

Magdalena Żurawek¹, Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk¹, Katarzyna Iżykowska¹, Iwona Ziółkowska-Suchanek¹, Bogda Skowrońska², Maria Czaińska³, Marta Kazimierska¹, Marta Podralska¹, Piotr Fichna², Grzegorz Krzysztof Przybylski¹, Jerzy Nowak¹, Marta Fichna^{1, 4}, Natalia Rozwadowska¹

¹Institut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk w Poznaniu

²Klinika Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

³Przychodnia Lekarza Rodzinnego, Murowana Goślina

⁴Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Nadekspresja miR-652-5p u chorych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1

Overexpression of miR-652-5p in new onset type 1 diabetes

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Zurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Izykowska K et al. Overexpression of miR-652-5p in new onset type 1 diabetes. Clin Diabetol 2018; 7, 4: 189–195. DOI: 10.5603/DK.2018.0019.

Należy cytować wersję pierwotną.

STRESZCZENIE

Wstęp. MicroRNA (miRNA) to krótkie, niekodujące RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Cząsteczki miRNA odgrywają istotną rolę w regulacji centralnej i obwodowej tolerancji immunologicznej, dlatego analiza niekodujących RNA w cukrzycy typu 1 (T1D) jest istotnym problemem badawczym. Celem badania była analiza ekspresji miR-652-5p w nowo zdiagnozowanych przypadkach cukrzycy typu 1 oraz ocena miejsc wiązania miR-652-5p w potencjalnych genach docelowych *ADAR* i *MARCH5*.

Metody. Analiza ekspresji miR-652-5p została przeprowadzona w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 (n = 28) oraz w dobranej pod względem wieku grupie kontrolnej (n = 28) na podstawie metody PCR w czasie rzeczywistym. Miejsca wiązania miR-652-5p w genach docelowych zostały ocenione z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy.

Wyniki. Analiza ekspresji wykazała podwyższony poziom miR-652-5p u pacjentów z T1D w porównaniu z grupą zdrowych dawców (p < 0,05). Ocena miejsc wiązania w układzie reporterowym lucyferazy nie

wskazała genu *ADAR* i *MARCH5* jako potencjalnych genów docelowych miR-652-5p.

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazały miR-652-5p jako potencjalny biomarker cukrzycy typu 1.

Słowa kluczowe: analiza ekspresji, miR-652-5p, *ADAR*, *MARCH5*

ABSTRACT

Introduction. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA regulating gene expression at the post-transcriptional level. miRNAs have emerged as an important regulators of central and peripheral immune tolerance, therefore study the RNA molecules in the context of type 1 diabetes (T1D) pathogenesis is an important issue. The aim of this study was to investigate miR-652-5p expression level in the new onset T1D and an impact on *ADAR* and *MARCH5*, potential target genes.

Material and methods. The miR-652-5p expression was investigated in the peripheral blood mononuclear cell of newly diagnosed T1D pediatric patients (n = 28) and age-matched controls (n = 28) by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). miRNA targets were analyzed by luciferase reporter assays.

Results. Expression analysis revealed upregulation of miR-652-5p in T1D group compared to non-diabetic controls (p < 0.05). Luciferase reporter assay did not indicated *ADAR* and *MARCH5* as miR-652-5p targets.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Magdalena Żurawek

Institut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Tel.: (+ 48) 61 657 92 81, faks: (+ 48) 61 823 32 35

e-mail: magdalena.zurawek@gcz.poznan.pl

Tłumaczenie: lek. Małgorzata Kamińska

Nadesłano: 04.06.2018

Przyjęto do druku: 22.07.2018

Conclusion. Our study revealed miR-652-5p as potential marker of new onset type 1 diabetes.

Key words: T1D, expression, miR-652-5p, *ADAR*, *MARCH5*

Wstęp

Cukrzyca typu 1 (T1D, *type 1 diabetes*) jest częstą chorobą o podłożu autoimmunologicznym, spowodowaną zniszczeniem komórek beta trzustki produkujących insulinę w procesie, w którym uczestniczą limfocyty T. Patogeneza T1D jest następstwem złożonych oddziaływań między czynnikami genetycznymi, epigenetycznymi i środowiskowymi [1].

