. Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:19849–19854.
- 27. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103: 12481–12486.
- 28. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M,

- et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. Arthritis Rheum 2008; 58:1284-1292
- Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, Ishikawa M, et al. Expression of microRNA-146 on osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum 2009; 60: 1035-1041
- 30. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against Cryptosporidium parvum infection. J Biol Chem 2007; 282: 929–938
- 31. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ et al. miR-147, a microRNA that is induced upon Tolllike receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 15819-24
- 32. Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. BIOCHEMICAL AND BIO-PHYSICAL RESEARCH COMMUNICA-TIONS 2010; 394: 792-797
- 33. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell. 2008;15:272–284.
- 34. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126. Development. 2008;135:3989 –3993.
- 35. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. J Biol Chem. 2008;283:15878– 15883.
- 36. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, et al. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. FEBS Lett. 2008;582:2397–2401.
- 37. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. Blood. 2006;108:3068–3071.
- 38. Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C et al. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2010; 30: 1562-1568

- 39. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. Science. 2009:324:1710 –1713.
- 40. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. Nat Genet. 2006;38:1060–1065.
- 41. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. Am J Hum Genet 2007; 81: 405-13
- 42. Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, et al. The human angiotensin II type 1 receptor b1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding. J Biol Chem 2007;282:24262–24269.
- 43. Ai J, Zhang R, Li, Y, Pu J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. Biochemical and Biophysical Research Communications 2010; 391: 73-7
- 44. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. Circ Res. 2010; 107:677-84.
- 45. Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Ucchino S. et al. "A unique miRNA signature associated with plaque instability in humans", Stroke in press
- 46. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, Lim KY, et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. PLoS ONE 2009; 4: e7689
- 47. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature 2005; 438: 685-689.
- 48. Elmén J, Lindow M, Silahtaroglu A, Bak M, et al. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. Nucleic Acids Res 2008: 36: 1153 1162
- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, et al. LNA-mediated microRNA silencing in nonhuman primates. Nature 2008; 452: 896-899
- 50. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. Nat Methods. 2007; 4: 721-6.