



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA E
BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL
FENOTIPO-XXV CICLO**

**DIPARTIMENTO DI ANATOMIA, BIOLOGIA E GENETICA, MEDICINA
LEGALE, NEUROSCIENZE, PATOLOGIA DIAGNOSTICA, IGIENE E
SANITÀ PUBBLICA**

G.F. INGRASSIA

**UNITÀ DI BIOMEDICINA MOLECOLARE GENOMICA E DEI SISTEMI COMPLESSI,
GENETICA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE**

Sammito Mariangela

**I miR-720 e miR-1290 sono significativamente sovraespressi nel siero
di pazienti con fenotipo grave di sindrome di Tourette: potenziali
implicazioni biomolecolari e cliniche**

Tesi di Dottorato

**Coordinatore e Tutor:
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO**

Anno Accademico 2012 - 2013

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
1.INTRODUZIONE	pag.3
1.1 DALLA BIOLOGIA DEI SISTEMI COMPLESSI ALLA MEDICINA DEI SISTEMI COMPLESSI.....	pag.3
1.2 LE PATOLOGIE COMPLESSE A CARATTERE NEUROLOGICO: LA NEUROPSICHIATRIA INFANTILE.....	pag.4
1.3 PATOLOGIE PSICHIATRICHE DELL'ETA' EVOLUTIVA: LA SINDROME DI TOURETTE.....	pag.6
1.3.1: Epidemiologia e sintomatologia clinica.....	pag.6
1.3.2:Diagnosi e terapia.....	pag.10
1.3.3: Genetica.....	pag.12
1.3.4:Fisiopatologia.....	pag.16
1.4 i miRNA.....	pag.20
1.4.1 Evoluzione dei geni miRNA.....	pag.21
1.4.2 Organizzazione genomica.....	pag.21
1.4.3: Biogenesi.....	pag.23
1.4.4 Regolazione post-trascrizionale mediata dai miRNA.....	pag.26
1.4.5 Geni <i>targets</i> dei miRNA.....	pag.27
1.4.6 Regolazione dell'espressione genica dei miRNA.....	pag.28
1.5 miRNA: RUOLO FISIOLOGICO E PATOLOGICO	pag.30
1.6: microRNA E COINVOLGIMENTO NEL SISTEMA NERVOSO...	pag.31
1.6.1 microRNA e sindrome di Tourette.....	pag.38
1.7 I microRNA CIRCOLANTI.....	pag.40
1.7.1 microRNA circolanti e patologie del sistema nervoso.....	pag.48
1.7.2 microRNA circolanti: quantificazione	pag.49

Indice

2 MATERIALI E METODI	pag.52
2.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI <i>TSS</i>	pag.52
2.2 PROCESSAMENTO DEI CAMPIONI	pag.52
2.3 LETTURA SPETTROFOTOMETRICA	pag.53
2.4 ESTRAZIONE DELL'RNA	pag.54
2.5 <i>REAL TIME PCR</i>	pag.57
2.5.1 Quantificazione tramite sonde TaqMan	pag.58
2.5.2 Metodi di quantificazione	pag.59
2.6 <i>REAL TIME PCR</i> : ANALISI TRAMITE TLDA	pag.60
2.6.1 Retrotrascrizione	pag.61
2.6.2 Preamplificazione	pag.62
2.6.3 Amplificazione in <i>Real-Time</i>	pag.63
2.6.4 Analisi dei dati	pag.64
2.7. VALIDAZIONE IN <i>TAQMAN ASSAY</i> DEI TSS	pag.65
2.7.1 Analisi dei dati	pag.67
2.8 ANALISI IN SAGGIO SINGOLO DEI TSM	pag.68
2.9 PREDIZIONE DEI <i>TARGETS</i> E <i>NETWORK</i>	pag.69
 3. RISULTATI	pag.70
3.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI <i>TSS</i>	pag.70
3.2 ANALISI TRAMITE <i>TLDA</i> DEI TSS	pag.71
3.3 SAGGI SINGOLI IN <i>TAQMAN ASSAY</i> DEI TSS	pag.73
3.4 SAGGI SINGOLI IN <i>TAQMAN ASSAY</i> DEI TSM	pag.77
3.5 PREDIZIONE DEI <i>TARGETS</i> E <i>NETWORK</i>	pag.82
 DISCUSSIONE	pag.88
CONCLUSIONI	pag.93
BIBLIOGRAFIA	pag.95

RIASSUNTO

La sindrome di Gilles de la Tourette (GTS) è un disordine neuropsichiatrico ad esordio infantile, caratterizzato da tic motori e vocali causati da contrazioni muscolari involontarie che producono movimenti stereotipati. Nel 60% dei casi la malattia mostra comorbidità con la sindrome da deficit di attenzione e iperattività (*ADHD*) e nel 40-60% con il disturbo ossessivo compulsivo (*OCD*). La combinazione delle tre condizioni (*TS*, *ADHD* e *OCD*) è spesso chiamata *triade della sindrome di Tourette* ed è molto spesso causa di peggioramento nella qualità di vita del paziente se non identificata correttamente. La diagnosi si basa sui criteri proposti dal ***DSM-V Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition***. Sulla base della sintomatologia clinica e della comorbidità con altri disordini neuropsichiatrici, si può affermare che esiste uno spettro di fenotipi TS, la cui gravità può variare da una manifestazione severa (*Severe*) ***TSS*** (*Tourette Syndrome Severe Phenotype*) ad una moderata (*mild*) ***TSM*** (*Tourette Syndrome Mild Phenotype*).

Negli ultimi anni l'identificazione di miRNA circolanti in fluidi biologici (siero, plasma o urine) ha aperto una nuova frontiera nella diagnosi precoce non invasiva di patologie neoplastiche, degenerative e neurodegenerative. Con l'obiettivo di analizzare le basi biomolecolari della TS, il nostro gruppo di ricerca ha caratterizzato il trascrittoma di 754 *miRNAs* nel siero di pazienti affetti da ***TSS***, tramite *TaqMan® Low Density Array (TLDA)*. Queste ricerche hanno inoltre consentito di individuare potenziali *biomarkers* diagnostici, da associare alla tradizionale indagine effettuata tramite il ***DSM-V***. I microRNA da noi identificati come differenzialmente espressi sono stati ulteriormente validati in singoli saggi *TaqMan assay*, sia nella coorte di pazienti ***TSS*** precedentemente analizzata, che anche in una coorte di pazienti ***TSM***, allo scopo di identificare uno o più potenziali marcatori utili per la diagnosi differenziale tra pazienti ***TS*** con fenotipo clinico di differente gravità (*severe* oppure *mild*).

Riassunto

Le nostre indagini sperimentali ci hanno portato all' identificazione di due miR, il **miR-720** ed il **miR-1290**, i cui livelli d'espressione sono più elevati nei pazienti *TS* rispetto ai controlli in maniera statisticamente significativa. Inoltre, il **miR-720** risulta statisticamente discriminante tra il fenotipo *TSS* e *TSM* e dunque è da considerarsi come marcatore molecolare nella discriminazione fenotipica nell'ambito della sindrome di Gilles de la Tourette.

1. INTRODUZIONE

1.1 DALLA BIOLOGIA DEI SISTEMI COMPLESSI ALLA MEDICINA DEI SISTEMI COMPLESSI

Dal 1953, anno in cui Watson e Crick proposero il modello a doppia elica del DNA, sono stati compiuti enormi progressi nel mondo della ricerca biomedica: uno di questi è stato il Progetto Genoma Umano (HPG), iniziato nel 1984 con la fondazione dell'Organizzazione Genoma Umano (HUGO) negli Stati Uniti. L'obiettivo principale di questa organizzazione internazionale è stato quello di decodificare l'intero genoma umano; da allora molti sono stati i progressi nel campo della biologia genomica e si è potuto osservare la *naturale* evoluzione di quest'ultima da scienza di base a scienza multidisciplinare con possibili applicazioni in campo clinico e diagnostico. E' stato più che documentato, infatti, che le applicazioni della genomica hanno avuto importanti ricadute soprattutto nell'ambito clinico; diversi test vengono ormai utilizzati anche a scopo diagnostico e prognostico in diverse patologie, quali ad esempio diversi tipi di tumori [1]. Dunque, il passaggio dall'ottica mendeliana della genetica al mondo post-mendeliano della moderna BioMedicina dei Sistemi Complessi ha rappresentato la chiave di svolta per l'integrazione della genomica nel vasto scenario della clinica. L'anello di congiunzione tra l'approccio "omico" della moderna biologia e la Biomedicina dei Sistemi è rappresentato dallo sviluppo di una materia interdisciplinare nota come *Systems Biology*; quest'ultima è basata su una strategia di ricerca integrativa, atta ad affrontare la complessità dei sistemi biologici sia in condizioni fisiologiche che patologiche [2];[3]. Le *High-Throughput Technologies (HT)* sono un gruppo di tecnologie di nuova generazione che aumentano la sensibilità e la specificità riducendo il tempo di esecuzione dell'esperimento, ma cosa ancor più importante, consentono di studiare le patologie complesse in modo sistemico grazie alle applicazioni delle *Omiche*:

Genomica, Trascrittomica, Proteomica, Metabolomica. L'utilizzo di tecnologie *High Throughput (HT)* in studi di BioMedicina dei Sistemi è sicuramente un punto di partenza essenziale per cercare di comprendere le basi molecolari delle malattie complesse. Questo nuovo modo di affrontare le problematiche dello studio della vita ha costituito terreno fertile per la nascita della cosiddetta Biologia Patologica (*Pathological Biology*), consentendo una sempre maggiore interconnessione tra ricerca di base, ricerca clinica e scoperta di nuovi approcci terapeutici. In questo scenario si inquadra dunque a pieno titolo la moderna BioMedicina dei Sistemi. La Biologia dei sSistemi è dunque una disciplina che nasce dal nuovo atteggiamento di pensiero che ha dato il via all'“Era post-genomica”, vera rivoluzione nel campo degli studi genomici[2];[4] in questo ambito, una malattia non è il frutto di una singola mutazione, ma è il risultato della disregolazione di un complesso set di geni e proteine e della loro interazione con fattori esogeni, tra i quali anche quelli ambientali [5]. Gli studi di *Genome-Wide Association (GWAS)* negli ultimi anni hanno contribuito ad incrementare la conoscenza sulle patologie complesse, grazie soprattutto all'abbattimento dei costi e all'aumentata velocità d'esecuzione delle *High Throughput Technologies* di nuova generazione e lo sviluppo di sofisticati *tools*, che consentono sia le indagini statistiche su larga scala che la ricerca di nuovi potenziali regioni del DNA da sottoporre a *screening* per le mutazioni[1];[2]; [4];[5].

1.2 LE PATOLOGIE COMPLESSE A CARATTERE NEUROLOGICO: LA NEUROPSICHIATRIA INFANTILE

La psichiatria è una disciplina, nata nella seconda metà del XIX secolo e rappresenta quella branca della medicina che si occupa delle malattie mentali. Tale branca clinica delle neuroscienze, originariamente unitaria, è stata poi oggetto di frammentazioni successive sino alla suddivisione in neurologia, psichiatria, neuropsichiatria infantile [6]. Attualmente la neuropsichiatria sta avendo un intenso e rapido sviluppo culturale, basta osservare il notevole

incremento di pubblicazioni nell'arco di questi dieci anni come mostra la **tabella 1.1** sottostante, e la recente pubblicazione nel maggio 2013 da parte dell'Associazione Psichiatrica Americana del **DSM-V** (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V* edizione [7]), che ha reso possibile il miglioramento della quantità della vita dei soggetti con problemi adattivi e di disturbi del comportamento anche grazie allo studio e la classificazione accurata delle patologie psichiatriche effettuata su studi *Genome-Wide Association (GWAS)*, che hanno messo in relazione questa classe di malattie [7].

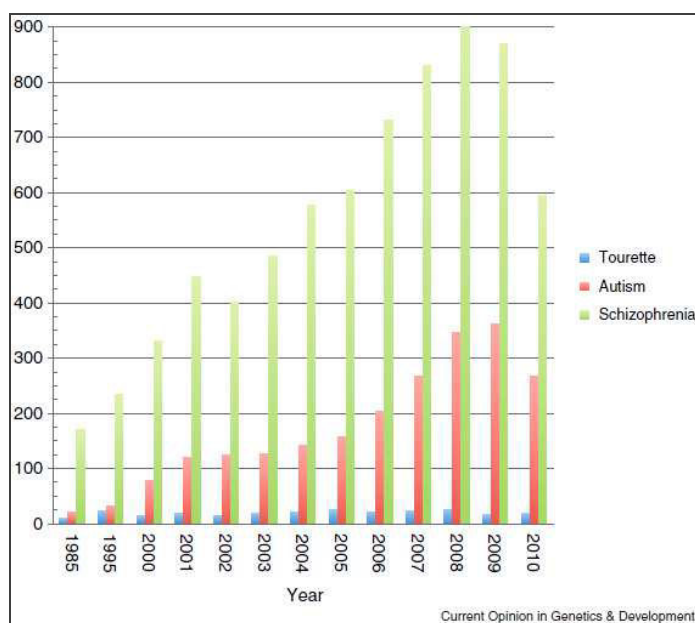


Tabella 1.1 mostrante il numero di pubblicazioni annuali riguardanti tre importanti disordini neurologici: Sindrome di Tourette, Autismo e Schizofrenia. La sindrome di Tourette, in particolare è al giorno d'oggi ancora una patologia neurologica non rara, ma poco conosciuta e poco diagnosticata[8].

La Neuropsichiatria infantile, in particolare, è la branca della Medicina che studia e cura le malattie neurologiche e psichiche durante il periodo della vita che va dalla nascita alla fine dell'adolescenza, in genere sino al 16°-17° anno di età, occupandosi della salute fisica e psichica di bambini e adolescenti nei loro ambienti di vita mediante interventi nella scuola e nelle famiglie di provenienza [6].

1.3 PATOLOGIE PSICHIATRICHE DELL'ETA' EVOLUTIVA: LA SINDROME DI TOURETTE

1.3.1 Epidemiologia e sintomatologia clinica

La Sindrome di Gilles de la Tourette (GTS), o semplicemente sindrome di Tourette (TS), prende il nome dal nome del neurologo francese Georges Albert Édouard Brutus Gilles de la Tourette che per la prima volta descrisse la malattia nel 1885. Tradizionalmente a Gilles De la Tourette è stata attribuita l'identificazione della patologia grazie al suo *report*, ma le prime notizie su questa complessa malattia sono risalenti a dodici anni prima e pubblicate dal francese Armand Trousseau [9]. La TS è una patologia neuropsichiatrica, ad esordio infantile, inserita nello spettro dei disordini causati da tic; nonostante la natura ereditaria della malattia sia stata presto identificata, soltanto a partire dal 1960 si cominciò a comprenderne anche l'eziologia quando si cominciarono a riscontrare gli effetti benefici dei neurolettici sui sintomi di questa malattia. Oggi la TS è considerata un disturbo a carattere psichiatrico raro e ad andamento imprevedibile, caratterizzato dalla presenza di tic motori e fonici, di diverso grado di complessità, ad esordio infantile, di solito intorno ai 5-6 anni di età con un picco intorno ai 10-15 anni. Il 20-30% dei bambini in età scolare manifesta tic che possono anche essere transienti e dovuti ad il normale sviluppo del bambino, ma che devono comunque essere valutati da clinici esperti; nel 70% dei casi si assiste ad una scomparsa dei sintomi ma il 30% dei TS dovrà convivere con i sintomi di questa malattia per tutta la vita [9];[10];[11]. La TS è stata a lungo considerata una rara sindrome caratterizzata da severi e bizzarri sintomi, tuttavia a partire dal 1980 le conoscenze sulla distribuzione della malattia nella popolazione e sulla severità dei sintomi cominciarono a cambiare [9]. Esaminando la storia familiare di diversi pazienti affetti da TS, i Ricercatori si accorsero che sorprendentemente alcuni di questi manifestavano una forma fenotipica della malattia che oscillava da grave a moderata e che la malattia mostrava comorbidità con altre patologie difficilmente identificabili anche da clinici esperti [9];[11]. Le ragioni

principali vanno ricercate nella variabilità dell'espressione fenotipica dei sintomi, che tendono a cambiare da individuo ad individuo e nel corso del tempo; dunque, anche se i criteri clinici da utilizzare per formulare la diagnosi sono chiari, la variabilità fenotipica e della sintomatologia clinica rende difficile fare una diagnosi specifica [7]. Nel 60% dei casi infatti la malattia mostra comorbidità con la sindrome da deficit di attenzione e iperattività (*ADHD*) e con il disturbo ossessivo compulsivo (*OCD*) nel 40-60%. La combinazione delle tre condizioni (*TS*, *ADHD* e *OCD*) è spesso chiamata *triade della sindrome di Tourette* ed è molto spesso causa di peggioramento nella qualità di vita del paziente se non identificata correttamente. Solo il 10-15% dei pazienti *TS* non mostra comorbidità [12]. Molto spesso, infatti, i sintomi della *TS* sono accompagnati a quelli attribuiti a (*ADHD*) e (*OCD*) oltre che a problemi comportamentali e di linguaggio di diverso grado e complessità [9];[12];[13].

Recenti studi dimostrano che la prevalenza della sindrome sulla popolazione è tra 0.4 e 1%, manifestandosi in minor misura nelle popolazioni nere dell'Africa [14]; l'incidenza nei ragazzi affetti dalla sindrome rispetto alle ragazze è 3:1 [15]. La manifestazione clinica è identica in tutte le culture ed etnie [12];[14]: è stato osservato che vi è più di un fenotipo *TS*, sulla base del grado di manifestazione clinica e sulla base della comorbidità con altri disordini neurologici, in particolare *OCD* e *ADHD* che aggravano la sintomatologia clinica [16];[17]. In questi casi si parla di manifestazione severa (*Severe*) della malattia da distinguere dalla forma lieve-moderata (*mild*): questi ultimi casi potrebbero essere più difficili da identificare [16];[17]. Dunque le notevoli fluttuazioni nella gravità e nella frequenza dei sintomi, abbinate alla sorprendente variazione delle manifestazioni cliniche tra un paziente e l'altro, potrebbero indurre ad errori diagnostici anche se i criteri di diagnosi sono molto chiari[9];[10];[11]. Il quadro sintomatologico del *ADHD*, assai spesso associato in età pediatrica ai tic veri e propri, dopo i 10-12 anni tende ad affievolirsi; più tardi si presenta l'*OCD*, che compare in genere verso gli 8-10 anni ma che può perdurare anche in età adulta [17].

Altri disturbi associati in minor misura sono: disturbi dell'umore, disturbi d'ansia, soprattutto dopo un lungo periodo di soppressione dei tic, disturbi di personalità, disturbi dell'apprendimento, comportamenti autolesionistici, comportamenti complessi non osceni ma socialmente inappropriati (NOSI), balbuzie, abuso di sostanze, aggressività e depressione [11].

Il sintomo che contraddistingue il disturbo Tourette è la manifestazione di uno o più tic, distinti in motori e vocali, semplici e complessi. Sebbene la diagnosi di sindrome di TS si basa sulla presenza di entrambe le tipologie di tic, tuttavia non è così semplice distinguerne la diversa natura poiché alcuni tic sonori attualmente sono anche motori, in quanto derivano da contrazioni muscolari involontarie della laringe, della faringe e della muscolatura respiratoria che producono abnormi suoni come schiarimenti della gola, tosse, singhiozzi e grugniti vari; dunque si preferisce in clinica usare la definizione di tic fonico (sonoro) più che vocale, in quanto non prodotto dalle corde vocali ma da un movimento o contrazione di un muscolo dell'apparato respiratorio. Per definizione la TS è prodotta da un incontrollata contrazione di uno o più muscoli involontari e dunque anche il tic fonico rientra nell'ambito dei tic motori [9].

I tic motori possono essere semplici, se coinvolgono soltanto un gruppo di muscoli e generalmente producono dei rapidi movimenti a scatti (tic clonici), oppure complessi e possono essere “non finalizzati” apparentemente incongrui o intenzionali, cioè comportamenti che il paziente deve mettere in atto per sopperire ad uno stato di ansia e che nel caso del disturbo Tourette in genere sono tutti atteggiamenti non accettati dal sistema in cui essi vivono [9].

I tic fonici semplici sono caratterizzati da colpi di tosse ‘a vuoto’, emissione di aria, versi gutturali, ecolalia e palilalia. I tic fonici più complessi invece sono caratterizzati da enunciazioni immotivate di frasi più o meno compiute, fino all'irrefrenabile pulsione a proferire espressioni o parole imbarazzanti o volgari, si parla in tal caso di coprolalia [9], tuttavia questa presente soltanto nel 10-15% dei casi [12].

Nei casi più gravi si riscontrano disturbi di adattamento del linguaggio e di apprendimento in età scolare associati a comportamenti oppositivi ed antisociali [9];[11].