Badania sprzężeń wykazały, że z podatnością na T1D wiążą się geny HLA klasy II na chromosomie to 6 (*loci 6p21*) [2]. Szacuje się, że współczynnik zgodności w przypadku bliźniąt jednojajowych z genotypami HLA wysokiego ryzyka DR3-DQ2 i DR4-DQ8 oraz dodatkim wywiadem rodzinnym dotyczącym T1D wynosi około 50% [3]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 50 genów innych niż HLA powodujących podatność na zachorowanie na cukrzycę, związanych głównie z wrodzoną i nabytą odpowiedzią immunologiczną (<http://www.t1dbase.org>). Należą do nich gen antygenu 4 cytotoksycznych limfocytów T (*CTLA-4*, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), gen niereceptorowego białka fosfatazy tyrozynowej typu 22 (*PTPN22*, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), gen podjednostki alfa receptora interleukiny 2 (*IL2RA*, *interleukin 2 receptor subunit alpha*) oraz gen stymulowany przez interferon z domeną 1 helikazy C (*IFIH1*, *interferon-induced with helicase C domain 1*) [4–7]. Do czynników środowiskowych, które mogą mieć znaczenie w patogenezie i progresji T1D, należą: mleko krowie, witamina D, glikotoksyna, mikroflora jelitowa i enterowirusy [8–11]. Do rozwoju zaburzeń autoimmunologicznych mogą również przyczyniać się czynniki epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacja histonów i przekazywanie sygnałów przez cząsteczki mikroRNA [12, 13]. MikroRNA (miRNA) to krótkie (ok. 22 nukleotydów) niekodujące cząsteczki RNA regulujące ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Cząsteczki miRNA wiążą się w rejonie niepodlegającym translacji 3'UTR genów docelowych i zmniejszają ich ekspresję przez hamowanie translacji lub degradację mRNA. Podczas gdy regulacja przez miRNA poszczególnych genów docelowych powoduje umiarkowane zmiany w ekspresji genów, sieć oddziaływań miRNA może wywoływać ogromne zmiany w funkcjonowaniu komórek [14]. Zmienność ekspresji genów warunkowaną wpływem miRNA można zaobserwować

w układzie immunologicznym, gdzie miRNA modulują powstawanie i dojrzewanie limfocytów [15–17]. Dlatego deregulacja miRNA, które wpływają na ostateczną funkcję limfocytów na poziomie centralnym i obwodowym, może sprzyjać procesom autoimmunologicznym [18–21]. W ostatniej dekadzie prowadzono intensywne badania nad możliwością wykorzystania miRNA jako diagnostycznych i prognostycznych biomarkerów w T1D [22].

Przeprowadzone wcześniej analizy profilu ekspresji miRNA przy użyciu macierzy Affymetrix miRNA 4.1 w grupie chorych z nowo rozpoznaną T1D wykazały nadekspresję miR-652-5p u chorych z ciężką postacią choroby autoimmunologicznej [23]. Zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie ekspresji miR-652-5p u chorych, u których w początkowym okresie choroby wystąpiła cukrzycowa kwasica ketonowa (DKA, *diabetic ketoacidosis*), w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej ($p = 0,04$; różnica 4,72-krotna). U chorych bez DKA nie stwierdzono nadekspresji miR-652-5p. Celem badania było zweryfikowanie za pomocą qRT-PCR wyników badania z zastosowaniem mikromacierzy w większej grupie chorych z nowo rozpoznaną T1D oraz zbadanie potencjalnych genów docelowych miR-652-5p. W analizie ekspresji wykazano zwiększoną ekspresję miR-652-5p u chorych na T1D w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej niechorującymi na cukrzycę ($p < 0,05$), jednak nie potwierdzono nadekspresji miR-652-5p u chorych z DKA. Ocena układu reporterowego lucyferazy nie wskazała genów *ADAR* i *MARCH5* jako genów docelowych miR-652-5p.

Materiał i metody

Grupa badane

U 28 chorych z nowo rozpoznaną T1D (średnia wieku \pm SD 11,21 \pm 3,3 roku) i 28 zdrowych dawców dobranych pod względem wieku i płci (średnia wieku \pm SD 10,5 \pm 4,1 roku) przeprowadzono analizę ekspresji miR-652-5p. Chorych rekrutowano w Klinice Diabetologii i Otyłości i Wiekowej Rozwojowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Cukrzycę diagnozowano na podstawie kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Potwierdzeniem autoimmunologicznego podłoża choroby było stwierdzenie w surowicy chorych obecności autoprzeciwciał przeciw insulinie (IAA, insulin autoantibody) i/lub dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GADA, glutamic acid decarboxylase autoantibody), i/lub fosfatazie tyrozynowej (IA-2A, islet antigen-2 antibody). Kohortę chorych na T1D podzielono na grupę z ostrym lub umiarkowanym początkiem choroby w zależności od występowania DKA. W podgrupie chorych z DKA w początkowym okresie

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanej kohorty chorych na cukrzycę typu 1 (T1D)

	T1D n = 28 (%)	Ciężki początkowy przebieg T1D n = 12 (%)	Łagodny początkowy przebieg T1D n = 16 (%)
Płeć K/M	4/24	1/11	3/13
[†] Wiek, lata	11,21 ± 3,33	11,33 ± 3,63	11,63 ± 3,18
[†] BMI [kg/m ²]	17,33 ± 3,05	17,31 ± 3,18	17,62 ± 3,09
[†] HbA _{1c} (%)	10,66 ± 1,67	10,59 ± 1,15	11,16 ± 1,86
[†] Peptyd C [nmol/l]	0,30 ± 0,08	0,27 ± 0,9	0,32 ± 0,08
[†] 25-OH-D [ng/ml]	18,19 ± 7,68	13,98 ± 3,27*	21,73 ± 8,76
[‡] DKA	12 (43)	12 (100)	16 (0)
[‡] IAA	7 (25)	3 (25)	4 (25)
[‡] GADA	21 (75)	9 (75)	12 (75)
[‡] IA2A	23 (82)	11 (92)	12 (75)