Generalmente i tic motori cominciano a comparire intorno ai 4-6 anni di età; diversi anni dopo (tra gli 8 ed i 12 anni) compaiono anche quelli vocali e con il passare del tempo diventano sempre più articolati e complessi, ma complessivamente possono avere bassi ed alti durante l'evolversi della malattia; in molti pazienti, ad esempio, la manifestazione del tic raggiunge il picco massimo intorno ai 15 anni di età per poi scomparire del tutto o quasi intorno ai 20 anni [9];[11]. I tic motori e fonici sono spesso preceduti da sensazioni premonitrici, ma queste sensazioni sono temporaneamente alleviate dall'esecuzione del tic. I pazienti al di sotto dei tre anni di età sono incapaci di percepire queste sensazioni premonitrici, la consapevolezza aumenta soltanto con l'età e questi desideri compulsivi compaiono nel 90% degli adolescenti con TS e diventeranno sintomatologicamente anche più fastidiosi del tic; molti pazienti sono in grado di controllare i tic, ma non riescono a controllare le sensazioni premonitrici. Per lungo tempo è stato ritenuto che i tic scomparissero durante il sonno ma studi condotti sui pazienti affetti da TS durante il sonno hanno rilevato che questi ultimi mostrano una bassa efficienza di riposo notturno con picchi elevati di attenzione durante il sonno; inoltre, i pazienti TS aventi comorbidità con ADHD sono caratterizzati da rapidi movimenti oculari. Naturalmente i tic vanno distinti da altri fenomeni motori, tipici nell'infanzia, durante la fase notturna [11].

Alcuni pazienti sono in grado di sopprimere volontariamente i tic, generalmente questo accade con il passare del tempo, oppure sono in grado di associarlo ad un preciso comportamento, come un movimento artistico o atletico, sebbene il costo di questa repressione può comportare esaurimento nervoso. La frequenza e l'intensità dei tic tipicamente peggiora in situazioni di ansia, stress e fatica, e tende ad alleviarsi con una terapia riabilitativa che dona serenità e tranquillità al paziente attraverso la musica, l'arte e la coordinazione motoria [9];[11].

1.3.2 SINDROME DI TOURETTE: diagnosi e terapia

La diagnosi psichiatrica è un processo complesso, che si avvale di valutazioni anamnestiche, colloqui clinici, test reattivi psicopatologici e, quando necessario, anche di altre valutazioni mediche e psicologiche (internistiche, neurologiche, psicologiche, sociali e neuropsicologiche).

La diagnosi di TS viene effettuata in accordo al **DSM-V** (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V* [7]), facendo uso di strumenti di valutazione come *Yale Global Tic Severity Rating Scale (YGTSS)* per valutare la severità dei sintomi [18]. I criteri principali sono elencati nella **tabella 1.2**

Tic motori multipli ed uno o più tic fonici devono essere presenti in qualche stadio della malattia, anche se non necessariamente nello stesso momento, e possono manifestarsi con frequenza costante o essere intermittenti per un periodo superiore ad un anno; non devono derivare da assunzione di farmaci o altre patologie neurologiche. Il criterio temporale viene usato per classificare i tic patologici dai normali tic, che possono comparire durante il normale sviluppo del bambino e dunque da classificarsi come non patologici [11] [18]. Malgrado tali criteri diagnostici richiedano che l'insorgenza avvenga prima 18 anni, l'età media di esordio dei tic è di 5-6 anni con un picco tra i 10-15 anni; entro i 18 anni tendono a scomparire. Tuttavia i tic possono persistere nell'età adulta, anche se la loro gravità di solito diminuisce gradualmente.[11] [18].

Quando i tic sono accompagnati da altri disordini dello sviluppo come Autismo, sindrome di Asperger o altre patologie di ritardo mentale durante l'età evolutiva del bambino, molti specialisti non diagnosticano la TS; in presenza delle suddette patologie, i tic passano in secondo piano. La diagnosi di TS al momento attuale viene fatta solo clinicamente, il medico può richiedere esami specifici di *neuroimaging*, atti soltanto ad escludere le altre patologie; non esistono indagini di laboratorio specifiche al fine di diagnosticare tale sindrome né test di screening [11] [18].

Table 1 Diagnostic criteria for Tourette syndrome
(*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, Text Revision*)⁷⁸

1. Both multiple motor and one or more vocal tics have been present at some time during the illness, although not necessarily concurrently
2. The tics occur many times (usually in bouts) nearly every day or intermittently throughout a period of more than a year; during this period there was never a tic-free period of more than 3 consecutive months
3. Onset before the age of 18 years
4. The disturbance is not due to the direct physiological effects of a substance (e.g., stimulants) or a general medical condition (e.g., Huntington's chorea or postviral encephalitis)

Tabella 1.2 mostrante i criteri di diagnosi della TS in accordo al **DSM-V** (**D**iagnostic and **S**tatistical **M**anual of **M**ental **D**isorders **V** edizione [18]).

Al momento attuale la diagnosi si basa soltanto sul DMS-V, sulla sola osservazione clinica del sintomo e sulla storia familiare, soltanto nei casi in cui si vogliano escludere le cause secondarie dei tic può essere utile una TAC. Per i pazienti con una storia familiare di TS o OCD è sufficiente il solo esame clinico dei sintomi [18].

Recenti studi hanno dimostrato che non esiste un solo fenotipo TS, giacché questa patologia può essere associata a ADHD, OCD, disturbi del linguaggio o dell'apprendimento; inoltre, la manifestazione fenotipica del tic non ha la stessa espressività tra gli affetti di TS ed in alcuni casi il sintomo clinico principale, su cui si fonda la diagnosi, risulterebbe essere *mild*; in questo particolare caso la diagnosi di tale sindrome può risultare molto complicata [16];[17] [18]

Attualmente sono disponibili pochi farmaci ed inoltre tra questi solo alcuni sono stati approvati dal *Food and Drug Administration (FDA)*, quali l'aloiperidolo, la clonidina la clomipramina ed i farmaci serotoninergici).

Questi farmaci hanno un'azione solo su alcuni sintomi e possono essere utilizzati efficacemente nel ridurre gli effetti motori e quelli ossessivi della sindrome [9] [10] [11].

Per i casi più gravi, viene proposto un intervento di neurochirurgia come la stimolazione cerebrale profonda (*DBS, Deep Brain Stimulation*), cioè innesto permanente di elettrodi nell'encefalo a scopo terapeutico; [9];[11]

La terapia cognitivo-comportamentale è da alcuni ritenuta la strada più utile per migliorare i disturbi ossessivi compulsivi ed è particolarmente usata nel trattamento della "Triade"; Anche le tecniche di *Habit Reversal* sono ampiamente citate in letteratura. L'intervento psico-educativo è spesso necessario nella gestione dei sintomi provocati dalla sindrome; inoltre, è fondamentale che i familiari ed il paziente siano guidati da personale addestrato e competente sia nella corretta assunzione delle cure che nella corretta pratica riabilitativa quotidiana [11].

1.3.3 SINDROME DI TOURETTE: La genetica

La sindrome di Gilles de la Tourette è una complessa patologia neuropsichiatrica che ha una forte componente genetica. Studi effettuati sui gemelli hanno dimostrato la natura genetica della TS; il 77% dei monozigoti ed il 23% dei dizigoti manifestava i tic. I dati ottenuti sui gemelli dimostrano una forte componente ereditaria della patologia; un genitore ha il 50% di possibilità di trasmetterla ad uno dei suoi figli, sebbene l'espressività del fenotipo clinico e la penetranza sono variabili ad ogni generazione. Tuttavia, anche se dimostrata la suscettibilità familiare alla malattia questo non prova che essa sia solo strettamente genetica; in quanto patologia complessa, la sindrome di Tourette deriva dall'interazione di geni predittivi della malattia con l'ambiente [19].

Nell'arco degli ultimi anni molti studi sono stati condotti dal *The Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetic (TSAICG)* per cercare di comprendere potenzialmente quali geni potessero maggiormente contribuire all'insorgenza della malattia e sono stati identificati

una varietà di plausibili geni coinvolti nelle *pathways* dei neurotrasmettitori dopamina, istamina e glutammato [19]; tra questi ricordiamo l'identificazione di una mutazione altamente penetrante del gene *L-histidine Decarboxylase* (HDC) in un ampio *pedigree* di pazienti TS [20].

E' importante sottolineare che gli studi condotti per ricercare il gene o i geni di suscettibilità alla TS non hanno portato ad alcuna associazione certa, cioè non è stato ancora identificato alcun gene a cui poter attribuire l'eziologia della malattia; dunque, la manifestazione di tale sindrome deriva dall'attivazione di più geni coinvolti in una precisa *pathway* e dalla loro interazione con l'ambiente [19].

Le alterazioni cromosomiche (traslocazioni, delezioni, inserzioni duplicazioni) facilitano l'identificazione dei geni malattia: nella TS quelle candidate sono tre (7q22-q31, 8q13-q22, e 18q22) [20].

Boghossian-Sell e Kroisel furono tra i primi ad identificare regioni cromosomiche associate al fenotipo Tourette [8];[20] analisi mediante *CGH array* hanno portato all'identificazione del gene *IMMP2L* (*inner mitochondrial membrane peptidase-2-like*), localizzato nella regione 7q3.1, che a seguito di una delezione criptica nella regione 7q3.1-7q3.2 risulta mancante degli esoni 1 e 3. [8];[20]. Sebbene si conosca molto poco sul ruolo biologico in cui tale proteina sia implicata, sembrerebbe essere associata a patologie psichiatriche tra cui anche il disordine dello spettro autistico ASD, oltre che TS [21]. Sono stati identificati come geni malattia in seguito ad un'inserzione cromosomica 2p21-p23 a 7q35-q36: *Contactin Associated Protein 2* (*CNTNAP2*) e *Neurologin 4X* (*NLGN4X*), associati a TD, ADHD e ASD; il gene *NRXN1* *neurexin 1* è associato a TS, schizofrenia e ASD [8];[20], [23];[24].

Nella **tabella 1.3** in basso viene mostrato come geni localizzati in regioni riarrangiate dei cromosomi risultino essere associati ad una pletora di patologie psichiatriche.

Introduzione

Table 1				
Overlap of variants/genes identified in Tourette syndrome, autism, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD).				
	Tourette syndrome	Autism	Schizophrenia	ADHD
Neurexin 4	Exonic deletion in a single affected family [52*]	Molecular cytogenetics; sequencing, parametric linkage [53–54]		
Contactin associated protein 2	Complex chromosomal rearrangement in a single pedigree [51**]	Molecular cytogenetics (<i>de novo</i> inversion), sequencing, homozygosity mapping, and common variant association [55–59]	CNV, common variant association [60–63]	Copy number variation (one occurrence, intronic) [86]
Neurexin 1	CNV (2 occurrences) [7**]	CNV study, molecular cytogenetics, and homozygosity mapping [79–83]	CNV, sequencing [75–78]	
1q21 deletion	CNV (1 occurrence) [7**]	CNV [87]	CNV [88–91]	
IMMPL2	Molecular cytogenetic mapping of a <i>de novo</i> duplication [32]	Common variant analysis [84] and CNV [85]		CNV (1 occurrence) [86]

Tabella 1.3 mostrante un set di geni candidati per tre diverse patologie neuropsichiatriche: Sindrome di Tourette (TS), Autismo (ASD), Schizofrenia, Deficit di attenzione ed iperattività (ADHD) [7].

Recentemente [25] è stato identificato un paziente con TS e ADHD con una inversione al cromosoma 13 inv(13)(q31.1;q33.1) dei tre geni mappati intorno a 500 Kb della mutazione cromosomica, tra questi *Trk-like family member 1 (SLITRK1)*. Sono stati sottoposti a *screening* per *SLITRK1* 174 individui affetti da TS e tre di questi hanno dimostrato una mutazione *frameshift (var321)* sul 3'UTR del gene in questione. Questa mutazione era assente in 3600 cromosomi controllo. Un'altra delezione è stata identificata nella *coding region* del gene, il cui risultato è il prodotto di una proteina tronca, non più funzionante, mostrata in **figura 1.1** [25].

Il gene *SLITRK1* è una proteina transmembrana a singolo passaggio, ad attività tirosin-chinasica; il dominio extracellulare mostra similarità con le proteine della famiglia SLIT, coinvolte principalmente nel *patterning* dentritico, il dominio intracellulare invece è appartenente alla tipologia delle proteine *neurotrophic-responsive tyrosine kinases (TRKs)* da qui il nome *SLITRK1* [26].

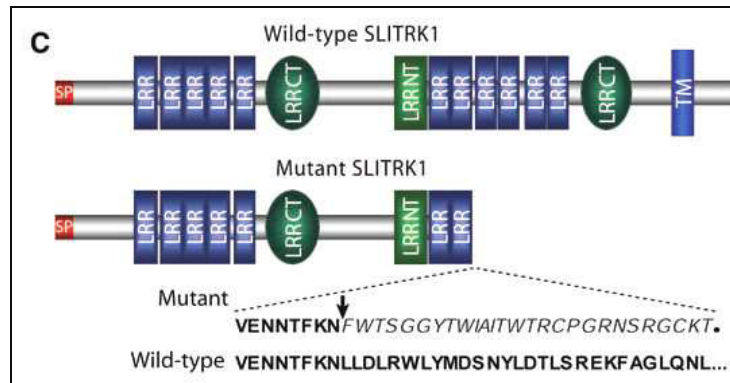


Figura 1.1 mostrante la struttura della proteina trans-membrana *SLITRK1* in alto è mostrata la forma *wild-type* ed in basso la proteina trunca, frutto di una delezione in una regione codificante; vengono anche mostrati la serie di sostituzioni amminoacidiche (in grigio) che determineranno il mancato funzionamento della proteina [25].

Il gene *SLITRK1* risulta principalmente espresso nelle regioni della *cortex* e dello striato, dove sembrerebbe avere un ruolo determinante durante il *patterning* del circuito corticostriatale-talamocorticale comunemente implicato nell'insorgenza della TS [26]. L'espressione del gene *SLITRK1* nelle suddette regioni risulta conservata all'interno della classe dei mammiferi, a dimostrazione dell'importante ruolo che questo gene ricopre in queste regioni del cervello, e della sua potenziale implicazione nella TS, malattia che interessa soprattutto le aree in cui questo gene risulta espresso maggiormente, facendolo diventare il più forte candidato per questa patologia. [26].

Tuttavia nel corso del tempo tutte queste scoperte non sempre hanno mostrato le attese conferme, e numerosi studi hanno confermato che la mutazione (*var321*) sul 3' UTR di *SLITRK1* non è sufficientemente attribuibile alla TS [15]. In un più recente studio [27] su 208 pazienti TS, provenienti da 154 nuclei familiari, è stata riscontrata un'importante significatività statistica tra *SNPs* e popolazione studiata per la mutazione frameshift (*var321*); naturalmente ciò non dimostra che tale mutazione sia l'agente scatenante la TS, ma soltanto una suscettibilità a sviluppare la malattia [20] [27]. È importante sottolineare che nello studio di Miranda [27] lo *screening* per lo *SNP* al gene *SLITRK1* è stato effettuato su tutta la *coding sequence*, non soltanto sul 3'UTR, non riscontrando nessun'altra mutazione nei 208 pazienti [27]. Una particolare

ricerca, inoltre [28], ha identificato delle mutazioni dello stesso gene in un set di 44 famiglie affette da *TTM* Tichotillomania; tali mutazioni ricadono in regioni del gene diverse da quelle identificate per la TS; ciò comunque potrebbe dimostrare come questo gene sia fondamentale in diverse *pathways* a carattere neurologico e che potrebbe esserci una correlazione tra le due le due sindromi [28].

Un altro studio [29] ha proposto il gene *DLGAP3* (*discs, large Drosophila homolog-associated protein 3*) come candidato di suscettibilità a TS, OCD e TTM a dimostrazione di come alcuni geni possano interessare *pathways* comuni a diverse patologie psichiatriche.

Con l'avvento delle tecnologie High Throughput (HT) e la costruzione di piattaforme *microarray*, che consentono di poter studiare contemporaneamente ed in modo semplice e sensibile un numero significativo di geni, sono stati individuati nuovi geni candidati come CD94, GZMB, NKG2E, NK-p46, KIAA0647 [30].

Alcuni studi suggeriscono che fattori ambientali, infettivi o psicosociali, pur non potendo causare la sindrome, possano influenzare la gravità del disordine. È dibattuta l'ipotesi autoimmune che prende il nome di *Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infections*, **PANDAS**: secondo questa ipotesi, il mimetismo molecolare tra *A β-hemolytic streptococcal* (GABHS) e specifiche cellule del cervello determinerebbe una risposta anticorpale di tipo *self*, che porterebbe all'insorgenza della malattia per via della distruzione del tessuto [11];[12].

1.3.4 SINDROME DI TOURETTE:Fisiopatologia

Recenti scoperte nel campo della neurologia, della psicologia comportamentale, oltre all'analisi tramite il *neuroimaging* e gli studi *post-mortem* sul cervello TS di roditori e di primati, sembrano dimostrare che i tic derivino da una disfunzione del circuito dei gangli della base e del lobo frontale. Queste ricerche hanno contribuito alla conoscenza di questa

complessa patologia definendone le anomalie neurologiche, che contribuiscono alla manifestazione del tic, introducendo nuove terapie per rendere migliore la vita di questi pazienti [10] [31].

Studi di *neuroimaging MRI* forniscono numerose prove di un' anomala attività del neurotrasmettitore dopamina: un eccesso di dopamina o la desensibilizzazione dei recettori dopaminergici postsinaptici nei gangli basali potrebbe rappresentare il meccanismo che sta alla base dell'insorgenza della TS, ma anche altri neurotrasmettitori risulterebbero essere coinvolti come l'istamina ed il glutammato[10] [31].

E' interessante notare come da un punto di vista neurologico TS e OCD siano molto simili; d'altronde il 50% dei TS soffre anche di OCD. I tic sono clinicamente soppressi da antagonisti della dopamina, mentre gli OCB (sintomi ossessivo-compulsivi) vengono affievoliti grazie agli inibitori dell'*uptake* della serotonina *SSRI*. Pazienti affetti da entrambe le patologie rispondono molto bene ad una sinergica combinazione di antagonisti della dopamina e inibitori della serotonina. Dal momento che i farmaci agiscono principalmente su questi due neurotrasmettitori, è lecito pensare che le cause patologiche della TS vanno ricercate nelle regioni cerebrali dove principalmente agiscono queste due molecole; queste regioni candidate sono 3: striato (Putamen, Caudato,e globo pallido), sostanza nera e corteccia prefrontale (**figura 1.2**). Nella corteccia prefrontale i terminali assonici serotonergici e dopaminergici prendono contatto con i neuroni piramidali e gli interneuroni extrapiramidali, lo striato e la sostanza nera sono strettamente interconnessi tra di loro tramite il circuito corticostriatale-talamocorticale [10] [31].

La TS è un disordine principalmente attribuibile ai gangli della base ed in particolare allo striato, area principalmente implicata nella pianificazione dei movimenti complessi e nei processi cognitivi: la sintomatologia clinica è dunque da considerarsi uno specchio delle disfunzioni dello striato [10] [31].

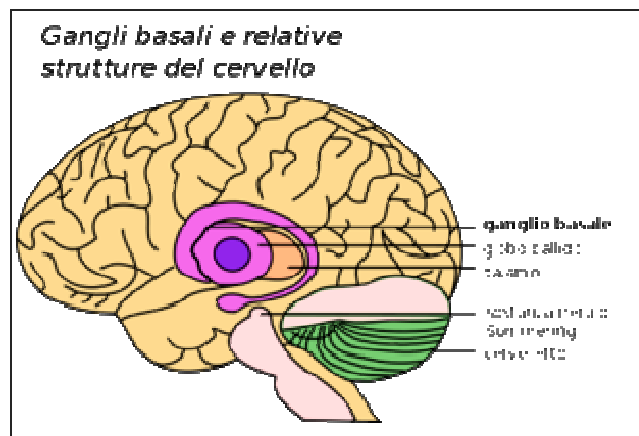


figura 1.2 mostrante le regioni della neocorteccia implicate nella eziopatologia della TS. I gangli della base includono il caudato ed il putamen che ricevono i segnali in ingresso ai nuclei della base mentre il globo pallido regola i segnali in uscita. Caudato, putamen e globo pallido insieme formano lo striato [31].

I gangli della base partecipano al circuito cerebrale responsabile dei movimenti complessi e dei processi cognitivi e proprio nelle suddette aree la dopamina modula il potenziamento a breve (LTD) e lungo termine (LTP), regolando così l'efficacia delle sinapsi cortico-striatali [10] [31].

I processi patologici che stanno all'origine dell'insorgenza dei tic sono ancora poco chiari; il modello maggiormente accertato è rappresentato nella schematica raffigurazione in basso (**figura 1.3**), che mostra il coinvolgimento della regione dello striato in condizioni fisiologiche e patologiche (TS). In condizioni normali i movimenti volontari sono controllati dal circuito corticostriatale-talamico-corticale; dalla corteccia cerebrale si attivano una serie di impulsi nervosi, che agiscono su un gruppo di neuroni dello striato (caudato e putamen): da qui si articolerà una complessa *network* che coinvolgerà il sistema dei gangli della base, in particolare la sostanza nera e il globo pallido, che produrranno un potenziale post-sinaptico di tipo inibitorio in uscita che contribuirà al *feedback* di inibizione del sistema talamico-corticale, che controlla i movimenti volontari. In condizioni patologiche un *subset* di neuroni, costituenti un *aberrant focus* dello striato chiamato anche striatosoma, dando luogo a potenziali post-sinaptici di tipo inibitorio ancora più sostenuti contribuirà ad aumentare l'inibizione del sistema regolato dai gangli della base, disinibendo il circuito ipotalamico-corticale, che non riuscirebbe più a

controllare il movimento muscolare con la produzione di un tic involontario [10] [31].