K — kobiety; M — mężczyźni; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; HbA_{1c} (*glycated hemoglobin A_{1c}*) — hemoglobina glikowana A_{1c}; 25-OH-D — 25-hydroksywitamina D; DKA (*diabetic ketoacidosis*) — cukrzycowa kwasica ketonowa; IAA (*antibodies to insulin*) — przeciwciała przeciw insulinie; GADA (*antibodies to glutamic acid decarboxylase*) — przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego; IA2A (*antibodies to islet antigen-2*) — przeciwciała przeciw fosfatazie tyrozynowej; parametry kliniczne przedstawiono jako [†]średnie ± odchylenie standardowe; [‡]liczbę chorych (%); *p < 0,01, wartości p obliczone w teście t dla pomiarów niezależnych, podgrupa z ciężkim początkowym przebiegiem T1D vs. podgrupa z łagodnym początkowym przebiegiem T1D

choroby częściej niż u osób z łagodniejszym przebiegiem T1D (92% vs. 75%) stwierdzano obecność IA2A, co sugeruje szczególnie intensywną reakcję immunologiczną i bardziej nasiloną destrukcję komórek beta. U chorych z ciężkim początkowym przebiegiem T1D stwierdzono również niższe resztkowe wydzielanie insuliny oceniane na podstawie stężenia peptydu C w osoczu na czczo, jednak różnica nie była istotna statystycznie. Charakterystykę kliniczną chorych przedstawiono w tabeli 1. Aby zminimalizować zakłócający wpływ zaburzeń metabolicznych w początkowym okresie choroby na ekspresję miRNA, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) pobierano u chorych odpowiednio nawodnionych, u których uzyskano normalizację ketonemii i dobrą kontrolę glikemii, 10 dni po rozpoczęciu leczenia insuliną. Próbkę kontrolną pozyskano w przychodni pediatrycznej od pacjentów z ujemnym wywiadem chorobowym i rodzinnym w kierunku chorób z autoagresji i wolnych od objawów zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym. Badanie zostało zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (decyzja nr 656/15), a wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z ustaleniami Deklaracji Helsińskiej. Rodzice/opiekunowie prawni młodszych dzieci wyrazili pisemną zgodę na ich udział w badaniu.

Analiza ekspresji miRNA

Ekspresję miR-652-5p oceniano za pomocą metody reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR, *quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*).

W reakcji RT przeprowadzonej za pomocą zestawu TaqMan Advance miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją producenta wykorzystano 10 ng RNA wyizolowanego z komórek PBMC. Do przeprowadzenia qRT-PCR użyto próbek zawierających 5 μ l DNA rozcieńczonego w stosunku 1:10 cDNA, testów TaqMan Fast Advance Master Mix (Applied Biosystem, CA, Stany Zjednoczone) i TaqMan Advance microRNA (Applied Biosystem, CA, Stany Zjednoczone) o całkowitej objętości 20 μ l. Reakcje PCR przeprowadzono w aparacie BioRad CFX96 Real Time PCR (BioRad Laboratories, CA, Stany Zjednoczone). Zastosowano cykliczne zmiany temperatury: wstępna aktywacja glikozylazy N-uracylowej przez 2 minuty w temperaturze 50°C, aktywacja polimerazy przez 20 sekund w temperaturze 95°, a następnie 40 cykli po 3 sekundy w temperaturze 95° i 30 sekund w temperaturze 60°C. Wszystkie reakcje wykonywano trzykrotnie. Oznaczono ilościowo RNU6, małe jądrowe RNA, w celu znormalizowania różnic w poziomach ekspresji RNA. W celu określenia ekspresji miR-652-5p i RNU6 użyto odpowiednio zestawów TaqMan Advance 479132_mir i NR_002752.2. Średnie wartości progowe cyklu (*Ct*, *cycle threshold*) oszacowano, używając oprogramowania BioRad CFX Manager 3.1. Względne poziomy ekspresji obliczono za pomocą wzoru: $2^{-\Delta Ct}$.

Predykcja docelowego genu miRNA

Potencjalne geny docelowe miR-652-5p wyszukano w atlasie miRWalk2.0 (dostępny pod adresem <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>).

Następnie geny docelowe miRNA zweryfikowano pod kątem ich potencjalnej roli w odpowiedzi immunologicznej i patogenezie T1D. Przeszukano bazy danych InnateDB (<http://www.innatedb.com>) i Gene Entrez, wpisując „T1D”. Za pomocą diagramu Venna (Venny2.1.0, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) zidentyfikowano 22 geny odpowiedzi immunologicznej. Do dalszych badań wybrano dwa geny związane z procesami autoimmunologicznymi: *ADAR* (Adenosine Deaminase, RNA Specific) [24] i *MARCH5* (Membrane Associated Ring-CH Finger Protein 5) [25]. Sekwencje miejsc wiązania miRNA w rejonie 3'UTR genów docelowych zweryfikowano za pomocą oprogramowania PITA-Segal Lab (<https://genie.weizmann.ac.il>).

Konstrukty reporterów

Do oceny wiązania miR-652-5p w genach *ADAR* i *MARCH5* zastosowano test reporterów lucyferazy. Rejony 3'UTR wybranych genów uzyskano z genomowej bazy danych *University of California Santa Cruz Genome Browser* zawierającej informacje na temat genomu ludzkiego w wersji hg38. Fragmenty 1195bp i 1031bp rejonów 3'UTR genów odpowiednio *ADAR* i *MARCH5* amplifikowano z DNA z linii komórek Jurkat E6.1 (ATCC®, VA, Stany Zjednoczone) oczyszczonego przy użyciu zestawu Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen Sciences, Stany Zjednoczone). Użyto 70 ng matrycowego DNA w 50 µl mieszaniny reakcyjnej PCR oraz 1 U polimerazy Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, CA, Stany Zjednoczone), buforu 1X Phusion GC, 200 µM dNTP, 500 nM startera przedniego i wstecznego. Miejsce restrykcyjne enzymu SgfI wprowadzono do primera For. Oczyszczone produkty PCR sklonowano do wektora pGEM-Teasy (Promega, WI, Stany Zjednoczone). Następnie wstawki wycięto, używając endonukleaz restrykcyjnych SgfI i NotI (New England BioLabs, MA, Stany Zjednoczone) i subklonowano do wektora psiCHECK2 (Promega, WI, Stany Zjednoczone) za genem reporterowym lucyferazy renilli (RL, Renilla luciferase). Sekwencje wektorów potwierdzono przez sekwencjonowanie.

Test lucyferazowy

Ocenę luminescencji w układzie reporterowym lucyferazy przeprowadzono za pomocą systemu Promega-Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI, Stany Zjednoczone). $0,25 \times 10^6$ komórek Jurkat transfekowano 1 µg wektora psiCHECK2-3'UTR i 50 pmol miR-652-5p Mimic lub ujemnym materiałem kontrolnym (obydwa produkty firmy Ambion, CA, Stany Zjednoczone), stosując Neon Transfection System i następujące parametry: 1600 V, 10 ms, 3 impulsy.