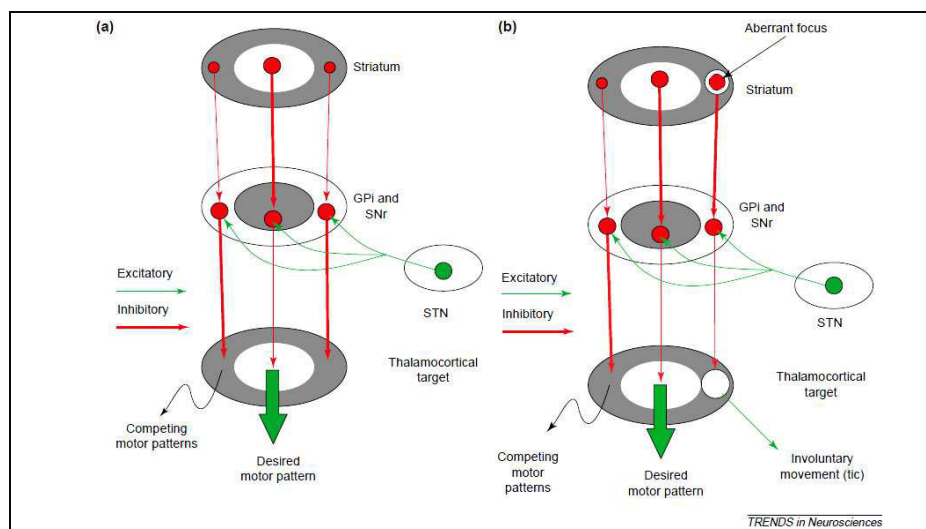


Figura 1.3 mostrante l'organizzazione dei gangli della base in condizioni normali e nella TS. a) La forza relativa dell'impulso nervoso è rappresentata dallo spessore della linea. In bianco è rappresentata l'aumento dell'attività in grigio la diminuzione. b) ipotetica organizzazione dei gangli della base nella TS. Quando un discreto numero di neuroni dello striato cominciano ad attivarsi in modo inappropriato questo porterebbe ad una abnorme inibizione di un discreto set di neuroni del globo pallido e della sostanza nera. L'attivazione di questo set neuronale contribuisce alla disinibizione del circuito talamico-corticale il cui risultato sarà la produzione di movimenti stereotipati e involontari [10].

Diversi studi anatomici, ottenuti tramite tecnologia *neuroimaging MRI*, hanno rilevato una riduzione nel volume corticale e del sistema dei gangli della base e del cortex nei pazienti TS e TS associata ad OCD; tale diminuzione è correlata ad un fenotipo clinico severo [31].

La sindrome di Tourette causa in bambini ed adulti disadattamento sociale e dunque questo disturbo va considerato con il dovuto interesse e diagnosticato precocemente in modo preciso ed esclusivo, in modo tale da indirizzare questi pazienti verso la giusta terapia farmacologia, psicologica e psicoterapeutica consentendo loro di vivere una vita piena e serena. Gli ultimi 30 anni hanno testimoniato un crescente interessamento, da parte della

comunità scientifica, verso questa sindrome (**tabella 1.1**), che hanno portato a significativi, ma ancora incompleti, miglioramenti diagnostici e terapeutici [9]

1.4 *miRNA*

I microRNA (miRNA) costituiscono un esteso gruppo di piccoli RNA endogeni, non codificanti ed a singolo filamento (ss), di lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi; il loro ruolo fondamentale negli animali e nelle piante è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Più precisamente, essi agiscono come regolatori negativi poiché sono in grado di legare attraverso una specifica regione (*seed*) il 3' UTR del mRNA *target* e di determinare la sua degradazione oppure l'inibizione della traduzione, a seconda che la complementarità (*match*) tra il miRNA ed il *target* sia perfetta o meno. Inoltre, condizione necessaria affinché il miRNA possa svolgere il suo ruolo biologico è che la sequenza *target* sia facilmente accessibile al miRNA stesso: una elevata energia di legame tra l'mRNA ed il miRNA può inibire il fenomeno del silenziamento genico malgrado l'alto grado di *matching* tra le due sequenze [32]. Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che esistono numerosi miRNA capaci di riconoscere più *targets*, e che molti mRNA possono essere regolati da diversi miRNA. Tali affermazioni consentono pertanto di considerare i singoli miRNA come piccoli elementi di controllo di più complesse *pathways* regolatrici, che nei fatti stanno alla base di numerose e fondamentali funzioni: queste spaziano da quelle prettamente cellulari (la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi), per poi coinvolgere alcuni processi che riguardano l'intero organismo, comprendenti lo sviluppo embrionale e la risposta immunitaria. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei miRNA nel *self-renewal* e nel differenziamento delle cellule staminali. I miRNA svolgono le loro funzioni in modo fisiologico, poiché presentano specifici e dinamici *patterns* di espressione temporale e spaziale. Tuttavia, è stato dimostrato che nel caso in cui la loro espressione risulti essere

alterata, i miRNA possono essere coinvolti in diverse malattie complesse, tra cui numerosi tumori [33].

1.4.1 EVOLUZIONE DEI GENI miRNA

L'origine antica dei miRNA e la loro significativa espansione in animali a simmetria bilaterale suggeriscono che essi siano stati fondamentali nell'evoluzione della complessità degli organismi. Sebbene il primo miRNA lin-4 sia stato scoperto nel 1993 in *Caenorhabditis elegans* [34], il secondo miRNA identificato nello stesso organismo, let-7 [35], era conservato anche in altri metazoi (nei vermi, uccelli ed uomo) [36]. A questa scoperta se ne aggiunsero altre, che dimostrarono la presenza di geni miRNA nei genomi di *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* ed uomo [37];[38]. Numerosi progressi sono stati fatti dopo aver compreso la biologia dei miRNA, quali l'identificazione di centinaia di geni miRNA, la caratterizzazione delle *pathways* in cui sono coinvolti, l'identificazione dei *targets*, ed i processi patologici in cui essi sono coinvolti [39]. Studi sulla distribuzione dei miRNA nel regno animale hanno rivelato un incremento del numero di geni miRNA nel *lineage* dei Vertebrati ed in quello che ha originato i mammiferi placentari, a dimostrazione della loro importanza nell'evoluzione della complessità [40];[41]; inoltre, dopo che un miRNA compare in una particolare famiglia (*lineage*) è raro che venga perso nella famiglia discendente [40];[41]

1.4.2 ORGANIZZAZIONE GENOMICA

Ad oggi sono stati identificati centinaia di miRNA umani, più di 1600 secondo la più recente versione di miRBase, sia mediante un approccio sperimentale sia mediante analisi computazionale. Tutti i miRNA scoperti vengono infatti puntualmente depositati nel *Sanger Centre miRBase Database*, un vero e proprio registro dei miRNA in cui sono annotate tutte le loro caratteristiche. In questo *database*, che è accessibile *online*

(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), sono presenti anche le informazioni che riguardano la genomica dei miRNA, ovvero il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani. I geni *MIR* sono dispersi in tutti i cromosomi umani, fatta eccezione per il cromosoma Y; nel 50% dei casi, essendo organizzati in *cluster*, sono trascritti in un unico trascritto primario che viene successivamente processato ottenendo in questo modo le singole molecole di miRNA [42]. I miRNA in *clusters* sono spesso correlati funzionalmente. Per quanto riguarda la localizzazione genomica dei miRNA, come mostrato nella **Figura 1.4** essi possono essere distinti in:

- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA esonici in trascritti codificanti

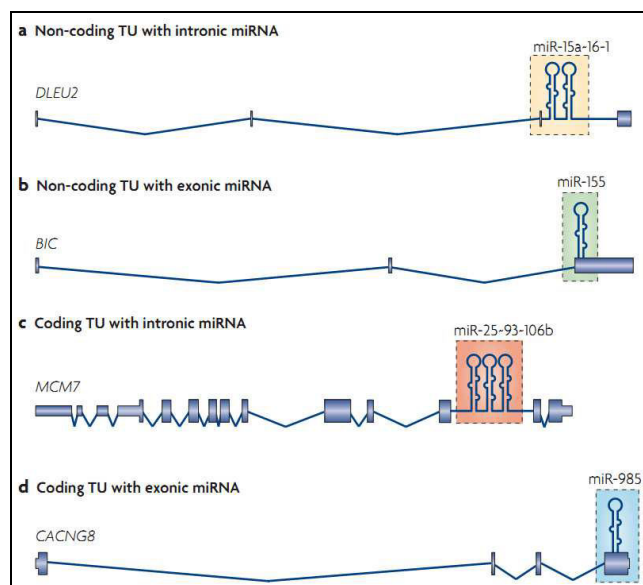


Figura 1.4 Localizzazione genomica e struttura genica dei miRNA. I miRNA possono essere distinti in quattro gruppi in base alla loro localizzazione genomica relativa alle posizioni esoniche ed introniche: **(a)** miRNA intronici in trascritti non codificanti, come il cluster miR-15-16-1; il cluster miR-15a~16-1 si trova nell'introne di un gene definito *non coding RNA*, DLEU2; **(b)** miRNA esonici localizzati in trascritti *non coding*; **(c)** miRNA intronici localizzati in trascritti codificanti proteine: un esempio è rappresentato dal cluster miR-25-93-106b, che è presente nell'introne del trascritto per il fattore della replicazione del DNA, MCM7; **(d)** miRNA esonici in trascritti codificanti proteine: un esempio è dato dal miR-985, localizzato nell'ultimo esone dell'mRNA CACNG8. I box blu indicano le regioni codificanti le proteine. TU, unità trascrizionali [42].

1.4.3 BIOGENESI DEI miRNA

Affinché i miRNA possano svolgere la loro funzione è necessario che subiscano un processo di maturazione, un meccanismo altamente compartimentalizzato che inizia a livello nucleare per poi concludersi nel citoplasma (**Figura 1.5**) La trascrizione dei geni per i miRNA è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) [43];[44][45], sebbene esistano casi di trascrizione da parte della RNA polimerasi III (Pol III) [46]; il risultato è una molecola precursore, il pri-miR, della lunghezza di diverse centinaia di nucleotidi, che nel nucleo si ripiega a formare una struttura a forcina a doppio filamento, spesso contenente la sequenza per miRNA maturi differenti. Successivamente, il pri-miRNA viene processato da una RNase III nucleare ad attività endonucleasica (Drosha, una proteina di circa 160kDa), che agendo in cooperazione con il cofattore DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*) si lega alla struttura a *stem-loop* ed effettua dei tagli in siti specifici che determinano il rilascio del pre-miRNA. Questa fase specificatamente nucleare prende il nome di *cropping*. Il pre-miRNA, lungo circa 60-80 nucleotidi, possiede uno *stem* a doppio filamento di circa 33 nucleotidi complementari tra loro ed un *loop*, ed è caratterizzato da 2-3 nucleotidi sporgenti al 3' ed un gruppo fosfato al 5' [46];[47]. Dopo l'iniziale rielaborazione da parte di Drosha, il pre-miR viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (Exp5), un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente (**Figura 1.5**) [48].

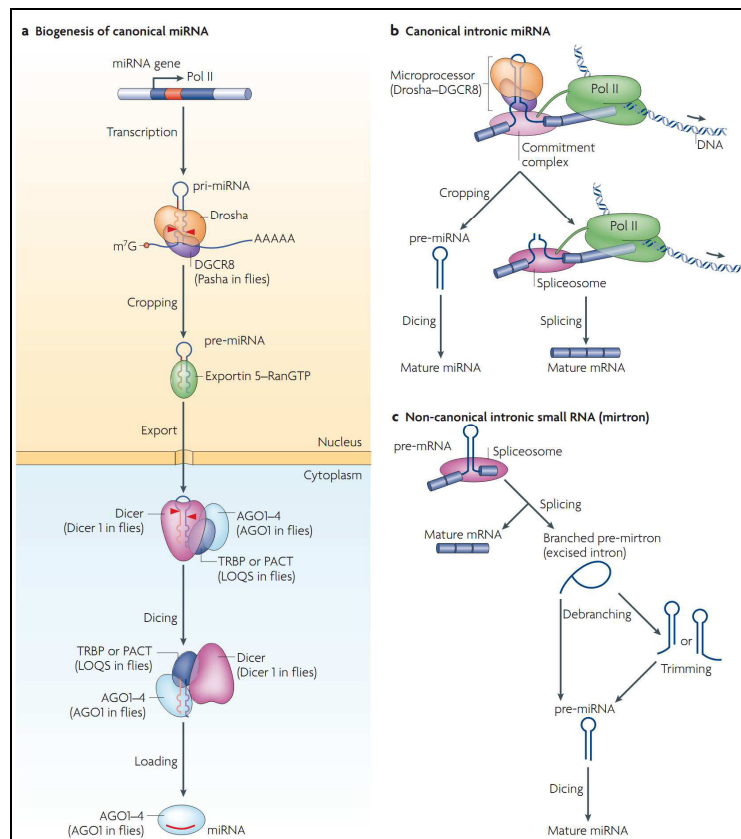


Figura 1.5 Biogenesi della *pathway* dei miRNA. **a)** I geni miRNA nella biogenesi canonica sono trascritti dall'RNA Polimerase II (Pol II) per generare i trascritti primari (*pri-miRNAs*). Lo step iniziale (*cropping*) è mediato dal complesso *Drosha–DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8; Pasha in *D. melanogaster* and *C. elegans*), anche conosciuto come complesso del Microprocessore, che genera un pre-miRNA di ~65 nucleotidi (nt). Il pre-miRNA ha un piccolo stelo più un'estroflessione di ~2-nt al 3', che è riconosciuto dal *nuclear export factor exportin 5* (EXP5). Nel trasporto dal nucleo, la RNasi citoplasmatica III Dicer catalizza il secondo *step* di processamento per produrre il miRNA duplex. Dicer, TRBP (*TAR RNA-binding protein*; also known as TARBP2) e le proteine Argonauto (AGO) 1–4 mediano il processamento del pre-miRNA e l'assemblaggio del RISC nell'uomo. Uno *strand* del duplex rimane nelle proteine Ago come miRNA maturo, mentre l'altro *strand* è degradato. Si ritiene che Ago sia associato a Dicer nello step *Dicing* sia in quello dell'assemblaggio del RISC. **b)** I miRNA intronici nella biogenesi canonica sono processati co-trascrizionalmente prima dello *splicing*. Gli introni contenenti i miRNA subiscono lo *splicing* più lentamente degli introni adiacenti per ragioni non conosciute. Si pensa che il complesso dello *Splicing* legghi gli introni mentre Drosha clivi la forcina del miRNA. Il pre-miRNA entra nella *pathway* dell'miRNA, mentre il resto del trascritto subisce lo *splicing* del pre-mRNA e produce l'mRNA maturo per la sintesi di una proteina. **c)** I miRNA intronici non canonici sono prodotti dallo *splicing* intronico e dal *debranching*. Poiché alcuni piccoli RNA (chiamati *mirtrons*) possono derivare da piccoli introni, che assomigliano ai pre-miRNA, possono anche non subire il processamento da parte di Drosha. Alcuni introni hanno estremità sia al 5' che al 3', cosicché necessitano di essere tagliate prima che il pre-miRNA venga esportato. m7G, 7-methylguanosina [47].

Introduzione

Una volta all'interno del citoplasma, il precursore a forcina viene clivato da Dicer all'interno di un complesso con TRBP (*TAR RNA binding protein*) con formazione di una piccola molecola di RNA duplex di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi, contenente sia il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare (con appaiamenti imperfetti) [49];[50]. Nei mammiferi, Dicer interagisce con le proteine Ago1-Ago4, le quali assemblandosi con il miRNA maturo formano il complesso miRISC (*microRNA Induced Silencing Complex*), che guiderà il miRNA nel riconoscimento del messaggero *target*. Al momento in cui il duplex è stato formato in seguito all'azione di Dicer, i due filamenti presentano una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5'; sebbene il miRNA maturo possa essere identificato in uno o nell'altro filamento, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento verrà degradato [51]. Tuttavia, nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può con la stessa probabilità andare a costituire il miRNA maturo dotato di attività biologica (**Figura 1.6** [52]).

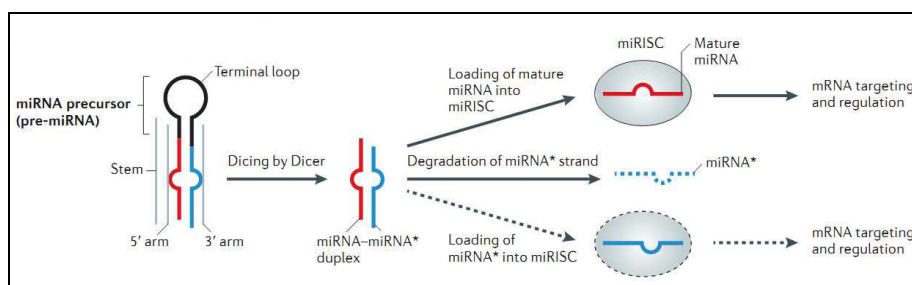


Figura 1.6. Selezione del filamento che costituirà il miRNA maturo [39].

Un meccanismo a parte è quello che permette la maturazione di una sottofamiglia, i *mirtrons*. Essi si trovano all'interno di introni di trascritti di seconda classe e vengono maturati dopo lo *splicing*, senza l'intervento del Drosha. L'RNA che si genera forma una struttura a forcina che viene esportata

nel citoplasma dall'Esportina 5 e tagliata direttamente dal Dicer (**Figura 1.5 c**) [53].

1.4.4 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DEI miRNA

Al fine di portare a termine la sua funzione di regolatore negativo post-trascrizionale, il miRNA maturo sarà legato dalla proteina Argonauta (Ago-2) e quindi convogliato verso il complesso RISC, al quale si legherà. Il complesso RISC rappresenta il vero e proprio effettore della repressione miRNA-mediata. Esso è costituito da alcune fondamentali proteine della famiglia Argonauta (Ago1-Ago4) e da altre che regolano la funzione inibitoria degli effettori del complesso stesso. In particolare, il miRNA maturo riconoscerà e legherà il suo specifico mRNA *target*, la cui espressione sarà repressa (naturalmente sulla base delle leggi della complementarietà). Negli animali, e quindi nell'uomo, questo tipo di riconoscimento è mediato dalla regione 3'UTR del trascritto *target* che può contenere siti multipli di legame al miRNA, in cui sono presenti delle regioni di 2-8 nucleotidi, definite *seed*, essenziali per l'appaiamento [54], che tuttavia non è sempre perfetto ma caratterizzato da *mismatches* e da *bulges*. In alcuni rari casi, le regioni *target* dei segmenti *seed* sono state localizzate nelle molecole di mRNA anche a livello della regione 5'UTR o in regioni codificanti. Il complesso RISC potrà così inibire l'espressione dell'mRNA selezionato attraverso due differenti modalità principali:

1. Ago-mediata dell'mRNA, nel caso di perfetta complementarietà tra il *target* ed il messaggero maturo [54]. In tal caso la degradazione è dovuta all'instabilità del messaggero, determinata dalla sua deadenilazione e dal suo *decapping*. Questi effetti sono mediati, oltre che dalle proteine Argonauta, dalla proteina GW182 e dal macchinario cellulare del *decapping* e della deadenilazione. La degradazione avverrebbe nei cosiddetti *p-bodies* (*processing Bodies*), in cui si accumulerebbero ingenti

quantità di mRNA non tradotti, proteine Argonata, miRNA maturi e repressori trascrizionali [53];[54].

2. Inibizione della traduzione dell'mRNA, in presenza di *mismatch* in posizione centrale tra il *target* ed il maturo [52]. Tale meccanismo potrebbe essere messo in atto nelle fasi di inizio e di allungamento della traduzione, oltre che durante la terminazione, o addirittura si compierebbe con la degradazione del polipeptide appena formato. Un modello recente ipotizza che il complesso RISC possa agire prevenendo l'associazione tra le subunità ribosomiali 40S e 60S, come mostrato nella **Figura 1.7** [55];[56].

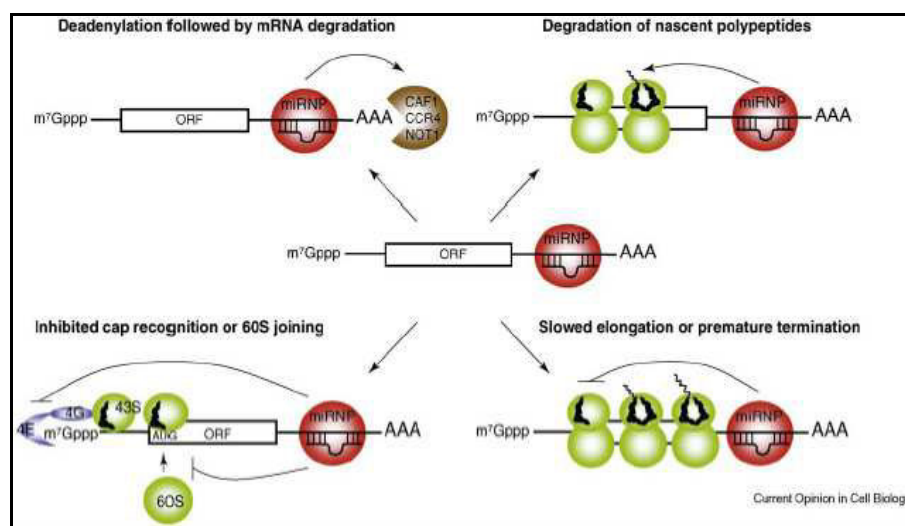


Figura 1.7. Rappresentazione grafica, di alcuni dei possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. Il messaggero *target* può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati [55].