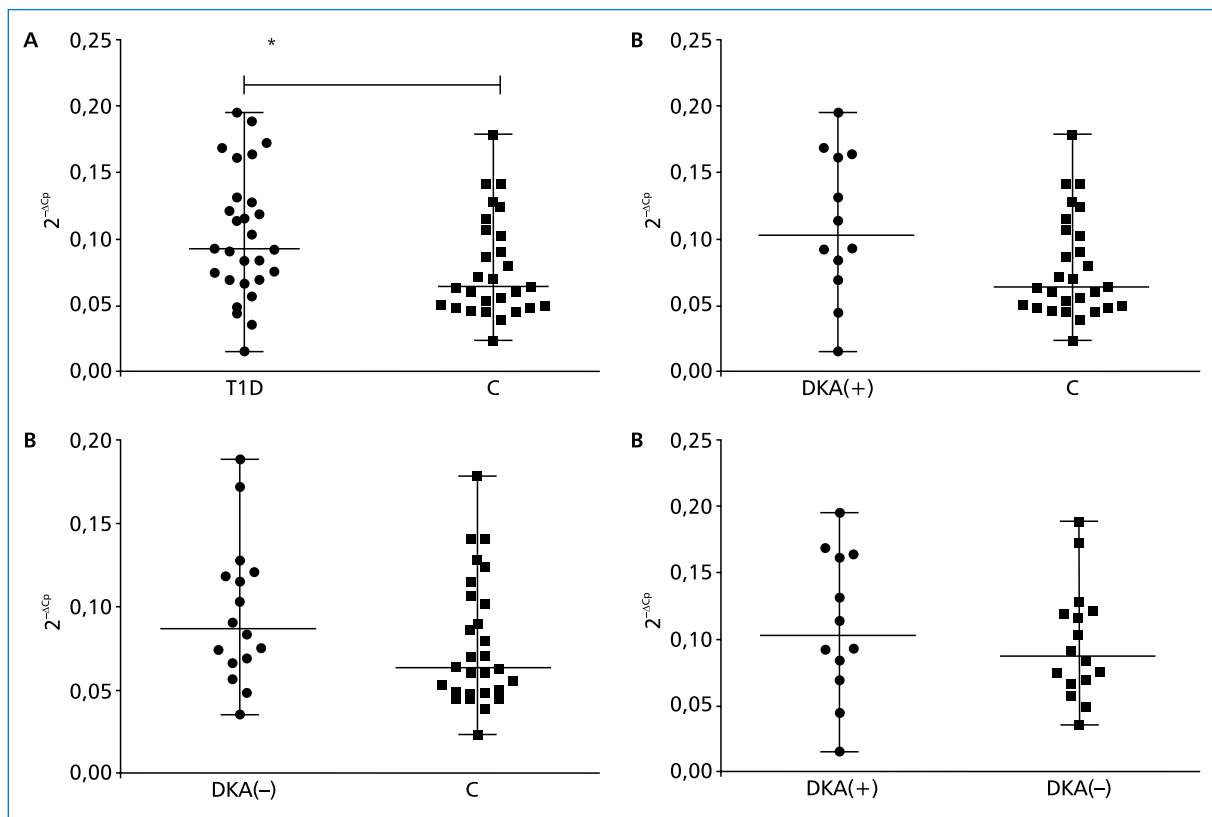
Transfekowane komórki dodano do 500 µl medium RPMI 1640 z 10% FBS, 0,25% glukozą, 10 mM HEPES, 1 mM pirogronianu sodu i inkubowano w 37°C/5% CO₂. Transfekcje przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach, za każdym razem przygotowując 3 próbki. Lizaty komórek wykonano 24 godziny po transfekcji. Aktywność lucyferazy z renilli i ze świetlika mierzono dwukrotnie w przypadku każdej transfekcji w aparacie GloMax®96 Microplate Luminometer (Promega, WI, Stany Zjednoczone). Ekspresję lucyferazy renilli znormalizowano do poziomu ekspresji drugiego genu reporterowego lucyferazy ze świetlika. Współczynnik lucyferaz RL/FL porównano z ujemną kontrolą (dla której przyjęto wartość 1,00). Istotność statystyczną oszacowano za pomocą testu t dla niezależnych pomiarów.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, Stany Zjednoczone). Do zbadania normalności rozkładu danych (rozkład Gaussa) użyto testu typu omnibus D'Agostino-Pearsona. Dane o rozkładzie normalnym przedstawiono jako średnie ± SD. Do porównania zmienności w każdej grupie zastosowano test F. Istotność statystyczną różnic pomiędzy wartościami średnimi określano za pomocą testu t dla zmiennych niezależnych z poprawką Welcha. Dane o rozkładzie niespełniającym warunku normalności przedstawiono jako mediany i zakresy międzykwartylowe. Istotność statystyczną różnic między medianami szacowano za pomocą testu Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne przyjęto wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Analiza ekspresji za pomocą qRT-PCR ujawniła statystycznie istotnie wyższą ekspresję miR-652-5p u chorych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej niechorującymi na cukrzycę (różnica 1,45-krotna, $p = 0,035$) (ryc. 1). Po stratyfikacji chorych w zależności od występowania cukrzycowej kwasicy ketonowej w początkowym okresie choroby nie wykazano istotnych różnic w ekspresji miR-652-5p w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej ($p > 0,05$). Ekspresja miR-652-5p u chorych z ciężkim i łagodnym początkiem choroby autoimmunologicznej była odpowiednio 1,62- i 1,37-krotnie większa niż u osób z grupy kontrolnej. Ponadto ekspresja miR-652-5p nie była statystycznie istotnie zwiększona u chorych z DKA w stosunku do wartości stwierdzonych w grupie z łagodnym początkiem choroby autoimmunologicznej ($p > 0,05$, różnica 1,18-krotna) (ryc. 1).



Rycina 1. Analiza ekspresji miR-652-5p u chorych na cukrzycę typu 1. **A.** Istotne różnice w ekspresji miR-652-5p między grupą osób z nowo rozpoznaną T1D a grupą kontrolną (* $p < 0,05$); **B.** Poziom ekspresji miR-652-5p w grupie chorych na T1D stratyfikowany w zależności od występowania cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA) w początkowym okresie choroby. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pod względem ekspresji miR-652-5p między chorymi z DKA a osobami z grupy kontrolnej i chorymi bez DKA ($p > 0,05$). Linie poziome oznaczają mediany i zakresami wartości; gwiazdki oznaczają istotność statystyczną, wartości p obliczone w teście Manna-Whitneya. T1D (*type 1 diabetes*) — chorzy na cukrzycę typu 1; C (*controls*) — osoby z grupy kontrolnej; DKA(+) — kohorta chorych z cukrzycową kwasicą ketonową (*diabetic ketoacidosis*) w początkowym okresie choroby; DKA(-) — kohorta chorych bez cukrzycowej kwasicy ketonowej (*diabetic ketoacidosis*) w początkowym okresie choroby

Geny *ADAR* i *MARCH5* nie są genami docelowymi miR-652-5p

W celu wskazania genów docelowych miR-652-5p mogących odgrywać rolę w zaburzeniach autoimmunologicznych przeprowadzono analizę *in silico*. Z grupy 22 genów odpowiedzi immunologicznej wskazaliśmy geny *ADAR* i *MARCH5* do dalszych badań. Sekwencje 3'UTRs tych genów sklonowano do wektora lucyferazy psiCHECK2.

Transfekcja psiCHECK2-*ADAR* lub psiCHECK2-*MARCH5* wraz z miR-652-5p Mimic do komórek Jurkat nie ujawniła istotnych różnic we względnej aktywności lucyferazy w porównaniu z ujemną próbką kontrolną ($p > 0,05$; ryc. 2).

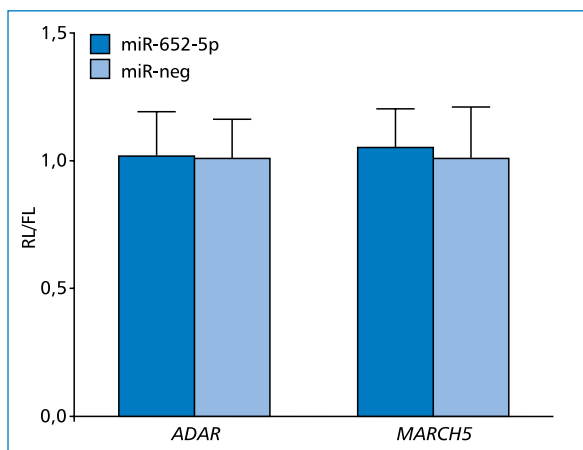
Dyskusja

Zapadalność na T1D na świecie zwiększa się o 2–3% rocznie, przy czym największy wzrost zapadalności obserwuje się wśród najmłodszych dzieci (< 5 lat).

Ostatnio zaobserwowano mniejszy odsetek przypadków z genotypem HLA wysokiego ryzyka wśród osób z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, co przy jednoczesnym zwiększeniu zapadalności na T1D może sugerować większy udział czynników środowiskowych, epigenetycznych oraz innych genów w rozwoju choroby [26].

W ostatnim dziesięcioleciu prowadzono intensywne prace w celu wyjaśnienia roli określonych miRNA w patogenezie T1D, które zaowocowały wskazaniem miRNA jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych zaburzeń immunologicznych.

W niniejszym badaniu zaobserwowano nadekspresję miR-652-5p u chorych z nowo rozpoznaną T1D w porównaniu z osobami zdrowymi. U chorych na T1D stwierdzono toczący się proces autoimmunologiczny, na co wskazywała obecność w surowicy przeciwciał przeciw insulinie (IAA) i/lub dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GADA) i/lub fosfatazie tyrozynowej (IA-2A). Analiza ekspresji nie wykazała istotnie wyższej



Rycina 2. Ocena układu reporterowego lucyferazy nie wskazała genów *ADAR* i *MARCH5* jako potencjalnych genów docelowych miR-652-5p. Komórki Jurkat transfekowano wektorami reporterów lucyferazowych zawierającymi sekwencje 3'UTRs genów *ADAR* i *MARCH5* w obecności miR-652-5p Mimic lub ujemnego materiału kontrolnego. Średni współczynnik RL/FL (Renilla/Firefly, lucyferaza z renilli/lucyferaza ze świetlika) z trzech niezależnych eksperymentów przedstawiono jako średnie \pm SD; wartości uzyskane w ujemnej próbie kontrolnej przyjęto za 1,00 (wartość p w teście $t > 0,05$)

ekspresji miR-652-5p u chorych z ciężką postacią T1D niż w grupie kontrolnej. Ta obserwacja jest sprzeczna z wynikami wcześniejszego badania metodą mikromacierzy [23]. Rozbieżność w poziomie ekspresji między badaniem metodą mikromacierzy a analizą walidacyjną można częściowo tłumaczyć stosunkowo małą liczebnością próby w przypadku kohorty badania metodą mikromacierzy (chorzy z DKA, $n = 7$). U chorych z cukrzycową kwasicą ketonową w początkowym okresie choroby występował trend w kierunku zwiększonej ekspresji miR-652-5p w porównaniu z chorymi bez DKA, jednak różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Nie opisywano wcześniej miR-652-5p w kontekście chorób autoimmunologicznych, a może to być potencjalny biomarker zachorowania na T1D. Ograniczeniem niniejszego badania jest mała liczebność próby, dlatego konieczne jest rozszerzenie badania na większą grupę chorych, aby potwierdzić znaczenie miR-652-5p jako epigenetycznego czynnika ryzyka T1D.

W badaniach mających na celu analizę ekspresji miRNA w komórkach PBMC i surowicy dorosłych chorych na cukrzycę typu 1 wykryto inne miRNA, które mogą mieć związek z procesami autoimmunologicznymi [27–29]. Stwierdzono podwyższoną ekspresję miR-326 w komórkach PBMC pobranych od chorych na T1D, u których występowały autoprzeciwciała [29]. W badaniu na myszach zaobserwowano, że nadekspresja miR-326 w wywołanym eksperymentalnie autoim-

munologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia powoduje stymulację różnicowania limfocytów Th17 [30]. Z kolei Salas-Perez i wsp. zaobserwowali zmniejszoną ekspresję miR-21a i miR-93 w komórkach PBMC pobranych od chorych na T1D [31]. Co ciekawe, analiza *in silico* jako ich geny docelowe wskazała geny cząsteczek o właściwościach proapoptotycznych i prozapalnych: kaspazy 8, kaspazy 7 i IL-8 dla miR-93, a także geny ligandu Fas, MTPN, APAF1, IL-12A, IL-22 i IL-1B dla miR-21.