1.4.5 GENI *TARGETS* DEI miRNA

Da un punto di vista funzionale è molto complesso studiare la funzione dei miRNA. A ogni modo, considerando che i miRNA regolano negativamente l'espressione dei loro geni *target*, risulta chiaro che le funzioni dei miRNA dipendano essenzialmente da quelle dei loro *targets*; infatti, sia questi ultimi che i miRNA partecipano alla regolazione dei medesimi processi biologici, ma con effetti chiaramente opposti. Pertanto la ricerca dei *targets* dei miRNA è di

fondamentale importanza per i più recenti studi funzionali. Gli approcci utilizzati a tale scopo sono quello bioinformatico e quello sperimentale, sicuramente più diretto. Pertanto sono stati implementati diversi algoritmi, capaci di effettuare l'allineamento tra la sequenza del maturo di un dato microRNA e quella del genoma in questione. Così, sulla base di una complementarità più o meno perfetta (visto il meccanismo d'azione dei miRNA), è possibile predire i possibili siti di legame all'interno dei 3'UTR di specifici *targets* [33]. Tuttavia le garanzie offerte da questo approccio non sono assolute, dal momento che esso si basa su predizioni. Peraltro, esistono numerosi algoritmi in grado di fare queste predizioni, ed ognuno di questi utilizza dei parametri di ricerca leggermente differenti. Negli ultimi anni il numero di *targets* identificati computazionalmente e poi validati sperimentalmente è aumentato sempre di più, fino a circa 600 *targets*. Tra le tecnologie più utilizzate a tale scopo, sicuramente il test della luciferasi offre un valido supporto metodologico. In particolare, negli ultimi anni, è stato osservato che molti *targets* di miRNA umani sono costituiti da mRNA di geni codificanti per alcuni fattori della trascrizione, confermando l'importanza dei miRNA nell'ambito delle *networks* regolatrici [33].

1.4.6 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEI miRNA

La regolazione dell'espressione dei miRNA è fondamentale per il ruolo svolto da queste molecole ed è quindi fortemente regolata in più punti durante la loro biogenesi.

1. Regolazione della trascrizione
2. Regolazione del processamento
3. Editing
4. microRNA decay

La regolazione della trascrizione avviene in modo simile a quello di molti geni di seconda classe: infatti, a livello dei promotori di diversi geni miRNA sono presenti gli stessi elementi regolativi (TATA box *sequences*, CpG Islands, *inization elements*) dei promotori per i geni codificanti proteine (**Figura 1.8**). I fattori di trascrizione (TF) hanno la capacità di legare specifiche regioni di DNA nel genoma (i siti di legame per i fattori della trascrizione, TFBS), e quindi controllare la trascrizione del DNA. In genere i TF possono agire da soli oppure far parte di grandi complessi regolatori, promuovendo o bloccando il reclutamento della RNA polimerasi II, essenziale per la trascrizione di specifici geni. Nel caso di attivazione della trascrizione si parla di attivatori, mentre in quello di inattivazione si parla di repressori trascrizionali (**Figura 1.8**) [57].

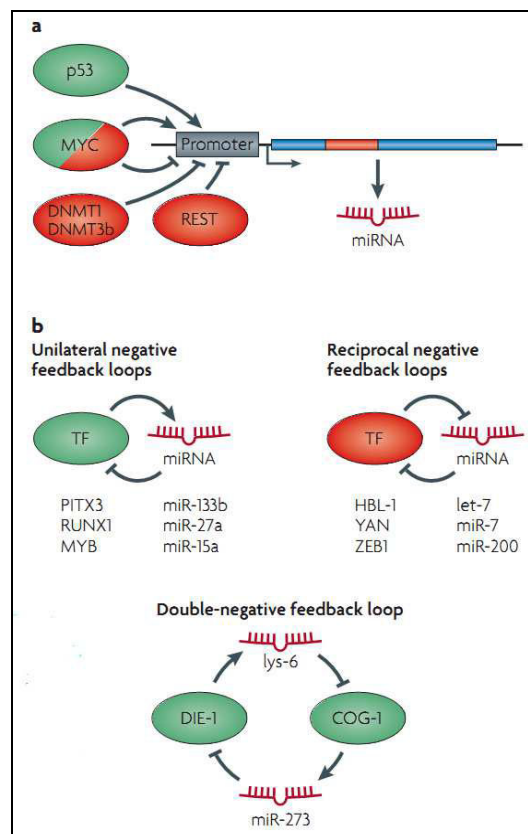


Figura 1.8 Attivatori e repressori della trascrizione dei miRNA; **b**) Regolatori delle *networks* dell'espressione dei miRNA [57].

Molti fattori di trascrizione (TF) regolano l'espressione tessuto-specifica o stadio di sviluppo-specifica influenzando la trascrizione dei miRNA (ad esempio, MYC/MYCN che stimolano l'espressione del *cluster* oncogenico miR-17-92 in cellule di linfoma [58], o REST che inibisce l'espressione del miR-124 in cellule non neuronali o progenitori neuronali tramite deacetilazione istonica e metilazione del promotore [59]. Inoltre, i miRNA frequentemente agiscono in *networks* regolatorie insieme con i TF, i quali possono guidare o reprimere l'espressione dei miRNA. I miRNA stessi possono a loro volta regolare l'espressione dei TF, creando così dei circuiti di regolazione positiva o negativa nei quali il preciso controllo della quantità del miRNA o del TF determina l'effetto fisiologico finale (**Figura 1.8**). La regolazione del processamento dei miRNA avviene a livello di Drosha, di Dicer e delle loro proteine accessorie. Invece, al livello del pre-miR è stato visto che i livelli di Dicer vengono controllati e stabilizzati dal suo cofattore TRBP[57]. L'*editing* del pri-miR o del pre-miR da parte delle proteine ADAR (*adenosine deaminase*) (che catalizzano la conversione dell'adenosina in inosina) altera la sua struttura secondaria e quindi la stabilità, mentre l'*editing* nel *seed* del miRNA maturo da parte di altre proteine altererebbe il riconoscimento del *target* [60]. Infine, la regolazione della stabilità e degradazione del miRNA maturo permette di controllarne la quantità finale nella cellula e quindi l'effetto biologico. E' stato osservato che i miRNA sono in generale più stabili dei messaggeri di seconda classe e hanno un'emivita che va da alcune ore a molti giorni. In generale, il preciso controllo del *decay* potrebbe avere un ruolo fondamentale nei meccanismi di sviluppo e di risposta di tipo *switch on-off* [60].

1.5 miRNA: RUOLO FISIOLÓGICO E PATOLOGICO

Sia negli organismi invertebrati che vertebrati i geni miRNA controllano un'enorme varietà di processi cellulari come lo sviluppo embrionale, la risposta a particolari condizioni di stress ambientale, il

differenziamento neuronale il controllo della crescita, la morte cellulare [33];[34]. Diversi studi sono a favore dell'ipotesi che alcuni miRNA possano essere necessari per il corretto sviluppo di organi e tessuti: si pensi, ad esempio, allo sviluppo cerebrale, all'ematopoiesi ed alla miogenesi [61].

Sostanziali osservazioni lasciano pensare che i microRNA sono anche implicati nel fenomeno neoplastico: i primi microRNA scoperti in *C.elegans* e *D. melanogaster* erano coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e nell'apoptosi; inoltre quando sono stati scoperti i microRNA umani, è stato evidenziato che questi sono localizzati in prevalenza in "siti fragili", cioè regioni del cromosoma sottoposti a rotture frequenti, oppure in regioni del genoma che comunemente sono amplificate (*gain*) o delete (*loss*) in determinati tipi di cancro dell'uomo [62].

Diversi approcci sono usati per cercare di capire se la variazione nell'espressione dei microRNA possa essere usata per caratterizzare tessuti differenziati da quelli indifferenziati, per discriminare le patologie neoplastiche, degenerative e neurodegenerative, per individuare un preciso stadio di risposta ad una terapia o soltanto per individuare delle pathway tramite l'analisi dei suoi *targets* ciascuno con specifici pro e contro; i più usati sono l'approccio in *real-time*, *microarray*, *northern blot analysis*, mutanti dei microRNA o dei loro *targets*, costruzione di inibitori antisenso, e molti altri[61];[62].

1.6 microRNA E COINVOLGIMENTO NEL SISTEMA NERVOSO: NEUROSVILUPPO E NEURO-PATOLOGIA

Il sistema nervoso è noto per la sua notevole complessità caratterizzata da un preciso e sofisticato *pattern* morfogenetico, di diversità cellulare, di *network* neuronali e risposte a stimoli esterni; tutte queste funzioni, incluse l'apprendimento e la memoria a breve e lungo termine, sono orchestrate da un complesso sistema di regolazione comprendente l'induzione, lo sviluppo e la differenziazione neuronale. E' intuibile che specifiche alterazioni in questo

complesso sistema a livello fisiologico possono determinare un ampio spettro di disordini neuronali. Evidenze sperimentali dimostrano come gli RNA non *coding* siano la chiave di lettura nella complessa conoscenza di quest'organo [63]. Recenti ricerche hanno fatto emergere come i microRNA sono espressi in maniera spazialmente e temporalmente specifica nel cervello dei vertebrati, ciò dimostra quanto il silenziamento genico mediato da queste piccole molecole sia fondamentale in tutti i meccanismi riguardanti lo sviluppo di tale complesso organo; a tal riguardo un gruppo di ricercatori ha inoltre trovato uno specifico *subset* di microRNA fortemente espressi a livello del cervello sia di uomo che di topo [64].

Ciò che rende ancor più affascinante il cervello dei mammiferi è proprio la sua straordinaria complessità; le cellule neuronali sono in grado di rispondere a diversi stimoli, sia funzionali che di sviluppo che di crescita delle cellule stesse, grazie al cambiamento del loro *pattern* d'espressione genica [63]. La regolazione post-trascrizionale mediata dai *miRNAs*, a livello del sistema nervoso centrale SNC dei mammiferi, media processi quali la neurogenesi, il differenziamento neuronale, la plasticità sinaptica, il destino dei diversi tipi cellulari ed una miriade di altri meccanismi contribuendo a mantenere questa straordinaria complessità; dunque uno squilibrio in questo specifico pattern d'espressione di queste piccole molecole può determinare patologie di carattere neurologico o tumorale [63]. La sconcertante diversità di tipi neuronali, la diversa distribuzione di queste cellule nelle diverse aree del cervello così come il complesso circuito sinaptico è ottenuta grazie diversi livelli di regolazione dell'espressione genica, e negli ultimi anni si è dimostrato che proprio i microRNA contribuiscono al mantenimento di questo sistema complesso. Maggiori conoscenze derivano dagli studi di *profiling* dove si è anche dimostrato che la loro espressione è diversa a seconda del tipo cellulare considerato e del circuito neuronale dove essi esplicano la loro azione; alcuni esempi sono mostrati in **tabella 1.4** [63].

Introduzione

TABLE 1: miRNAs involved in neurodevelopment.			
miRNA	Species	Target	Function
miR-iab-4-5p	<i>Drosophila</i>	UBX	Regulation of Hox gene involved in the development of halteres
miR10a	Human	HOXA1	Downregulation of HOXA1 geneExpression
lsey-6	<i>C. elegans</i>	Cog-1	Required to specify ASEL sensory neuron identity
miR-273	<i>C. elegans</i>	Die-1	Expressed in ASER; suppresses ASEL identity
miR-196	Rodents	HOXB8	Downregulation of HOXC8, HOXD8 and HOXA7
miR-124	Rodents	SCP1	Neural induction in the spinal cord of developing embryos
miR-124	Rodents	SOX9	Regulation of the neurogenesis in the SVZ stem cell niche and neurite outgrowth in neuronal differentiation
miR-132	Rodents	P250GAP	Regulation of the neuronal morphogenesis and circadian clock
miR-219	Rodents	SCOP	Regulation of the circadian period length
miR-133b	Rodents	Pitx3	Regulation of the maturation of midbrain dopaminergic neurons
miR-134	Rodents	LimK1	Modulation of the size of dendritic spines

Tabella 1.4 mostrante geni microRNA ed i loro *targets* molecolari coinvolti nei processi di sviluppo e differenziamento del SNC [65]

Una dimostrazione dell'importante ruolo assolto da queste piccole molecole viene dimostrato da studi condotti su embrioni mutanti di zebrafish per Dicer in cui si è osservato un'alterazione del pattern di morfogenesi cerebrale dovuta ad un mancato completamento della *pathway* biogenetica dei microRNAs; se l'attività del Dicer veniva ristabilita si assisteva ad un incremento del differenziamento dei neuroni ippocampali in vitro. Tutto ciò dimostra come i microRNAs siano fondamentali sia durante tutto il processo di differenziamento neuronale che nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale [63];[66]. Per esempio, il miR-124, il miR-125 ed il miR-128 si accumulano durante la maturazione del sistema nervoso, Il miR-23 ed il miR-29 mostrano livelli sensibilmente alti negli astrociti adulti, e viceversa livelli molto più bassi durante lo sviluppo dell'embrione, dimostrando così che essi sono microRNA differenziamento specifici [63];[66].

Il miR-124 è un esempio di come sia complesso il sistema di regolazione tra microRNA e sviluppo neuronale; questo miR induce la sottoespressione di parecchi mRNA non neuronali, e produce un profilo d'espressione peculiare del tessuto nervoso, a dimostrazione della sua importanza durante lo sviluppo neuronale costituisce da solo il 50% dei

microRNAs neuronali. **REST** (*RE1 silencing transcription factor*) è un repressore trascrizionale di geni neuronali in tessuti non neuronali incluso anche il miR-124; di contro nelle cellule neuronali il miR-124 inibisce l'espressione di **REST** tramite il silenziamento di mRNA non neuronali incluso anche **SCPI** (small C-terminal domain phosphatase-1). Il miR-124 inoltre bloccando **PTB** in tessuti neuronali (*polypyrimidine tract-binding protein*) favorisce l'espressione del suo omologo neuronale **nPTB** durante lo sviluppo neuronale [63];[66] I microRNA sono anche coinvolti nei meccanismi che regolano la plasticità sinaptica cioè tutti quei processi che determinano lo scambio di mRNA dall'assone ai dendriti nel potenziamento a breve e lungo termine.

Il miR-134 (**figura 1.9**) risulta fortemente espresso a livello delle spine dendritiche dei neuroni dell'ippocampo di ratto; la sua espressione regola negativamente la dimensione delle stesse tramite l'inibizione della traduzione dell'mRNA che codifica per una *protein kinase*, *Limk1*, attraverso la regolazione dei fattori che regolano la depolarizzazione dei filamenti di actina. L'inibizione di tale microRNA, tramite un oligonucleotide antisense, ha dimostrato infatti un aumento della dimensione delle spine dendritiche [63];[66] [67].

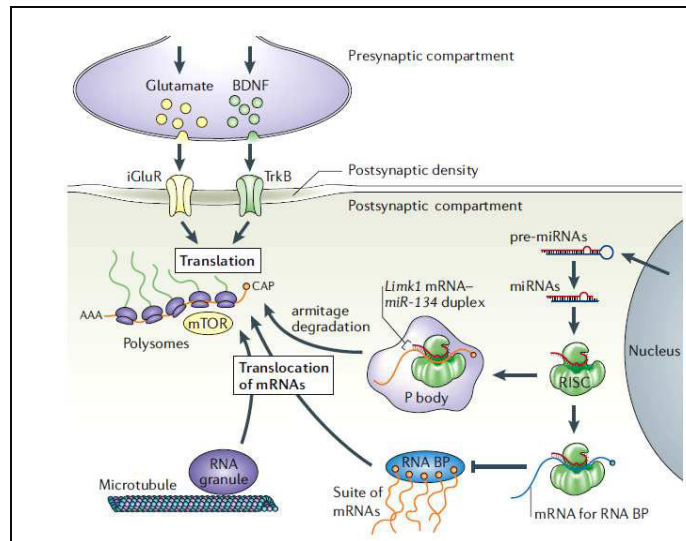


Figura 1.9 mostrante un modello di regolazione della plasticità sinaptica mediato dai microRNA. La stimolazione di recettori ionotropici per il glutammato o recettori **TrkB** da parte di recettori che rispondono a fattori neurotrofici di derivazione neuronale **BDNF** comporta la traduzione di mRNA sui polisomi posti alla base delle spine dendritiche. La traduzione di questi mRNA è regolata da microRNA, uno di questi è il miR134 che controlla la crescita delle spine dendritiche tramite inibizione della chinasi *Limk1* [66].

Recentemente è stato dimostrato che il miR-133-b, particolarmente espresso in *midbrain* dei mammiferi è coinvolto nel differenziamento dei neuroni dopaminergici, modulando la trascrizione del fattore **Pitx3** ed instaurando un meccanismo a *feedback*, dove l'aumento del fattore **Pitx3** induce un incremento del miR-133b, instaurando quindi un circuito che mantenga sempre alti i livelli di quest'importante microRNA. Anche in questo caso l'inibizione di tale microRNA tramite un oligonucleotide antisense, non permette l'istaurarsi del circuito a *feedback* e dunque influenza negativamente lo sviluppo dei neuroni dopaminergici [63];[66]. l'importanza di questo microRNA è stata evidenziata da recenti scoperte che hanno evidenziato una sottoespressione di questo gene nella malattia di Parkinson [65]. Quello che risulta ancora più interessante è che molti microRNA espressi nel cervello dei mammiferi non sono conservati tra i primati, dunque si può pensare ad una origine evolutiva indipendente e che specificatamente alcuni microRNA

Introduzione

esplicano il loro ruolo biologico nei mammiferi e potrebbero essere un indice evolutivo di questa classe [65].

Da sempre dunque il ruolo di queste piccole molecole nel Sistema Nervoso è stato oggetto di grandi ricerche in primo luogo perché più della metà di questi geni sono stati identificati esclusivamente nel cervello regolando l'espressione genica in diversi compartimenti cellulari a livello trascrizionale e post-trascrizionale [19]; tutto ciò lascia pensare che la dis-regolazione di questo complesso sistema tra pathway biogenetica dei microRNA ed espressione dei loro geni *targets* possa determinare delle condizioni patologiche neurodegenerative, neuropsichiatriche e tumorali di non trascurante interesse [19] alcune mostrate nella **figura 1.10** sottostante

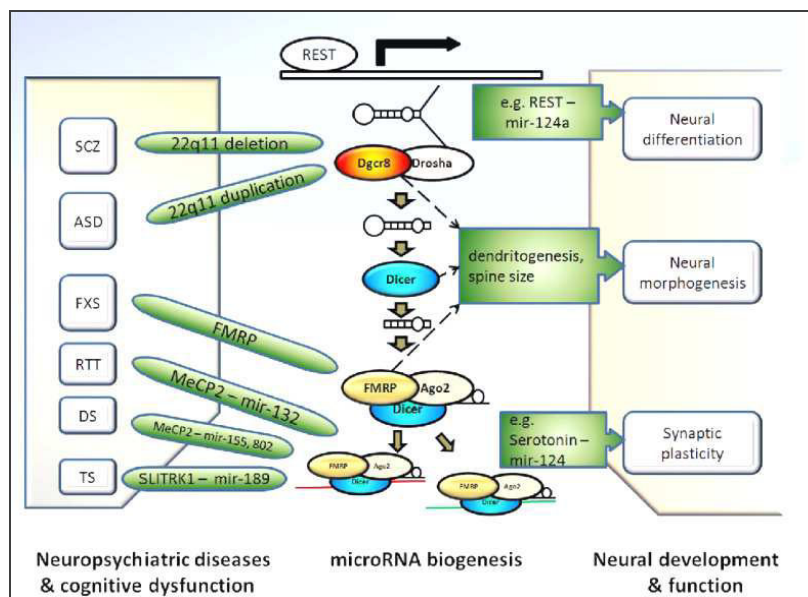


Figura 1.10 mostrante la pathway biogenetica dei microRNAs, i geni miR maturi coinvolti nella struttura e funzione neuronale e le patologie ad essi connesse. SCZ = schizofrenia, ASD = Disordini dello spettro autistico; FXS = Sindrome dell'X-Fragile; RTT = Sindrome di Rett; DS = Sindrome di Down; TS = Sindrome di Tourette [19].

Introduzione

Nella **tabella 1.5** sottostante sono mostrati solo alcuni tra i microRNA, che sono stati identificati come marcatori di condizioni patologiche a carattere neurologico.

MicroRNA	Neurological disease
<i>Downregulated miRNAs</i>	
Let-7	AD
miR-9/miR-9*	AD and HD
miR-15a	AD
miR-16b	SP
miR-19b	AD
miR-29a	HD
miR-29b-1	AD
miR-30b	SP
miR-101	AD
miR-106b	AD
miR-107	AD
miR-128	AD
MiR-132	AD and HD
miR-133b	PD
miR-146a	AD
miR-298	AD
miR-328	AD
<i>Upregulated miRNAs</i>	
miR-9	AD and autism
miR-125	AD
miR-128	AD
miR-181	SP

Tabella 1.5 mostrante geni microRNA identificati in diverse patologie a carattere neurologico. Abbreviazioni: AD Alzheimer, HD Huntington SP schizofrenia [68].