W najnowszych badaniach wykazano, że miRNA mogą być stosowane w celu określenia stopnia zaawansowania choroby. Zwracano uwagę, że zmniejszenie ekspresji miR-146 w komórkach PBMC koreluje z trwającym procesem autoimmunologicznym w wyspach trzustkowych oraz wysokimi mianami GADA w surowicy [28]. Ponadto zaburzenia regulacji miR-125b-5p, miR-365a-3p, miR-5190 i miR-770-5p wiązały się z hiperglikemią u chorych na T1D i mogły przyczyniać się do rozwoju powikłań cukrzycy [32]. Analiza szlaków sygnałowych wykazała, że 50 szlaków z bazy danych *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) było istotnie wzbogaconych przez geny regulowane przez opisane miRNA [32].

Ważną metodą w badaniach mających na celu wyjaśnienie roli miRNA w patogenezie chorób autoimmunologicznych jest zidentyfikowanie docelowych genów. Ze względu na potencjalną rolę nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w rozwoju cukrzycy typu 1 wskazano geny *ADAR* i *MARCH5* do dalszych analiz w układzie reporterowym lucyferazy. Mutacje w genie *ADAR* wskazywano jako przyczynę zaburzeń autoimmunologicznych w zespole Aicardiiego-Goutièresa [24, 33, 34]. Podobnie jak u myszy pozbawionych genu *Adar1*, obraz choroby u ludzi jest związany ze zwiększoną ekspresją genów stymulowanych przez interferon [33]. Dominguez-Gutierrez i wsp. wykazali nadekspresję genu *ADAR* u chorych na toczeń rumieniowaty układowy (SLE, *systemic lupus erythematosus*) [35]. Ponadto zmniejszenie ilości białka *MARCH5* może powodować ciągłą agregację mitochondrialnego przeciwwirusowego białka sygnałowego (MAVS, *mitochondrial antiviral-signaling protein*) oraz nieprawidłowe stężenia interferonu typu I u chorych na SLE [25]. Ocena miejsc wiązania w układzie reporterowym lucyferazy nie wskazała genów *ADAR* i *MARCH5* jako potencjalnych genów docelowych miR-652-5p. Dlatego autorzy uważają, że miR-652-5p nie reguluje ekspresji genów *ADAR* i *MARCH5*.

Podsumowując, w przedstawionym badaniu wskazano miR-652-5p jako potencjalny biomarker cukrzycy typu 1. Badania nad miRNA w kontekście autoagresji mają istotne znaczenie, ponieważ potrzebne są doskonałe biomarkery pozwalające wykryć rozwijającą się

cukrzycę typu 1 jeszcze przed utratą krytycznej liczby komórek beta trzustki.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów w związku z artykułem.

Podziękowania

Badanie przeprowadzono ze środków przekazanych przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne — grant naukowy PTD im. Prof. Artura Czyżyka 2015.