Ricordiamo nel campo delle patologie neurodegenerative la *down-regulation* dei microRNAs miR-298 e miR-328, identificati in pazienti con malattia di Alzheimer. Entrambi i microRNA hanno come target **BACE1**, gene, up-regolato in questa patologia [65]. Come mostra la **tabella 1.5**, è stato dimostrato che il miR-9 risulti essere coinvolto in diverse pathway a carattere neurologico, ed è stato riscontrato sia *up* che *down* regolato, definendosi un buon marcatore delle patologie a carattere neurologico; [68]

1.6.1 microRNA E SINDROME DI TOURETTE

Come precedentemente accennato le patologie complesse sono causate da una combinazione di diversi fattori sia genetici che ambientali; per quanto concerne i fattori genetici lo stato dell'arte si sta concentrando sull'identificazione, tramite tecnologie *HT*, dei *single nucleotide polymorphisms (SNPs)* e sui *genome-wide association studies (GWASs)* per identificare aplotipi associati a malattie complesse. Inizialmente si pensò di concentrarsi solo su *SNPs* ricadenti in regioni codificanti del gene, ma in seguito si ipotizzò che *SNPs* ricadenti in regioni intergeniche potevano produrre un effetto biologico di pari importanza a quello derivato da mutazioni identificate nelle regioni esoniche e dunque si cominciò a prendere in considerazione l'ipotesi che i database di *SNP* e *CNV* umani già esistenti e disponibili *on-line* dovevano essere rivisti in questa nuova chiave di lettura [69] come mostrato nella **figura 1.11** in basso

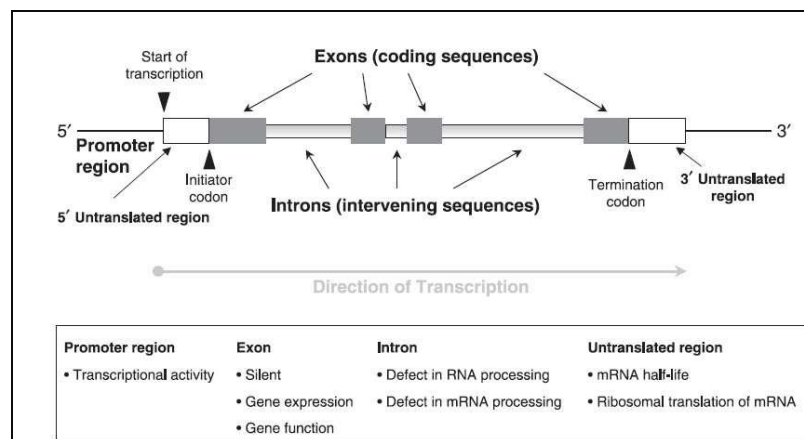


Figura 1.11 mostrante un esempio di struttura di un gene ed i potenziali siti in cui può ricadere la mutazione (*SNP*) e l'effetto biologico che ne deriva. Se la mutazione ricade nella regione promotrice verrà influenzato il livello di espressione del suddetto gene poiché le proteine regolatrici non riescono a legarsi alla regione promotrice; se ricade nella regione codificante, il prodotto genico sarà non biologicamente funzionante, se invece la mutazione ricade in una regione intronica si potrebbero osservare difetti nei processi di splicing ed infine lo *SNP* potrebbe ricadere nelle regioni 5' o 3' UTR del gene, nel primo caso mRNA non riuscirà a legarsi perfettamente alla sub-unità minore del ribosoma nel secondo caso verrà influenzata l'emivita dell'mRNA o il legame con i microRNA [1].

Introduzione

Nel 2006 un gruppo di ricercatori [70] identificarono una mutazione (transizione G/A) sul 3' UTR del gene codificante *MSTN myostatin/growth differentiation factor 8 gene in Texel sheep*. Questa mutazione genera un sito di *target* per i miR-1 e miR-206, che a sua volta determinano notevole riduzione d'espressione del gene *MSTN* che generalmente contribuisce all'ipertrofia muscolare nella pecora [65]; più o meno negli stessi anni seguendo l'approccio della candidatura posizionale [25] studiarono un gene localizzato sul cromosoma 13q31, in quanto questa regione, da analisi in FISH, risultava presentare un'inversione cromosomica in pazienti affetti da TS; il gene in questione era *Slit and Trk-like 1 (SLITRK1)*, mostrato nella **figura 1.12** sottostante, codificante per una proteina trans-membrana altamente espressa nelle stesse regioni del cervello dove ha inizio il focus della patologia. Questi ricercatori hanno identificato una mutazione *frameshift* precisamente (var321) sul 3'UTR di *SLITRK1 binding site* del miR-189 ciò determinerebbe un aumento incontrollato della proteina mutata, non più controllata dal miR-189 [25].

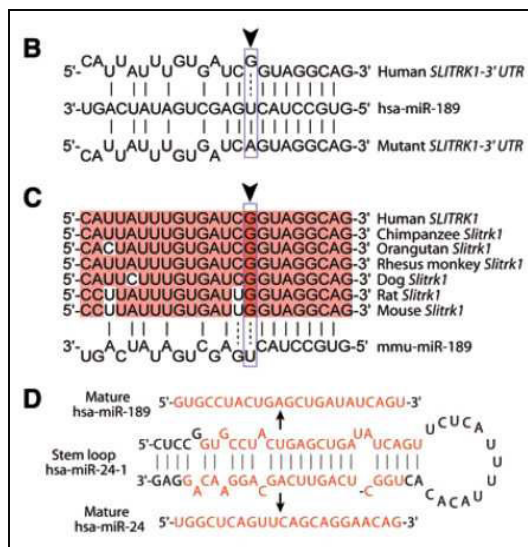


Figura 1.12 mostrante le caratteristiche genetiche e funzionali del 3'UTR di *SLITRK1*.

B) sequenza *wild-type* e mutata del 3'UTR in evidenza la sostituzione G/A che determina l'assenza di *binding site* per il miR-189. **C)** sequenza del 3'UTR di *SLITRK1* in diverse specie, e la conservazione del nucleotide G. **D)** maturazione del miR-189 dal pre-miR-124-1 dando luogo al miR-189 ed al miR-24 [25].

Studi di ibridazione in situ nel topo hanno dimostrato una co-espressione dei due geni nel neocortex, nell'ippocampo, nel talamo e nei nuclei sub-talamici, nello striato e nel cerebellum, tutte aree interessate nello sviluppo cerebrale e coinvolte nell'insorgenza della patologia Tourette come già precedentemente descritto [25].

1.7 I microRNA CIRCOLANTI

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad un notevole incremento di tecnologie e metodologie volte ad identificare test o molecole *makers* quanto meno invasive e quanto più sensibili sia nella rilevazione precoce che nel monitoraggio della risposta farmacologica a patologie neoplastiche, degenerative e neurodegenerative al fine di abbassarne la mortalità e morbilità.

Diversi studiosi hanno proposto i piccoli RNA non codificanti come marcatori di svariate patologie in quanto, come precedentemente accennato, la loro espressione è tessuto-specifici e tumore specifica [61];[62] ed inoltre tecnologie come *QPCR*, *microarray*, *northern blot analysis* sono in grado di rilevarli anche da tessuti inclusi in paraffina, ciò implicitamente fa pensare che siano molto stabili [71]. Dal momento che queste piccole molecole solitamente risultano essere degli indicatori di uno stadio patologico, o fisiologico e notevolmente stabili anche in condizioni più estreme, come l'inclusione di tessuti in paraffina, si è pensato che potessero essere anche facilmente quantificati da fluidi biologici piuttosto che da un prelievo biotico, di gran lunga molto più invasivo [72].

Recentemente proprio i miRNA circolanti hanno proprio aperto la possibilità di identificare dei biomarcatori non invasivi di varie patologie effettuando un semplice prelievo del fluido biologico di interesse, ciò li ha resi particolarmente appetibili da un punto di vista dell'utilità clinica sia a livello prognostico che diagnostico [72]. Per definizione un buon biomarcatore deve

essere misurato e valutato come indicatore di uno determinato stato e momento fisiologico patologico, di una precisa risposta farmacologica o intervento terapeutico di qualsiasi tipo, deve possedere sensibilità, specificità, robustezza oltre che un elevato potere predittivo e naturalmente deve essere facilmente reperibile in modo quanto meno invasivo [72]. I miRNA circolanti hanno diverse caratteristiche che li rendono dei buoni biomarcatori: sono molto stabili nei campioni di siero e di plasma, perché protetti dall'attività delle RNase e sono resistenti a diversi insulti esterni, quali cicli multipli di congelamento-scongelo, bollitura, condizioni di pH estreme, e conservazione prolungata. Inoltre, i miRNAs circolanti possono essere facilmente dosati attraverso diverse metodiche [72].

I primi ad identificare miRNA circolanti furono Chim e colleghi quando nel 2008 dimostrarono la presenza di microRNA, di probabile origine placentare, nel plasma di donne in gravidanza; successivamente dimostrarono che i livelli di espressione di questi microRNA placentari potevano essere correlati allo stadio di gravidanza e potevano essere usati per distinguere donne gravide da quelle non gravide [73];[74]. Più tardi numerosi ricercatori hanno confermato la presenza di microRNAs nel siero di individui normali grazie a isolamento dell'RNA tramite tecnologia *PAGE* e successivo clonaggio e sequenziamento [71]. Come mostrato nella **figura 1.13** sottostante la percentuale maggiore, il 73% di RNA, estratto dal siero umano corrisponde a microRNA conosciuti; altri ricercatori hanno effettuato lo stesso tipo di indagine effettuando una QPCR direttamente sul siero o plasma, dimostrando che non è assolutamente necessaria l'estrazione di RNA per identificare i microRNA circolanti [75]; Hunter nei suoi studi ha messo in relazione il profilo d'espressione dei microRNA circolanti del siero e del plasma con quello delle cellule mononucleari del sangue e le microvescicole evidenziandone significative differenze [76]. Complessivamente tutti gli studi separati effettuati per identificare, con varie tecnologie, i microRNA circolanti, sono elencati nella **tabella 1.6**

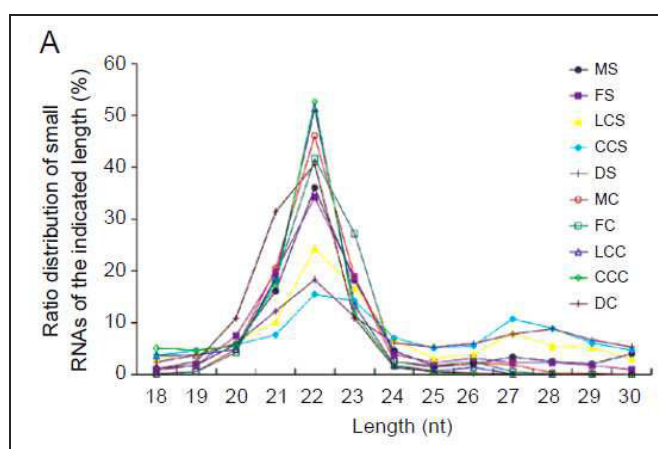


Figura 1.13 mostrante i risultati ottenuti da [75] tramite tecnologia *Solexa Sequencing* sulla distribuzione di *small RNA* proveniente da siero umano di lunghezza compresa tra 18 e 30 bp quella attribuibile alla classe dei microRNA.

Chen			Mitchell			Hunter			Mitchell		
	miRNA	A ^a		miRNA	A			A		miRNA	A
1	hsa-miR-451	106		hsa-miR-223	100		hsa-miR-223	338		hsa-let-7f	16
2	hsa-miR-16	12		hsa-miR-16	20		hsa-miR-484	11		hsa-miR-223	11
3	hsa-miR-486-5p	8		hsa-miR-126	7		hsa-miR-191	10		hsa-miR-21	9
4	hsa-miR-101	5		hsa-miR-26a	6		hsa-miR-146a	8		hsa-let-7a	6
5	hsa-let-7g	4		hsa-miR-24	6		hsa-miR-16	5		hsa-miR-103	4
6	hsa-let-7f	4		hsa-miR-19b	6		hsa-miR-26a	5		hsa-miR-101	3
7	hsa-let-7a	4		hsa-miR-142-3p	5		hsa-miR-222	5		hsa-miR-16	3
8	hsa-miR-185	3		hsa-miR-9a	4		hsa-miR-24	5		hsa-miR-24	3
9	hsa-miR-20a	3		hsa-miR-26b	4		hsa-miR-126	4		hsa-miR-26a	3
10	hsa-miR-106b	3		hsa-miR-191	3		hsa-miR-32	3		hsa-let-7g	2
11	hsa-let-7i	2		hsa-miR-20a	2		hsa-miR-486	3		hsa-miR-185	2
12	hsa-miR-103	2		hsa-miR-146a	2		hsa-miR-20a	2		hsa-miR-30d	2
13	hsa-miR-21	2		hsa-miR-484	2		hsa-miR-19b	2		hsa-miR-451	2
14	hsa-miR-25	1		hsa-miR-222	2		hsa-miR-150	2		hsa-let-7e	1
15	hsa-let-7b	1		hsa-miR-92a	2		hsa-miR-574	1		hsa-let-7i	1
16	hsa-miR-192	1		hsa-miR-486	1		hsa-miR-92	1		hsa-miR-125a-5p	1
17	hsa-miR-191	1		hsa-miR-186	1		hsa-miR-93	1		hsa-miR-126	1
18	hsa-miR-17	1		hsa-miR-126a	1		hsa-miR-342	1		hsa-miR-140-3p	1
19	hsa-miR-26a	1		hsa-miR-30b	1		hsa-miR-197	1		hsa-miR-146a	1
20	hsa-miR-142-5p	1		hsa-miR-15b	1		hsa-miR-328	1		hsa-miR-148b	1

Tabella 1.6 mostrante studi separati sull'identificazione di microRNA circolanti in individui normali; i diversi approcci hanno tuttavia condotto ad una serie di microRNA circolanti costante per tutti e tre gli studi pilota [77].

Questi studi hanno anche dimostrato che, eccetto per i microRNA di origine placentare, il profilo d'espressione dei microRNAs circolanti è uguale sia per gli uomini che per le donne e dunque ipotizzabile che in entrambe le classi assolvono la stessa funzione biologica. Sembra che a livello fisiologico queste piccole molecole contribuiscano a regolare la maturazione di certi elementi del sangue, un esempio è quello del miR-451, detectato nel siero e

regolatore del differenziamento eritrocitario. E' dunque molto probabile che negli individui normali i microRNA sierici vengano rilasciati principalmente dalle cellule del sangue [77]. Inoltre l'analisi dei *targets* di questi microRNA e le relative pathway in cui essi sono coinvolti rilevano un ruolo potenziale ruolo nella risposta immune, nel differenziamento delle cellule ematiche [78]. Diversi algoritmi sono stati implementati per creare dei *database* di classificazione e annotazione di microRNA circolanti, come *miRandola* [79].

Dopo aver identificato i microRNA circolanti nel siero, nel plasma e nelle vescicole esosomiali, l'attenzione verso queste piccole molecole si è spostata sul loro potenziale ruolo in campo clinico e prognostico, vedere se alcuni microRNAs circolanti potessero essere correlati ad un particolare stato patologico o fisiologico [81]. Nella **tabella 1.7** in basso sono mostrati solo alcuni tra gli esempi di microRNA identificati in fluidi biologici ed associati a differenti condizioni patologiche [78]; tra i primi che effettuarono questa tipologia d'indagine *Lawriel et al* riscontrarono la presenza di livelli di espressione più elevati dei miR-155, miR-210 e miR-21 nel siero di pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B, rispetto ai controlli sani [80]. Inoltre alti livelli del miR-21 erano correlati alla sopravvivenza libera da recidiva [80]; ma questo è soltanto il primo tra i numerosi studi che vennero condotti in seguito e mostrati in **tabella 1.7**.

Introduzione

Table 1 A compendium of circulating miRNAs with potential as biomarkers for cancer					
miRNAs	Cancer type	Body fluid source	Healthy subjects (n)	Patients (n)	Clinical correlations
miRs-21, 155 and 210	Diffuse large B-cell lymphoma	Serum	43	60	High miR-21 expression was associated with relapse-free survival ⁶¹
miR-141	Prostate	Serum	25	25	Serum levels of miR-141 distinguished patients from healthy subjects ⁶²
miRs-141, 16, 92a, 92b, 103, 107, 197, 34b, 328, 485-3p, 486-5p, 574-3p, 636, 640, 766, and 885-5p	Prostate	Serum	15	6	Serum levels were significantly higher in patients compared to controls ¹⁰
miRs-486, 30d, 1 and 499	Lung	Serum	—	243	Serum levels were differentially expressed between patients with longer and shorter survival. The four-miRNA signature was an independent predictor of overall survival ⁷
miRs-21, 92, 93, 126 and 29a	Ovarian	Serum	11	19	miRs-21, 92 and 93 were overexpressed in patients with normal preoperative cancer antigen 125 ⁷³
miRs-17-3p and 92	Colorectal	Plasma	50	90	Plasma levels decrease after surgery; differentiated colorectal from gastric cancer and normal individuals ⁷⁴
miRs-92a and 29a	Colorectal	Plasma	59	157	Plasma levels significantly higher in patients with advanced-stage cancer than healthy controls ⁷⁵
miRs-17-5p, 21, 106a and 106b	Gastric	Plasma	69	30	Plasma miRNA levels reflected the tumor miRNAs in most cases; miRNAs were significantly reduced in post-operative samples ⁷⁶
miR-195 and let7-a	Breast	Serum	44	83	Serum levels were decreased after tumor resection and correlated with nodal and estrogen-receptor status ⁷⁷
miRs-21, 210, 155, and 196a	Pancreas	Plasma	36	49	Plasma levels discriminate patients from healthy controls ⁷⁸
miR-210	Pancreas	Plasma	25	22	Plasma levels were significantly elevated in two independent patient cohorts ⁷⁹
miR-500	Liver	Serum	40	40	Increased levels found in patients with hepatocellular carcinoma; miR-500 serum levels returned to normal after surgical treatment ⁸⁰
miR-206	Rhabdomyosarcoma	Serum	17	8	Serum levels of the muscle-specific miRNA miR-206 were significantly higher in patients with rhabdomyosarcoma tumors than in patients with other types of tumors or in the control group ⁸¹
miR-184	Tongue	Serum	20	20	Serum levels were significantly reduced after surgical removal of the primary tumors ⁸²
miR-92a	Acute leukemia	Plasma	20	20	Decreased levels in plasma samples of acute leukemia patients ⁸⁴
miRs-125a and 200a	Oral squamous-cell	Saliva	50	50	Lower levels in the saliva of patients than control subjects ⁸⁶
miR-31	Oral squamous-cell	Plasma Saliva	21 8	43 9	Increased levels in patients compared with controls; level in most patients declined after surgery ⁸⁷
miRs-126, 152 and 182	Bladder	Urine	9	47	Increased levels in patients compared with controls ⁸⁸
miR-141	Colorectal	Plasma	—	102	High levels were associated with poor prognosis ¹²³

Tabella 1.7 mostrante i microRNA identificati in fluidi biologici correlati a diversi stadi patologici o fisiologici [81].

Mitchell ha dimostrato che i livelli del microRNA-141 risultano essere più alti nei pazienti affetti da cancro alla prostata rispetto ai controlli e questo risultato è stato messo in relazione con i valori dell'antigene prostatico specifico PSA, che aumenta sensibilmente e specificatamente nell'insorgenza del tumore alla prostata, ciò ha reso ancora più interessante il potenziale utilizzo di questa molecola in campo clinico [71].

Uno dei vantaggi dei microRNA circolanti è che sono stabili nei campioni di siero e di plasma, in quanto protetti dall'attività delle *RNase* e sono resistenti a diversi insulti esterni, quali cicli multipli di congelamento-scongelo, bollitura, condizioni di pH estreme, e conservazione prolungata [71];[75];[82]; sono inoltre facilmente accessibili quindi possono essere ottenuti mediante metodi non invasivi, i loro livelli di espressione sono

facilmente determinabili attraverso immediati metodi di quantificazione, ed infine in diversi studi è stato riscontrato, che cambiamenti dei livelli di espressione dei miRNA circolanti sono correlati a differenti condizioni fisiologiche e patologiche, tutto ciò li rende dei buoni candidati come biomarcatori molecolari di patologie [72];[78].

Diverse ipotesi sono state proposte al fine di chiarire l'origine, la funzione e la causa della stabilità dei miRNA circolanti. Una delle prime teorie suggeriva che i microRNA circolanti fossero legati al DNA, ciò li rendeva immuni all'azione di *RNAse* e *DNAse*, anche se successive scoperte, dimostrarono che in realtà i microRNA circolanti erano immuni alla degradazione ma non erano legati a DNA, bensì a complessi lipidici [83]. Mitchell dimostrò che i microRNAs circolanti sono protetti dall'attività *RNAsica*; se si aggiungono infatti a plasma o siero microRNA sintetici questi vengono immediatamente degradati, ciò lascerebbe ipotizzare che i microRNA sierici risultino essere insensibili all'azione delle *RNAse* in quanto veicolati da qualcosa che ne garantirebbe la protezione [71].

Recenti studi hanno portato ad ipotizzare che i microRNA nella forma matura legata al complesso del RISC vengano secreti all'interno di diversi tipi di vescicole membranose che comprendono gli esosomi (50-100 nm), le microparticelle (>100nm) ed i corpi apoptotici (**figura 1.14**); Valadi è stato tra i primi a dimostrare che vescicole esosomiali di uomo e topo contengono microRNAs che possono essere scambiati con cellule riceventi; successivamente un gran numero di ricercatori ha dimostrato come queste vescicole possono essere rilasciate sui tessuti bersaglio e i microRNAs in esse contenuti ricoprire funzioni biologiche [84].