PIŚMIENNICTWO

- Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010; 464(7293): 1293–1300, indexed in Pubmed: [20432533](#).
- Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. 1994; 371(6493): 130–136, doi: [10.1038/371130a0](#), indexed in Pubmed: [8072542](#).
- Aly TA, Ide A, Jahromi MM, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(38): 14074–14079, doi: [10.1073/pnas.0606349103](#), indexed in Pubmed: [16966600](#).
- Ueda H, Howson JMM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003; 423(6939): 506–511, doi: [10.1038/nature01621](#), indexed in Pubmed: [12724780](#).
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2004; 36(4): 337–338, doi: [10.1038/ng1323](#), indexed in Pubmed: [15004560](#).
- Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*. 2006; 38(6): 617–619, doi: [10.1038/ng1800](#), indexed in Pubmed: [16699517](#).
- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007; 39(9): 1074–1082, doi: [10.1038/ng2102](#), indexed in Pubmed: [17676041](#).
- Vaarala O, Klemetti P, Juhela S, et al. Effect of coincident enterovirus infection and cows' milk exposure on immunisation to insulin in early infancy. *Diabetologia*. 2002; 45(4): 531–534, doi: [10.1007/s00125-002-0787-8](#), indexed in Pubmed: [12032629](#).
- Wasmuth HE, Kolb H. Cow's milk and immune-mediated diabetes. *Proc Nutr Soc*. 2000; 59(4): 573–579, indexed in Pubmed: [11115792](#).
- Wen Li, Ley RE, Volchkov PYu, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008; 455(7216): 1109–1113, doi: [10.1038/nature07336](#), indexed in Pubmed: [18806780](#).
- Weintrob N, Sprecher E, Israel S, et al. Type 1 diabetes environmental factors and correspondence analysis of HLA class II genes in the Yemenite Jewish community in Israel. *Diabetes Care*. 2001; 24(4): 650–653, indexed in Pubmed: [11315825](#).
- Brown CC, Wedderburn LR. Genetics: Mapping autoimmune disease epigenetics: what's on the horizon? *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11(3): 131–132, doi: [10.1038/nrrheum.2014.210](#), indexed in Pubmed: [25512011](#).
- Jeffries MA, Sawalha AH. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve? *Expert Rev Clin Immunol*. 2015; 11(1): 45–58, doi: [10.1586/1744666X.2015.994507](#), indexed in Pubmed: [25534978](#).
- Simpson LJ, Ansel KM. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015; 125(6): 2242–2249, doi: [10.1172/JCI78090](#), indexed in Pubmed: [26030228](#).
- Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(9): 666–678, doi: [10.1038/nri3494](#), indexed in Pubmed: [23907446](#).
- O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30: 295–312, doi: [10.1146/annurev-immunol-020711-075013](#), indexed in Pubmed: [22224773](#).
- Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 2009; 136(1): 26–36, doi: [10.1016/j.cell.2008.12.027](#), indexed in Pubmed: [19135886](#).
- Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008; 132(5): 875–886, doi: [10.1016/j.cell.2008.02.019](#), indexed in Pubmed: [18329372](#).
- Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 2008; 9(4): 405–414, doi: [10.1038/ni1575](#), indexed in Pubmed: [18327259](#).
- Li QJ, Chau J, Ebert PJR, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 2007; 129(1): 147–161, doi: [10.1016/j.cell.2007.03.008](#), indexed in Pubmed: [17382377](#).
- Kang SG, Liu WH, Lu P, et al. MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of T(FH) differentiation. *Nat Immunol*. 2013; 14(8): 849–857, doi: [10.1038/ni.2648](#), indexed in Pubmed: [23812097](#).
- Zheng Y, Wang Z, Zhou Z. miRNAs: novel regulators of autoimmunity-mediated pancreatic β -cell destruction in type 1 diabetes. *Cell Mol Immunol*. 2017; 14(6): 488–496, doi: [10.1038/cmi.2017.7](#), indexed in Pubmed: [28317889](#).
- Zurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Izykowska K, et al. miR-487a-3p upregulated in type 1 diabetes targets CTLA4 and FOXO3. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 [Epub ahead of print]; 142: 146–153, doi: [10.1016/j.diabres.2018.05.044](#), indexed in Pubmed: [29859273](#).
- Rice GI, Kasher PR, Forte GMA, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet*. 2012; 44(11): 1243–1248, doi: [10.1038/ng.2414](#), indexed in Pubmed: [23001123](#).
- Shao WH, Shu DH, Zhen Y, et al. Prion-like Aggregation of Mitochondrial Antiviral Signaling Protein in Lupus Patients Is Associated With Increased Levels of Type I Interferon. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(11): 2697–2707, doi: [10.1002/art.39733](#), indexed in Pubmed: [27110677](#).
- Fourlanos S, Varney MD, Tait BD, et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care*. 2008; 31(8): 1546–1549, doi: [10.2337/dc08-0239](#), indexed in Pubmed: [18487476](#).
- Hezova R, Slaby O, Faltejškova P, et al. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol*. 2010; 260(2): 70–74, doi: [10.1016/j.cellimm.2009.10.012](#), indexed in Pubmed: [19954774](#).
- Yang M, Ye L, Wang B, et al. Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients 1miR-146. *J Diabetes*. 2015; 7(2): 158–165, doi: [10.1111/1753-0407.12163](#), indexed in Pubmed: [24796653](#).
- Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, et al. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27(8): 862–866, doi: [10.1002/dmrr.1262](#), indexed in Pubmed: [22069274](#).
- Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2009; 10(12): 1252–1259, doi: [10.1038/ni.1798](#), indexed in Pubmed: [19838199](#).
- Salas-Pérez F, Codner E, Valencia E, et al. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear

- cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology*. 2013; 218(5): 733–737, doi: [10.1016/j.imbio.2012.08.276](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.08.276), indexed in Pubmed: [22999472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22999472/).
32. Satake E, Pezolesi MG, Md Dom ZI, et al. Circulating miRNA Profiles Associated With Hyperglycemia in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2018; 67(5): 1013–1023, doi: [10.2337/db17-1207](https://doi.org/10.2337/db17-1207), indexed in Pubmed: [29453204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29453204/).
33. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2013; 12(12): 1159–1169, doi: [10.1016/S1474-4422\(13\)70258-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70258-8), indexed in Pubmed: [24183309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24183309/).
34. Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, et al. Human Disease Phenotypes Associated With Mutations in TREX1. *Journal of Clinical Immunology*. 2015; 35(3): 296–312, doi: [10.1002/ajmg.a.36887](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36887).
35. Dominguez-Gutierrez PR, Ceribelli A, Satoh M, et al. Elevated signal transducers and activators of transcription 1 correlates with increased C-C motif chemokine ligand 2 and C-X-C motif chemokine 10 levels in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16(1): R20, doi: [10.1186/ar4448](https://doi.org/10.1186/ar4448), indexed in Pubmed: [24451065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24451065/).