Gli esosomi sono vescicole membranose-lipoproteiche di origine endofitica che mediano la comunicazione intercellulare grazie all'espressione di specifici recettori di superficie e al contenuto di miRNA. I miRNA inglobati all'interno degli esosomi vengono trasportati a livello di cellule riceventi dove possono regolare negativamente l'espressione genica mediante gli stessi meccanismi dei miRNA cellulari [82]. Altri studi hanno dimostrato che una porzione significativa dei miRNA circolanti sono liberi da vescicole

membranose e complessati ad *RNA binding protein*, che potrebbero avere un ruolo protettivo nei confronti della degradazione, come ad esempio la proteina NPM1 o la proteina Argonata2; si è dimostrato anche che le lipoproteine ad alta densità e le lipoproteine a bassa densità sono in grado di trasportare i miRNA nel plasma verso cellule riceventi [81];[82].

Si ritiene che i miRNA circolanti siano rilasciati da cellule appartenenti a tessuti colpiti da diverse patologie, da cellule ematiche e da cellule tumorali e recenti ipotesi li vedono protagonisti di una vera e propria azione paracrina tra cellula donatrice e ricevente, meccanismo accomunabile a molecole definite ormoni; dunque questo lascerebbe ipotizzare che il livello fisiologico dei microRNA circolanti potrebbe variare in relazione allo stato fisiologico o patologico dell'individuo individuandone un preciso sistema di comunicazione tra le varie cellule dell'organismo. Altri ricercatori ipotizzano uno scambio di mRNA e microRNA e proteine che possono essere trasferiti grazie a *signaling* esosomiale nel SNC [77];[81].

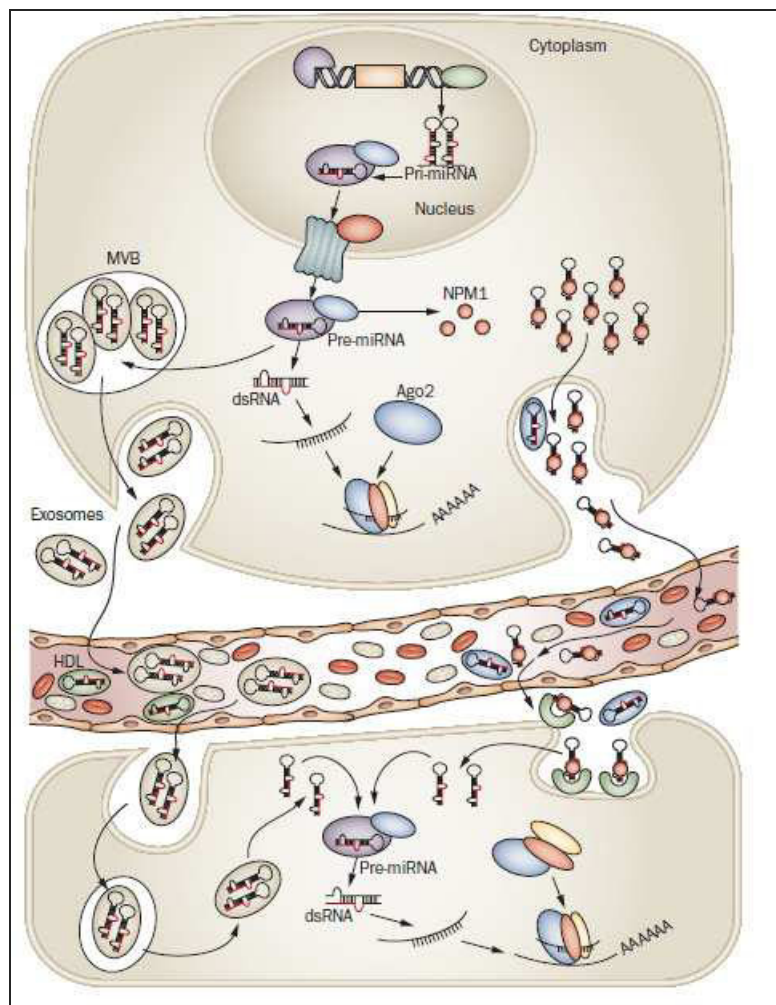


Figura 1.14 mostrante la pathway in cui i microRNAs esosomiali sono generati nel plasma. Dopo il completamento del primo step nucleare del processo biogenetico, già precedentemente discusso, il pre-microRNA potrà legarsi alle *multivesicular bodies (MVB)* e successivamente associarsi agli esosomi. Dopo la fusione con la membrana plasmatica le *multivesicular bodies (MVB)* sono in grado di rilasciare gli esosomi nei compartimenti circolanti e nel sangue; questi esosomi sono in grado di rilasciare il loro contenuto in RNA da una cellula donatore ad una cellula ricevente grazie ad endocitosi mediata da recettore. Nella cellula ricevente i microRNA esosomiali possono essere processati dall'enzima Dicer ottenendo il miRNA maturo che verrà caricato nel RISC espletando infine la sua funzione biologica. Tuttavia è ancora oggetto di studi, come il pre-miRNA riesca a legarsi alle *MVB*. Un'altra teoria vede i microRNA associarsi a proteine come NPM1 o Ago2 o legati a lipoproteine ad alta densità *High-density-lipoprotein* per essere veicolate nel circolo sanguigno.

[81]

Un altro interrogativo che si sono posti i ricercatori è se oltre al loro potenziale uso in campo diagnostico, queste piccole molecole potrebbero essere usate in terapia clinica. Sono stati effettuati solo studi su topi sul miR-122 che sembrano essere molto promettenti: l'iniezione endovenosa di anti-miR-122 nel topo adulto determina un abbassamento dei livelli di colesterolo

plasmatico, aumento dell'ossidazione degli acidi grassi epatici e diminuzione della produzione di acidi grassi e colesterolo a livello del fegato [81]. I microRNA circolanti possono essere degli indicatori di risposta a terapie farmacologiche, per esempio è stato dimostrato che aumentati livelli sierici del miR-21 sono indice di chemioresistenza al docetaxel chemioterapico d'elezione nel trattamento del tumore alla prostata [81].

1.7.1 microRNA CIRCOLANTI E PATOLOGIE DEL SNC

Come precedentemente accennato la letteratura degli ultimi anni si è concentrata sul ruolo che i microRNA ricoprono nello sviluppo, nella morfogenesi e nella differenziazione del sistema nervoso e sulle patologie che lo intessano. Una vasta gamma di ricerche, si sta concentrando al giorno d'oggi sull'individuazione di microRNA come potenziali *biomarkers* da fluidi biologici a scopo diagnostico o prognostico di malattie neurodegenerative e psichiatriche ciò anche considerando che i microRNA a differenza delle proteine sono in grado di superare la barriera emato-encefalica ed essere rilevati nei fluidi biologici [85]. Sebbene l'organo, il tessuto o le cellule di origine di questi microRNA detectati sono difficili da determinare *in vivo*, tuttavia recenti studi dimostrano che questi microRNA non si originano sempre da cellule del sangue o da cellule con cui il fluido biologico verrebbe a contatto, ma che possono essere rilasciati dai tessuti in cui è in corso la malattia [85]. La presenza di microRNA circolanti nel Fluido Cerebro-Spinale (CSF) di individui affetti da malattia di Alzheimer (AD) è stata ampiamente dimostrata tra questi anche il miR-9, il cui coinvolgimento in campo neurologico è già stato discusso [68]; il miR-21 invece conosciuto per il suo dimostrato coinvolgimento nel GBM [86] è stato rilevato anche nel CSF di pazienti affetti da questo tumore [85]. Siero e plasma anch'essi offrono una fonte di potenziali *markers* non invasivi semplici da reperire e facili da testare e molte ricerche si sono concentrate soprattutto nell'identificazione di microRNA circolanti negli stadi delle malattie neurologiche, quando sono ancora asintomatiche, come il

MCI disturbo cognitivo lieve, stato di transizione tra l'invecchiamento normale e la demenza senile e fattore di rischio per la malattia di Alzheimer [85]. Molti studi riguardanti i microRNA circolanti sono stati condotti in relazione alle patologie neurologiche a carattere neurodegenerativo, poco esplorato invece è il vasto campo della neuropsichiatria come testimonia invece il numero un po' più ridotto di referenze bibliografiche [85].

1.7.2 QUANTIFICAZIONE DEI microRNA circolanti: approccio metodologico

La possibilità di usare microRNAs circolanti, in quanto stabili e facili da poter rilevare nei fluidi biologici, come potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce e la risposta a terapia sta facendo sempre più avvicinare queste piccole molecole nello scenario dello screening clinico; ciò naturalmente ha portato all'affermarsi di sempre nuovi e più attendibili tecniche per poterli rilevare in modo sensibile e specifico. Il materiale di partenza usato per isolare queste piccole molecole può essere siero, plasma, esosomi [77] oppure sangue intero [87]. Naturalmente la scelta sia del campione biologico di partenza che della metodologia da usare offrono all'operatore vantaggi e svantaggi e dunque va sempre valutata sulla base delle successive indagini analitiche.

Sia il plasma che il siero possono essere usati come materiale di partenza per quantificare i microRNA, diversi studi effettuati non hanno rilevato significative differenze in termini di espressione dei microRNAs estratti dal siero o plasma [71]. Uno dei principali problemi da affrontare durante la fase di estrazione degli *small RNA* da questi tessuti di partenza è la notevole quantità di proteine solubili che potrebbero interferire con le successive fasi di amplificazione tramite *QPCR* su cui si basa principalmente il metodo di quantificazione dei microRNAs circolanti [88]; secondo quanto riportato dalla corrente letteratura, due sono i sistemi maggiormente usati per ovviare a questo problema: accoppiare all'estrazione tramite

fenolo/cloroformio una fase di incubazione con *proteinase K*, oppure optare per un'estrazione basata su un principio di separazione tramite una molecola composta da fenolo e guanidina tiocinato [72];[89]. Un altro problema che può influire in fase pre-analitica è l'alto contenuto lipemico del campione, che può influenzare l'efficacia dell'estrazione, pertanto è sempre consigliato effettuare il prelievo lontano dai pasti e non tardare nelle fasi di processamento del campione; anche se tuttavia non vi sono dati in letteratura che dimostrano che questo possa influenzare l'attendibilità del risultato ottenuto successivamente [88].

Particolare interesse è stato rivolto agli effetti causati dall'emolisi in fase pre-analitica ed è stato dimostrato che questa altera il contenuto dei microRNAs sierici rendendo non attendibile il risultato in fase di analisi data l'attestata presenza di microRNA nei globuli rossi [90] [91]. Inoltre i microRNA sono stati individuati in altre cellule del sangue, per l'esattezza, 91 microRNA sono comuni a siero e cellule del sangue [75], questo potrebbe generare enormi problemi in fase sperimentale. Dunque è fondamentale che i controlli siano scelti in modo tale da escludere ogni tipo di patologia e il campione sia il più puro possibile da cellule contaminanti.

Fluidi biologici come siero, plasma, urine rappresentano il materiale di partenza di uso più comune in quanto facili da reperire e la cui procedura di estrazione e quantificazione risulta essere semplice ed immediata; un po' più complesso è il reclutamento di campioni come umor vitreo, liquido amniotico, liquido cerebro-spinale, ma tuttavia oltrepassato questo step la quantificazione tuttavia risulta essere anche in questi casi semplice e veloce [77]. La situazione è un po' diversa se si lavora con esosomi dove la procedura è molto più lunga e complessa anche se tuttavia viene preferita per le indagini di profiling che interessano i tumori [77].

RNA estratto da sangue intero(globuli bianchi e rossi) è stato invece usato per indagini di profiling sullo stroke e sclerosi multipla e leucemia [77]. Altro problema è la difficoltà di lettura, con strumenti tradizionali, della quantità di materiale estratto dai fluidi biologici, in quanto notevolmente bassa, e che secondo le correnti fonti necessita sempre di uno step di pre-

amplificazione in PCR, prima di effettuare l'effettiva analisi d'espressione, in tal modo da incrementare la quantità di partenza di cDNA totale. [72];[92].

Inoltre step successivi di centrifugazione del siero o plasma permettono una maggiore separazione di quest'ultimo da altri eventuali componenti cellulari, esosomi, e micro vescicole che comprometterebbero le analisi successive [93]

2. MATERIALI E METODI

2.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI

In questo studio sono stati reclutati **9** pazienti affetti dalla forma più grave di sindrome di Tourette ***TSS Tourette Syndrome Severe Phenotype***, **10** pazienti affetti da una forma più moderata della malattia ***TSM Tourette Syndrome Mild Phenotype***, e **3** soggetti sani ***Normal Control NC***. Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati studiati presso l'Unità di Neuropsichiatria Infantile dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Catania, coordinata dalla Prof.ssa Renata Rizzo e il reclutamento è avvenuto previo consenso informato dopo aver spiegato ai genitori di ogni soggetto le finalità le caratteristiche dello studio. La diagnosi è stata eseguita da neuropsichiatri in accordo con i criteri stabiliti nel ***DMSV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition***. Ogni paziente con TS è stato valutato da un punto di vista neuropsicologico mediante *the National Hospital Interview Schedule for Gilles de la Tourette Syndrome*) e la *Yale Global Tic Severity Rating Scale (YGTSS)* per valutare la severità dei sintomi. La presenza di sintomi di disturbi ossessivi compulsivi è stata valutata mediante *the Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (Y-BOCS)*. Mediante *the Youth Quality of Life Instrument-Research Version (YQOL-R)* è stata valutato il grado di disabilità nella vita quotidiana del paziente causato dalla malattia. Ai genitori è stata inoltre somministrata *the Child Behavior Checklist (CBCL)* per valutare un *range* di difficoltà comportamentali ed emozionali del paziente

2.2 PROCESSAMENTO DEI CAMPIONI

I pazienti così reclutati sono stati sottoposti ad un prelievo venoso al mattino e a digiuno in *vacutainer (BD Biosciences)* prive di EDTA e provviste

di gel separatore del siero. In accordo alle procedure correntemente annotate in letteratura [90] e di uso più comune tra le indagini di routine nei laboratori di analisi chimico-cliniche, ciascun *collection tube* pervenutoci è stato posto in termostato a 37°C per 15', in modo tale da favorire la naturale separazione del siero dalla restante componente corpuscolata; successivamente il prelievo è stato centrifugato a 4000 rpm a 4°C per 15' in **Beckman J2-21** e nuovamente ri-centrifugato a 5000 rpm, alle medesime condizioni di temperatura, per 10', al fine di eliminare eventuali detriti ed altri componenti cellulari che potrebbero influenzare le indagini molecolari successive [93].

Il siero così ottenuto è stato aliquotato in tubi da 1,5ml *RNAse free* e conservato a -80°C fino al momento del suo utilizzo.

2.3 LETTURA SPETTROFOTOMETRICA

In accordo alla letteratura corrente, [94] abbiamo effettuato un'analisi spettrale di tutti i campioni di siero opportunamente diluiti in PBS pH 7.4 ad una lunghezza d'onda (λ) di **414nm** identificando soltanto quei campioni di siero aventi una assorbanza (**A**)<**0.2**, in modo da verificare che non fosse avvenuta emolisi delle emazie. A questo punto i **9** pazienti *Tourette Syndrome Severe Phenotype TSS*, **3** controlli *Normal Control NC* sono stati raggruppati per ottenere infine **4** campioni *pool* totali rispettivamente **3** *pool* provenienti dai **TSS**, ed **1** dai **NC**, ciascun campione *pool* costituito a sua volta da tre singoli campioni di partenza; in dettaglio sono stati prelevati 150ul di siero da ogni campione di partenza secondo lo schema mostrato nelle **tabelle 2.1** sotto riportate.

Campione	Pool
TSS-1	1
TSS-2	
TSS-4	

Campione	Pool
TSS-8	2
TSS-9	
TSS-10	

Campione	Pool
TSS-12	3
TSS-13	
TSS-14	

Campione	Pool
NC-1	4
NC-2	
NC-3	

Tabelle 2.1: campioni TSS e i NC costituenti i 4 campioni pool sui quali verrà effettuato il *profiling* dei microRNA

2.4 ESTRAZIONE DELL'RNA DA CAMPIONI DI SIERO

Dal momento che in accordo alla letteratura corrente, [75] la frazione di RNA predominante nel siero è quella degli *small RNA*, abbiamo optato per l'utilizzo di un kit specifico in grado di isolare RNA della lunghezza di 22-25 nucleotidi presente nel fluido biologico di nostro interesse. L'RNA è stato estratto utilizzando un protocollo supplementare, partendo da un volume di 400ul di campione,[95] che consente l'estrazione dei microRNA da siero o da plasma tramite lisi utilizzando *Qiagen miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen, GmbH, Hilden, Germany*) in accordo alla letteratura corrente [88]. Come mostrato

nella **figura 2.1** sottostante, il protocollo prevede un unico step di lisi, rimozione di eventuali detriti, inibizione di DNA e proteine eventualmente presenti nel campione, grazie al *QIAzol Lysis Reagent*, soluzione monofasica composta da fenolo e guanidina tiocinato. In accordo al protocollo, prima della formazione delle tre fasi è stato aggiunto miScript miRNA Mimic 5nM, **Ath-miR-159a**, che verrà usato come normalizzatore durante la nostra analisi compensando la variabilità durante la fase di estrazione e la presenza di eventuali inibitori della PCR.

L'RNA verrà isolato tramite aggiunta di *ETOH* 100% alla fase acquosa e successivo caricamento in *RNeasy Mini spin column*, per essere definitivamente poi eluito e raccolto dopo una serie successiva di lavaggi

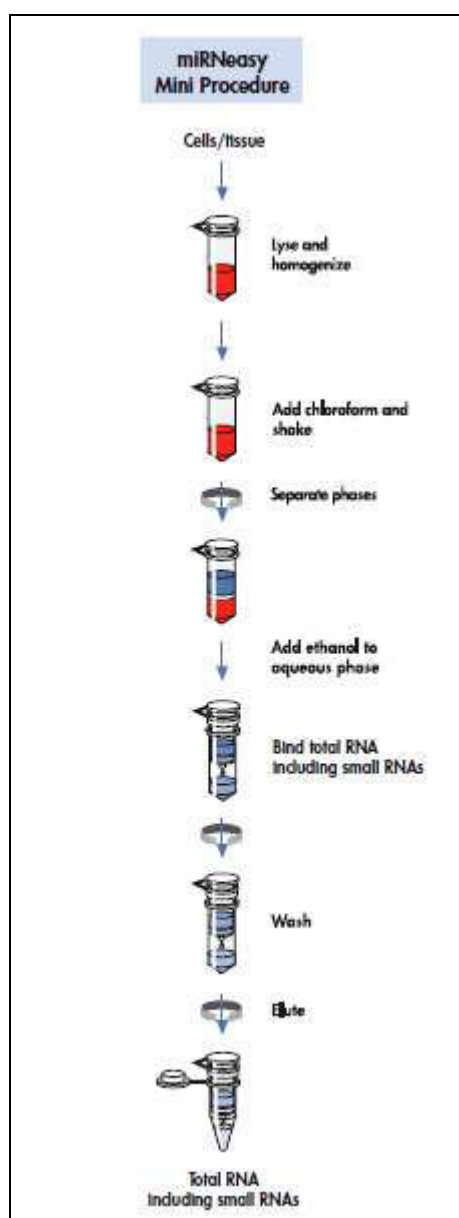


Figura 2.1: fasi del protocollo sperimentale di estrazione tramite *Qiagen miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen, GmbH, Hilden, Germany*).

Una volta completata la procedura di estrazione dell'RNA 10ul di questo prodotto è stato successivamente quantificato tramite spettrofotometro *GeneQuantpro* (*Amersham Pharmacia Biotech*).

2.5 REAL TIME PCR

La tecnica *Real Time* PCR, detta anche PCR quantitativa, o più brevemente qPCR, è una metodica che permette di amplificare e, contemporaneamente, quantificare in modo simultaneo un frammento genico. La *Real Time* PCR è conosciuta per lo studio quantitativo dell'espressione genica, e come tale necessita della retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA. In una reazione tipica il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione ed il numero di copie del frammento di partenza, dunque, aumenta esponenzialmente; trattandosi di un meccanismo che si ripete ciclicamente, è caratterizzato da un tasso di crescita geometrica o esponenziale [96]. A differenza della *end-point* PCR, tecnica essenzialmente qualitativa con la quale i risultati vengono rilevati solo alla fine del processo di amplificazione, la *Real Time* PCR misura l'amplificazione in tempo reale, ciclo dopo ciclo, e permette di conoscere e valutare il risultato di amplificazione di un gene durante la fase esponenziale della PCR. In questa fase infatti l'efficacia di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione e il prodotto di reazione risulta, quindi, proporzionale al *template* iniziale; affinché abbastanza prodotto sia rilevabile sono necessari parecchi cicli, pertanto il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide, nei cicli finali i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto della curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente è chiamato ciclo soglia al quale corrisponde un ben preciso valore (Ct). Il valore di Ct (il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente) è detto valore soglia ed è un parametro caratteristico di ogni curva di amplificazione. I valori di Ct dipendono dalla quantità iniziale di DNA; se la concentrazione iniziale di materiale genetico è molto bassa la curva di amplificazione, e quindi il valore di Ct, apparirà spostata verso destra. In pratica, se la quantità di DNA è bassa, occorreranno molti più cicli per raggiungere un valore soglia prefissato (**figura 2.2**) [96].

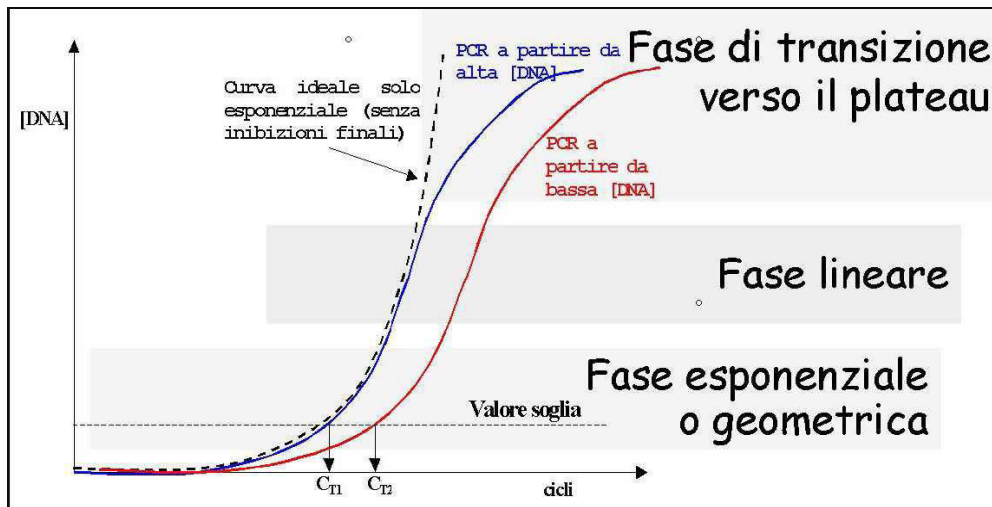


Figura 2.2: curva di amplificazione di una PCR[96].

2.5.1 REAL TIME PCR: Quantificazione tramite le sonde *TaqMan*

Le sonde ad idrolisi, come la sonda *TaqMan*, sono generalmente le più utilizzate e descritte in letteratura per applicazioni di *QPCR*. In questo caso la chimica di reazione prevede un terzo oligonucleotide che prende il nome di “sonda” in aggiunta ai *primers* della reazione di *PCR*. Al 5' della sonda è aggiunto un fluorocromo, *reporter* (in genere *FAM*), ed un *quencher* (rappresentato dal *TAMRA*) è invece aggiunto al 3'. Fino a quando le due molecole (*reporter* e *quencher*) sono mantenute molto vicine l'una all'altra, la fluorescenza del *reporter* è spenta e non è rilevata alcuna fluorescenza alla lunghezza d'onda di emissione del *reporter*. La sonda è disegnata per appaiarsi ad un filamento della sequenza *target* appena più a valle di uno dei *primers*. Poiché la polimerasi amplifica dal *primer*, il prodotto di polimerizzazione incontrerà il 5' terminale della sonda. La *Taq* DNA polimerasi, dal momento che presenta attività nucleasica 5'-3', incontrando la sonda la rimuove e la degrada a partire dal 5' terminale, rilasciando il *reporter* nella soluzione. Dopo la separazione di *reporter* e *quencher*, è possibile rilevare la fluorescenza del *reporter*. L'utilizzo di sonde *Taq-man* rispetto alle molecole chimiche

aspecifiche, quale il colorante *SYBR Green* risulta essere molto più sensibile in quanto in assenza di una sequenza *target* specifica nella reazione, la sonda fluorescente non si ibridizza ma rimane in soluzione e la sua fluorescenza non può essere rilevata (**figura 2.3**) [97].

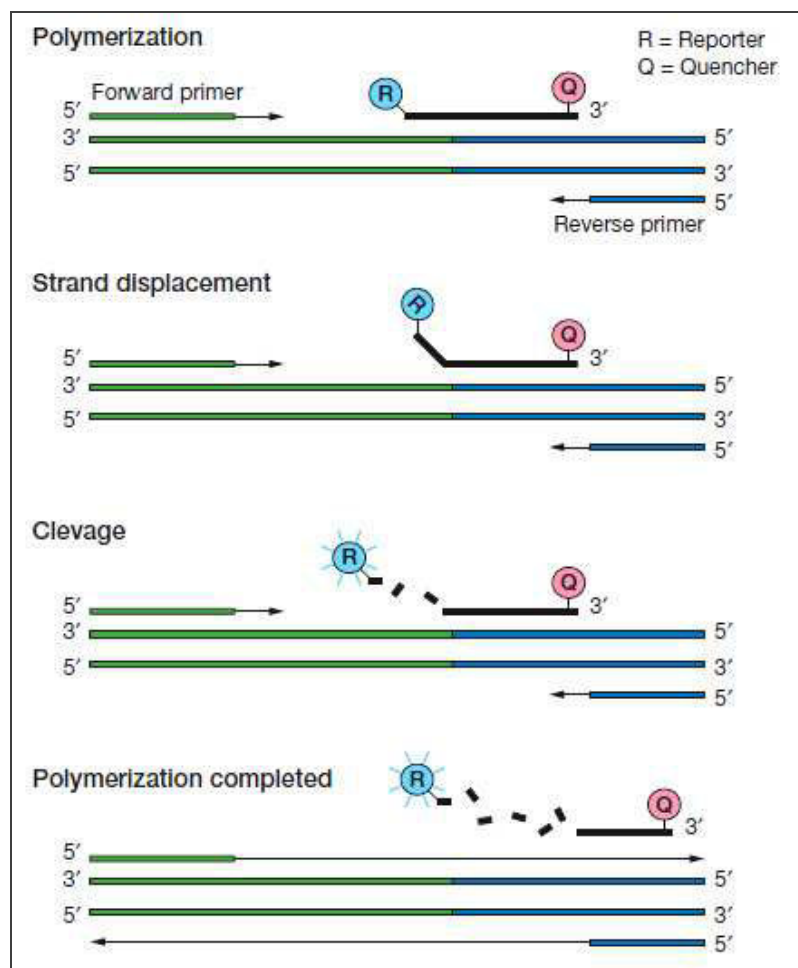


Figura 2.3. Meccanismo molecolare della sonda *Taqman*.

2.5.2 REAL TIME PCR: Metodi di quantificazione

Esistono due metodologie di quantificazione: assoluta e relativa. Quella maggiormente usata è la relativa poiché è utilizzata per analizzare cambiamenti nell'espressione di un gene in un dato campione in relazione ad un campione di riferimento (definito calibratore)[98].

Dati i due campioni è possibile stimare il rapporto delle quantità iniziali secondo la formula:

- $\Delta Ct = Ct \text{ campione} - Ct \text{ normalizzatore}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ calibratore}$
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2.6 REAL TIME PCR: Analisi tramite TaqMan® Low Density Array (TLDA)

Per l'analisi del trascrittoma di 754 microRNA nel siero abbiamo sfruttato la tecnologia delle **TaqMan® Low Density Array (TLDA)** (*Applied Biosystem*, Foster City, CA) (**figura 2.4**), che prevede l'uso delle *micro-fluidic cards* da 384 pozzetti su cui è possibile effettuare fino a 384 reazioni simultanee di Real-Time PCR sfruttando la tecnologia delle sonde TaqMan.

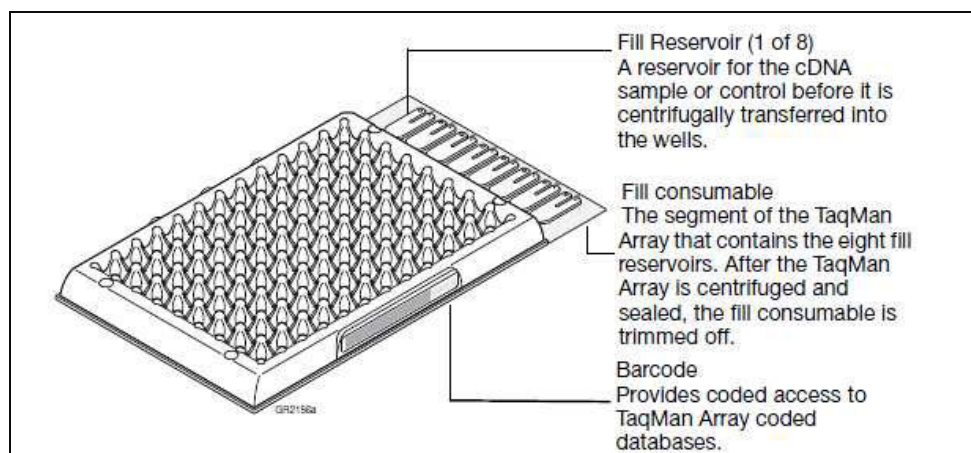


Figura 2.4: *TaqMan® Low Density Array (TLDA)*

Nel nostro esperimento, abbiamo utilizzato il sistema **TaqMan® Human MicroRNA Array v3.0 (Applied Biosystems)**, che consente la quantificazione simultanea di 754 miRNA umani tramite la metodica *TaqMan® MicroRNA Assays*. I microRNA sono distribuiti in 2 tipi di *cards*: A e B. Le *cards* del pannello A contengono 377 microRNA di ampio interesse

scientifico perché aventi funzione nota e/o ampiamente espressi; le *cards* del pannello B contengono 288 microRNA rari e meno studiati perché hanno funzione sconosciuta o sono poco espressi. Nelle *cards* sono inoltre inclusi i controlli endogeni: nella card A ci sono 3 tipi di controlli (4 replicati per il saggio U6, ed un singolo saggio di controllo rispettivamente per RNU44 ed RNU48); nella card B ci sono 6 controlli (U6, U48, U44, U46, U24 e U6B ognuno in quadruplicato); anche se tuttavia il normalizzatore da noi usato per la normalizzazione dei dati è stato Ath-159-a, presente in entrambe le *cards* e aggiunto in fase di estrazione. Tutti i saggi sono stati pre-caricati in ciascuna delle *micro-fluidic card* costituita da otto *lanes* con i rispettivi canali di caricamento, ognuno dei quali è connesso a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde. Di seguito in **figura 2.5** è mostrato il *workflow* dell'esperimento da effettuare tramite *TaqMan® Low Density Array (TLDA)*

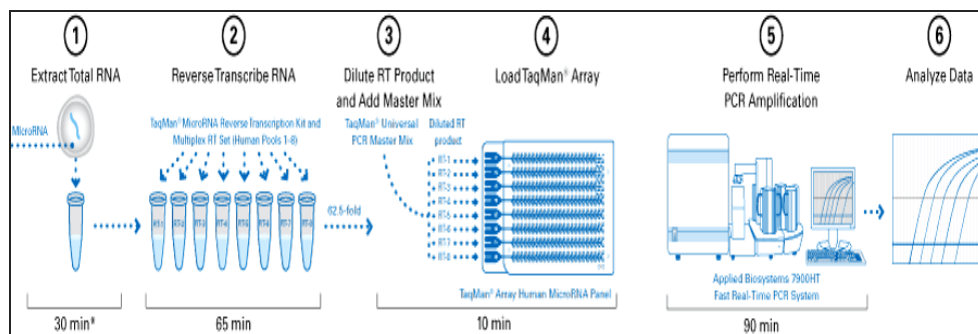


Figura 2.5: *Workflow* dell'esperimento di *profiling*

2.6.1 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE MEGAPLEX

Abbiamo effettuato la retrotrascrizione di circa 33 ng di RNA precedentemente estratto dai nostri campioni *pool* utilizzando *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* ed i *primers* per l'*RT Megaplex™ RT Primers, Human Pool A e Pool B* (Applied Biosystems), un *pool primers forward e reverse* gene-specifici in grado di effettuare nel complesso l'RT dei microRNA contenuti in ogni pannello. La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Stage	Temp	Time
Cycle (40 Cycles)	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 sec
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

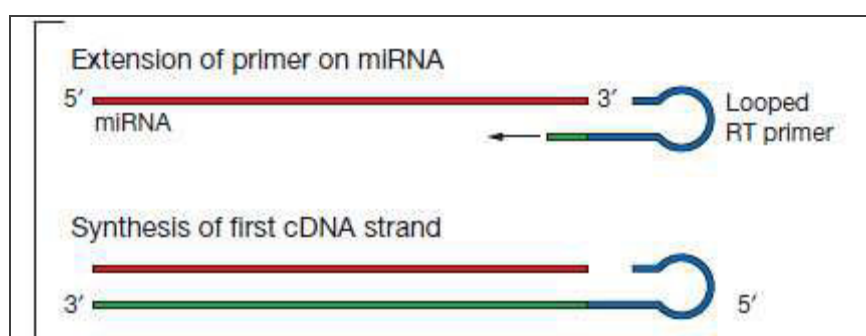


Figura 2.6: Reazione di retrotrascrizione *Megaplex*

2.6.2 REAZIONE DI PREAMPLIFICAZIONE

A questo punto 3.5 μ l di prodotto RT sono stati pre-amplificati utilizzando *TaqMan® PreAmpMaster Mix, 2X* e *Megaplex PreAmp Primers*. La reazione di preamplificazione consente di incrementare la quantità di cDNA disponibile per l'ultima tappa di analisi dell'espressione genica. La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Stage	Temp	Time
Hold	95 °C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2 min
Cycle (12 Cycles)	95 °C	15 sec
	60 °C	4 min
Hold [†]	99.9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

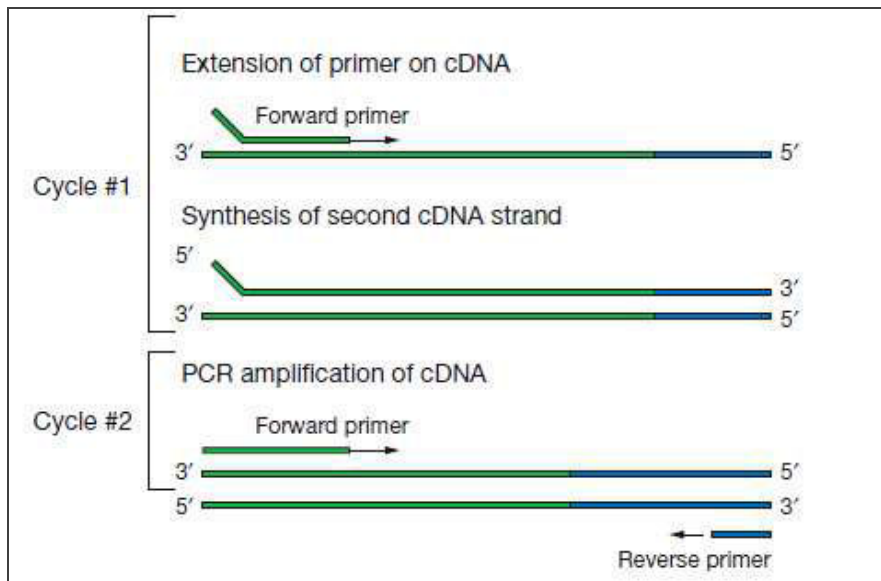


Figura 2.7: Reazione di Preamplificazione *PreAmp*

2.6.3 REAZIONE DI REAL TIME PCR

I campioni di cDNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi del trascrittoma relativamente ai miRNA di interesse in *Real Time PCR* utilizzando *TaqMan Universal Master Mix2 X* e *TaqMan MicroRNA Array*.

Durante questo step, la DNA polimerasi presente nella *TaqMan Universal PCR Master Mix* amplifica i cDNA *target* preamplificati utilizzando *primers* sequenza-specifici e *probe* che si trovano a livello della *TaqMan microRNA Array*. La presenza del *target* in *Real Time* è rilevata attraverso il clivaggio della sonda *TaqMan* ad opera dell'attività esonucleasica 5'-3' della polimerasi. Durante questo step i campioni sono stati diluiti in H₂O, quindi miscelati con *TaqMan Universal PCR Master Mix* e caricati negli otto canali delle *TaqMan® Human MicroRNA Array v3.0* in accordo al protocollo vigente. La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* alle seguenti condizioni:

Step	AmpliTaq Gold Activation	PCR	
	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Temperature	95 °C	95 °C	60 °C
Time	10 min	15 sec	1 min

2.6.4 ANALISI DEI DATI

I relativi livelli di espressione di ogni gene microRNA sono stati analizzati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, attraverso *RQ Manager 1.2 software* (*Applied Biosystems*).

La normalizzazione dei dati è stata effettuata utilizzando come controlli endogeni i valori di Ct media e mediana di ciascuna cards ed ath-159a, presente nei nostri array e precedentemente aggiunto in ogni campione, in fase di estrazione dell'RNA.

Il calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ viene effettuato in accordo alla seguente formula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{calibratore}}$$

Il ΔCt del campione, è la differenza tra valore di Ct del gene *target* e il valore di Ct del controllo endogeno (media, mediana ed Ath-159a per ciascuna card A e B) per ciascun campione **TSS** in analisi. Il ΔCt del calibratore è invece il valore Ct del gene *target* e il valore di Ct del controllo endogeno nel controllo in analisi. I valori di Ct *undetermined* sono stati considerati uguali a 37. Per identificare i geni differenzialmente espressi, abbiamo utilizzato un *fold change* stringente ($fc \leq 0.33$ per la *downregulation* e un $fc \geq 3$ per l'*upregulation*, al fine di considerare un gene come sovra- oppure sottoespresso. I dati di espressione sono stati visualizzati attraverso il *software MeV4.8.1 (Multi Experiment Viewer)*.

2.7 VALIDAZIONE TRAMITE SAGGIO SINGOLO IN TAQMAN ASSAY

Al fine di validare i risultati precedentemente ottenuti tramite l'analisi *TaqMan®Low Density Array*, abbiamo effettuato l'estrazione dei microRNAs tramite **Qiagen miRNeasy Mini Kit** in accordo al protocollo supplementare già descritto [95] questa volta non partendo da *pool* di campioni di siero ma dal siero dei **9** singoli pazienti **TSS Tourette Syndrome Severe Phenotype TSS**, e dei **3** controlli *Normal Control NC*. A questo punto senza passare alla quantificazione spettrofotometrica l'RNA precedentemente estratto è stato retrotrascritto tramite *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*. Questo tipo di reazione prevede due step: la retrotrascrizione di un determinato microRNA mediante l'utilizzo dei *primer* a *stem-loop* microRNA specifici, e l'amplificazione del cDNA ottenuto mediante Real Time PCR. La struttura a *stem-loop* rende il *primer* specifico soltanto per la forma matura del microRNA target e determina la formazione di una struttura chimerica RT primer/microRNA maturo che estende l'estremità 3' del microRNA; in questo modo viene risolto il problema fondamentale della quantificazione dei microRNA dato dalla lunghezza limitata dei microRNA maturi, il prodotto di RT più lungo costituisce infatti un *template* adatto alla *Real Time TaqMan assay*.

La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Step	Time	Temperature
Hold	30 minutes	16 °C
Hold	30 minutes	42 °C
Hold	5 minutes	85 °C
Hold	∞	4

Materiali e Metodi

Una volta effettuata la retrotrascrizione dei microRNA il cDNA così ottenuto è stato caricato su piastre *microAmp Fast optical 96 well* (*Applied Biosystems*) e amplificato in *7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) grazie *TaqMan MicroRNA Assay* e *TaqMan 2X universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*) in accordo al protocollo vigente. Durante questa reazione l'enzima *AmpliTaq® Gold DNA polymerase* amplifica il cDNA target precedentemente sintetizzato a partire dall'RNA totale, usando dei *primers* sequenza-specifica.

Step	OptionalAmpErase® UNG activity*	Enzyme Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
			Denature	Annea/extend
Temperature	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Time	2 minutes	10 minutes	15 seconds	60 seconds

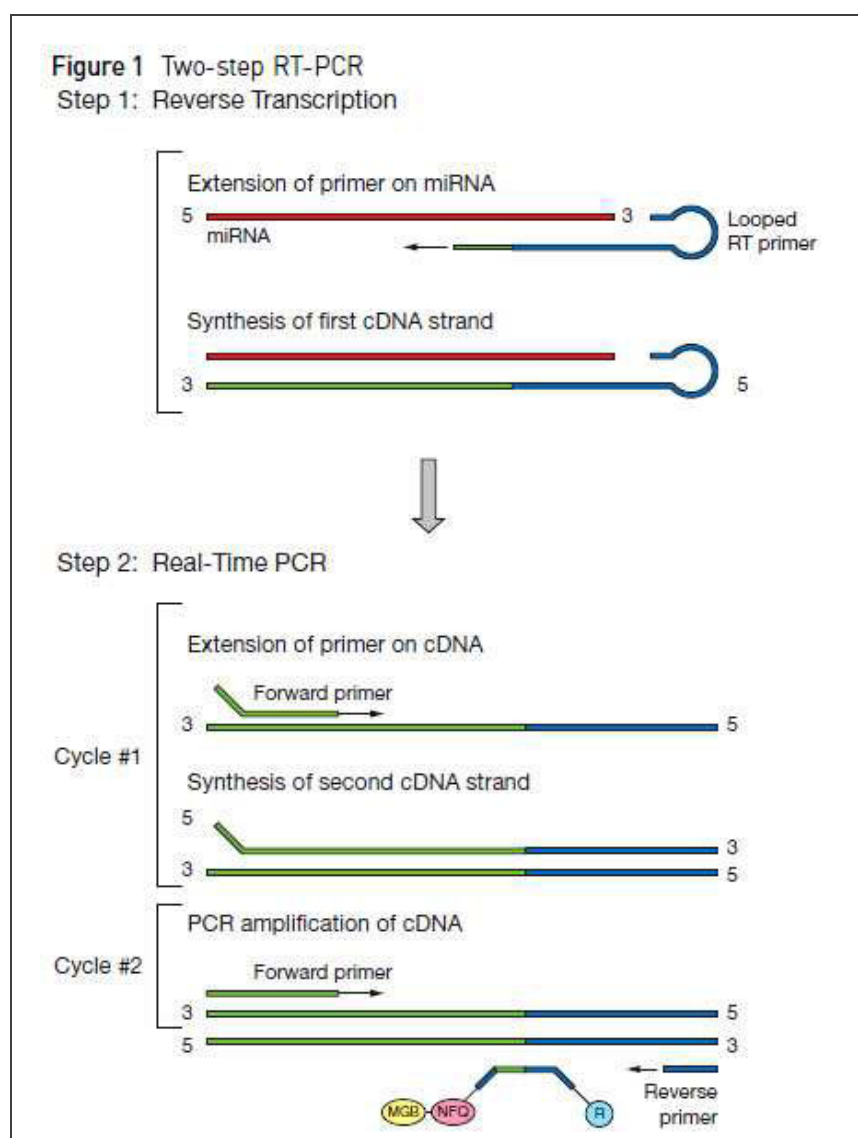


Figura 2.8: Sono mostrati i due *steps* per la reazione di quantificazione dei microRNA maturi.

2.7.1 ANALISI DEI DATI

Anche in questo caso i relativi livelli di espressione di ogni gene microRNA sono stati analizzati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, attraverso *RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems)*. La normalizzazione dei dati è stata effettuata utilizzando come controllo endogeno *Ath-159a* precedentemente aggiunto in fase di estrazione dell'RNA ed i valori di C_t *undetermined* sono stati considerati uguali a 40. I test statistici dei singoli saggi

in TaqMan assay sono stati effettuati tramite il tool ***SOCR Statistics Online Computational Resource*** <http://www.socr.ucla.edu/SOCR.html> che raccoglie tutti i più comuni test statistici. Nell' apposita sezione ***Analyses***, abbiamo sottomesso i valori dei ΔC_t dei 9 pazienti e 3 controlli effettuando un ***Two Independent Sample unpooled T-Test*** ed un ***Two Independent Sample unpooled Wilcoxon Rank Sum Test*** impostando una valore di **P-value** < **0.05** per la significatività dei nostri risultati.

2.8 ANALISI TRAMITE SAGGIO SINGOLO IN TAQMAN ASSAY DEI TSM *TOURETTE SYNDROME MILD PHENOTYPE*

Abbiamo effettuato l'estrazione dei microRNAs dal siero di **10** pazienti ***TSM Tourette Mild Phenotype***, tramite **Qiagen miRNeasy Mini Kit**; l'RNA estratto è stato retrotrascritto tramite *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* e amplificato in *7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystem, Foster City, CA*). I relativi livelli di espressione di ogni gene microRNA sono stati analizzati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, attraverso *RQ Manager 1.2 software* (*Applied Biosystems*). I dati da noi ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica con ***SOCR Statistics Online Computational Resource*** effettuando un ***Two Independent Sample unpooled T-Test*** ed un ***Two Independent Sample unpooled Wilcoxon Rank Sum Test*** impostando una valore di **P-value** < **0.05** per la significatività dei nostri risultati. Sono stati effettuati due tipi di confronti statistici, quello tra i **10** pazienti TSM ed i **3** controlli e quello tra i **9** pazienti TSS ed i **10** pazienti TSM.

2.9 PREDIZIONE E STUDIO DEI *TARGETS* PREDETTI E COSTRUZIONE DELLA NETWORK BIOLOGICA

La ricerca dei *targets* predetti dei microRNA differenzialmente espressi DE è stata effettuata utilizzando una combinazione di diversi database di predizione: **miRecords** (<http://mirecords.biolead.org/>) importante *tool* bioinformatico per lo studio delle interazioni *miRNA-target* e **starBase** (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) database che si avvale di esperimenti di immunoprecipitazione con proteine Argonauta (*CLIP-seq*). Per migliorare l'attendibilità della nostra predizione abbiamo utilizzato i dati di anticorrelazione dell'espressione tra microRNA e *targets* predetti ottenuti mediante l'utilizzo di **miRGator 3.0** (<http://mirgator.kobic.re.kr>) selezionando soltanto i geni *targets* aventi un *Cor_val*>0. Per i *targets* validati abbiamo consultato **miRTarBase** (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). Tramite il *tool* **DAVID (6.7)** (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) è stata effettuata un'indagine di espressione a livello tissutale mentre la creazione della *network* è stata effettuata sfruttando il software **Cytoscape v2.8.3**, la ricerca dei dati di interazione è stata condotta mediante il *plugin* **MiMI di Cytoscape**; l'analisi di centralità dei nodi della *network* è stata fatta utilizzando il *plugin* **CentiScape v1.21**. I parametri presi in considerazione per lo studio della centralità dei nodi sono stati: *Betweenness Centrality*, *Closeness Centrality*, *Node Degree* e *Stress*. Sulla *network* è stata effettuata l'analisi di *Gene Ontology* mediante il *plugin* **Bingo v2.44 di Cytoscape**. (Parametri. Statistical test: *Hypergeometric test*; multiple testing correction: *Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction*; significance level: 0.05; Reference Set: *Whole annotation*; Ontology file: *GO_Biological_Process*).

3. RISULTATI

3.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI TSS (TOURETTE SYNDROME SEVERE PHENOTYPE)

I pazienti **TSS** reclutati dall'Unità di Neuropsichiatria Infantile coordinata dalla Prof.ssa Renata Rizzo, dell'azienda ospedaliera Policlinico di Catania sono mostrati nelle **tabelle 3.1** sottostante: in totale 9 maschi 8 di etnia caucasica ed uno di etnia africana di età compresa tra 10-15 anni e con una comparsa della sintomatologia clinica tra i 3-9 anni di età e mostranti comorbidità con **ADHD** (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) e **OCD** (*Obsessive Compulsive Disorder*). La severità del fenotipo clinico è stata quantificata in accordo al *clinical global impression -Severity (CGI-S)* e la *Yale Global Tic Severity Scale* in accordo ai criteri esposti nel **DMS-V**.

CGI-S	5.78 (0.97)
QoL	
Total	257.3 (5)
Self	83.6 (22.2)
Rel	82.5 (20.3)
Env	70.4 (10.3)
Gen	24.6 (5.6)
YGTSS	
Severity Score	32.44 (5.3)
Impairment	33.3 (5)
YBOCS	20.7 (7.05)
CBCL	
Total	83 (7.8)
Int	22 (6.5)
Ext	59 (5.5)

Risultati

Sex M:F	9:0
Mean age	13.22 (1.71)
Mean age at onset	5.78 (1.85)
Ethnicity	
Caucasian	8
African	1
Clinical Diagnosis (%)	
Pure TS	0
TS+ADHD	22.2
TS+OCD	33.3
TS+ADHD+OCD	44.5

Tabelle 3.1: dati clinici dei TSS

CGI-S: Clinical Global Impression-Severity

QoL: Quality of life; Rel: relationship; Env: environment; Gen: general

YGTSS: Yale Global Tic Severity Scale

YBOCS: Yale Brown Obsessive Compulsive Scale

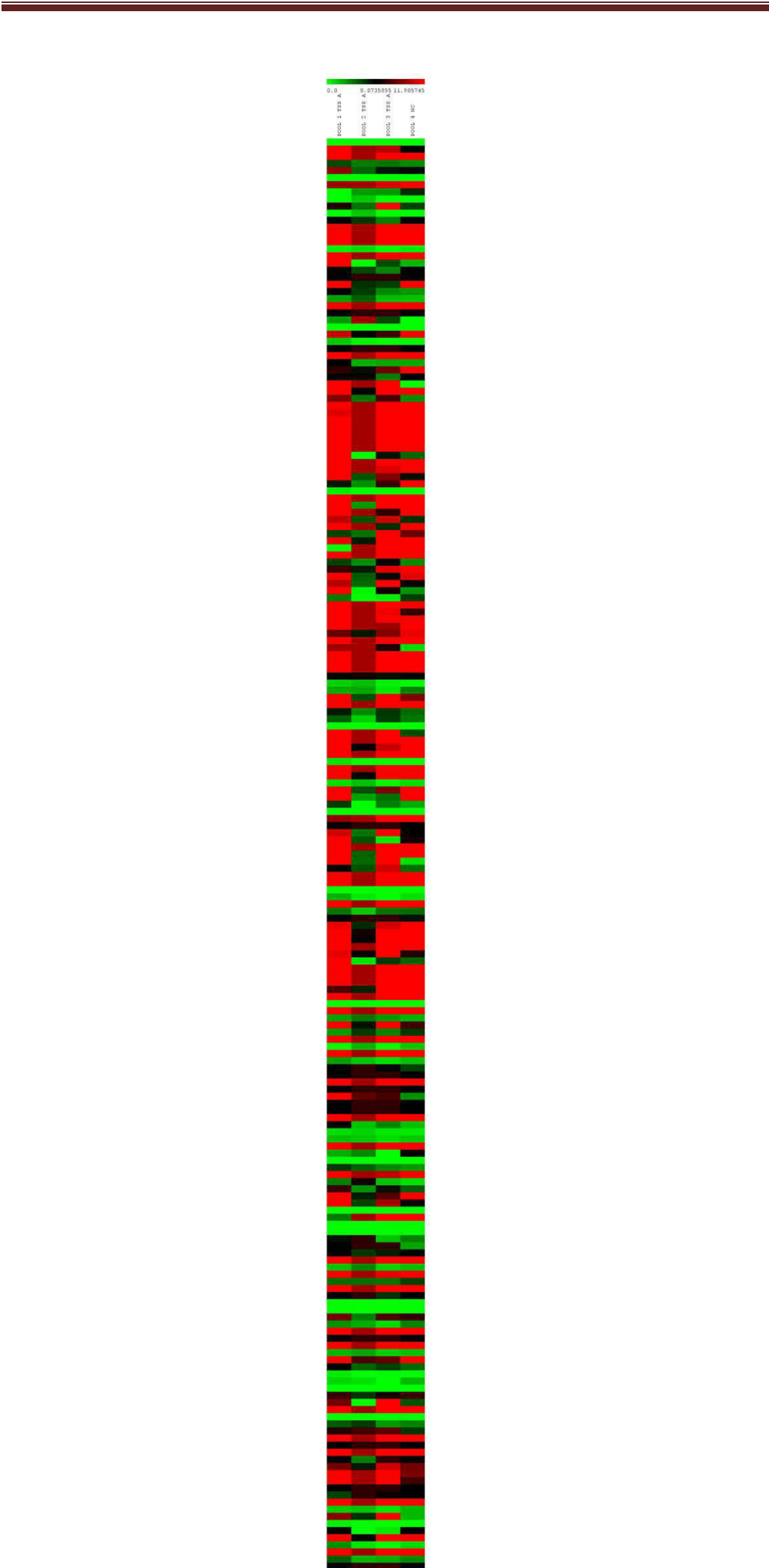
CBCL: Child Behavior Check-List; Int: internalizing; Ext: externalizing.

3.2 ANALISI TRAMITE TAQMAN® LOW DENSITY ARRAY (TLDA) DEI microRNA CIRCOLANTI IN PAZIENTI TSS

Il primo passo delle nostre indagini sperimentali è stato quello di analizzare il profilo di espressione di 754 miRNA tramite **TaqMan Low Density Array (TLDA)** in **3 pool** di siero (ciascun campione pool a sua volta costituito da **3** singoli campioni) di pazienti affetti da **TSS** paragonandolo al *pool* controllo **NC** (a sua volta costituito da **3** singoli campioni). I relativi livelli di espressione di ogni microRNA sono stati ottenuti secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ attraverso *RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems)*, utilizzando come controlli endogeni il valore di *Ct* della media e mediana di ciascuna *card* caricata e di *ath-159a* e come calibratore il nostro campione *pool NC*.

Nella **figura 3.1** in basso è mostrato il pattern di espressione dei 754 *miRNA* del siero di pazienti **TSS** e **NC** visualizzato con il *software MeV4.8.1 (Multi Experiment Viewer)*.

Risultati



Risultati

Figura 3.1: Matrice di espressione dei microRNA circolanti nei *pool* di pazienti TSS e nel *pool* dei controlli.

Effettuata l'indagine di profiling abbiamo filtrato ulteriormente i risultati da noi ottenuti tramite *RQ Manager* selezionando soltanto i microRNA differenzialmente espressi (fc ≤ 0.33 per la *downregulation* e un fc ≥ 3 per l'*upregulation*) il cui *trend* di espressione (*up o down*) era costante in tutti e 3 i *pool* TSS rispetto a tutti e tre i normalizzatori usati *Ct* media, *Ct* mediana ed *ath-159a* e le cui curve risultassero conformi al dato ottenuto dalla precedente analisi. I microRNAs così identificati sono mostrati nella **tabella 3.2** sottostante:

Detector	Pool 1 TSS	Pool 2 TSS	Pool 3 TSS	RQ medio	Reference
hsa-miR-1290	14.55	3.05	13.74	10.45	PMID:21984948; 23697990
hsa-miR-720	5.46	6.77	4.86	5.70	PMID: 21383194;22982408
hsa-miR-642	21.68	6.38	38.65	22.24	PMID:18589210
mmu-miR-134	172.73	5.35	0.79	59.62	PMID:20546789
hsa-miR-296-3p	3789.42	161.46	0.54	1317.14	PMID:18589210
hsa-miR-769-5p	13.27	14.01	41.05	22.78	PMID: 21505438
hsa-miR-30a-5p	3.02	2.10	6.30	3.81	PMID:18589210

Tabella 3.2:valori di RQ dei microRNAs differenzialmente espressi nei TSS. In rosso sono evidenziati i valori con ($RQ \geq 3$).

Da una prima analisi si può osservare soltanto una regolazione in senso **up** di tutti e sette microRNA da noi identificati a seguito delle nostre analisi. Il valori di **RQ** vanno da un valore minimo di **0.54** per il **miR-296-3p** nel pool 3 TSS ad un valore massimo di **3789.42** per lo stesso microRNA nel pool 1 TSS.

3.3 VALIDAZIONE TRAMITE SAGGIO SINGOLO IN TAQMAN ASSAY DEI TSS

Lo screening *High-throughput*, ci ha portato ad identificare un *subset* di microRNA sierici potenzialmente candidati per la patologia oggetto del nostro studio mostrati nella **tabella 3.2** e sulla base dei risultati da noi ottenuti e dalle indagini di letteratura abbiamo deciso di effettuare un'analisi in *TaqMan assay*, su **5** dei **7** microRNA da noi identificati: **miR-1290**, **miR-134**, **miR-296-3p** e

Risultati

miR-720, miR-642 questa volta non partendo da *pool* di campioni ma dai **singoli 9** pazienti **TSS** e dai **3 controlli NC** al fine di poter confermare i risultati da noi precedentemente ottenuti. I relativi livelli di espressione di ogni microRNA sono stati ottenuti secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ attraverso *RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems)*, utilizzando come controllo endogeno *ath-159a* e come calibratore i nostri tre controlli.

Di seguito nelle tabelle sono mostrati i risultati ottenuti dai nostri saggi singoli in *TaqMan assay*.

Sample	Detector	RQ medio NC
TSS-1	miR-1290	2.04
TSS-2	miR-1290	2.29
TSS-4	miR-1290	23.20
TSS-8	miR-1290	5.19
TSS-9	miR-1290	5.72
TSS-10	miR-1290	1.56
TSS-12	miR-1290	7.41
TSS-13	miR-1290	1.99
TSS-14	miR-1290	1.85

Tabella 3.3: valori di RQ medio del microRNAs 1290 nei TSS

Sample	Detector	RQ medio NC
TSS-1	miR-134	0.63
TSS-2	miR-134	2.46
TSS-4	miR-134	2.33
TSS-8	miR-134	0.68
TSS-9	miR-134	0.61
TSS-10	miR-134	0.82
TSS-12	miR-134	0.32
TSS-13	miR-134	1.49
TSS-14	miR-134	1.09

Tabella 3.4: valori di RQ medio del microRNAs 134 nei TSS

Risultati

Sample	Detector	RQ medio NC
TSS-1	miR-296-3p	0.04
TSS-2	miR-296-3p	5617.51
TSS-4	miR-296-3p	10555.12
TSS-8	miR-296-3p	990.13
TSS-9	miR-296-3p	4.85
TSS-10	miR-296-3p	47.04
TSS-12	miR-296-3p	1.74
TSS-13	miR-296-3p	0.06
TSS-14	miR-296-3p	2.10

Tabella 3.5: valori di RQ medio del microRNAs 296-3p nei TSS

Sample	Detector	RQ medio NC
TSS-1	mir-720	1.13
TSS-2	mir-720	3.15
TSS-4	mir-720	2.02
TSS-8	mir-720	5.38
TSS-9	mir-720	4.57
TSS-10	mir-720	3.63
TSS-12	mir-720	2.62
TSS-13	mir-720	1.55
TSS-14	mir-720	1.66

Tabella 3.6: valori di RQ medio del microRNAs 720 nei TSS.

Sample	Detector	RQ medio NC
TSS-1	miR-642	0.28
TSS-2	miR-642	0.62
TSS-4	miR-642	2.96
TSS-8	miR-642	1.53
TSS-9	miR-642	3.32
TSS-10	miR-642	0.55
TSS-12	miR-642	20.37
TSS-13	miR-642	0.86
TSS-14	miR-642	0.75

Tabella 3.7: valori di RQ medio del microRNAs 642 nei TSS

Per confermare la validità dei risultati da noi ottenuti nei singoli saggi in *TaqMan assay* abbiamo effettuato un **T-test** ed un **Wilcoxon test** tramite il

Risultati

tool ***SO**CR Statistics Online Computational Resource* impostando un valore di **P-value** < **0.05** per la significatività dei nostri risultati.

Nella **tabella 3.8** in basso sono mostrati i risultati del confronto statistico tra **TSS** e **NC**

Test statistico TSS vs NC	
miR-1290	
Two Independent Sample T-Test: 0.0034233894	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.0062774599
miR-134	
Two Independent Sample T-Test: 0.3407505918	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.3907556475
miR-296-3p	
Two Independent Sample T-Test: 0.0839614314	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.1545885228
miR-720	
Two Independent Sample T-Test: 0.0003812156	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.0104095035
miR-642	
Two Independent Sample T-Test: 0.2369666516	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.3907556475

Tabella 3.8: test statistici sui TSS vs NC.

In seguito alle analisi statistiche così effettuate, soltanto il **miR-720** ed il **miR-1290** sembrano confermarsi come potenziali marcatori candidati nel siero di pazienti affetti da **TSS**, questi due microRNA risultano essere statisticamente più abbondanti nei pazienti rispetto ai controlli anche se il dato dovrebbe essere confermato su una coorte più estesa sia di pazienti che di controlli.

Di seguito viene mostrato il grafico dei due microRNA risultanti statisticamente significativi dalle nostre analisi molecolari.

Risultati

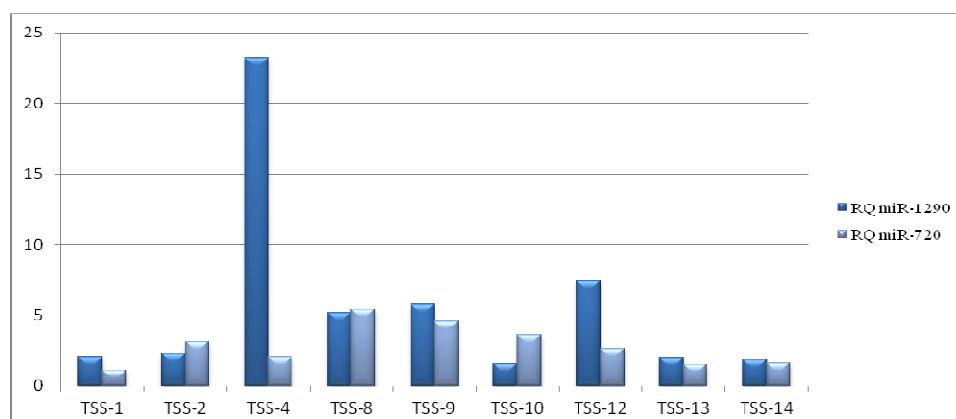


Grafico 3.1: valori di RQ medio dei microRNA 1290 e 720 nei TSS

3.4 ANALISI TRAMITE SAGGIO SINGOLO IN TAQMAN ASSAY DEI *TSM* (TOURETTE SYNDROME MILD PHENOTYPE)

Abbiamo altresì effettuato un'analisi d'espressione in *TaqMan assay* su 10 pazienti *TSM* al fine di poter confrontare i risultati ottenuti sui 2 microRNA risultanti statisticamente significativi (**miR-1290** e **miR-720**) in queste due classi di pazienti *TSS* e *TSM*. Anche in questo caso i relativi livelli di espressione di ogni gene microRNA sono stati analizzati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, attraverso *RQ Manager 1.2 software* (*Applied Biosystems*), utilizzando come controllo endogeno *ath-159a* e come calibratore i nostri tre controlli. I risultati di tale esperimento sono mostrati nelle tabelle sottostanti:

Sample	Detector	RQ medio
TSM 5	mir-1290	2.24
TSM 10	mir-1290	2.84
TSM 13	mir-1290	3.31
TSM 14	mir-1290	3.76
TSM 15	mir-1290	2.84
TSM 16	mir-1290	1.73
TSM 17	mir-1290	1.52
TSM 18	mir-1290	1.79
TSM 20	mir-1290	2.29
TSM 22	mir-1290	0.84

Tabella 3.9: valori di RQ medio del microRNAs 1290 nei *TSM*.

Risultati

Sample	Detector	RQ medio NC
TSM 5	mir-720	0.83
TSM 10	mir-720	0.46
TSM 13	mir-720	0.41
TSM 14	mir-720	0.35
TSM 15	mir-720	0.53
TSM 16	mir-720	0.51
TSM 17	mir-720	0.42
TSM 18	mir-720	0.45
TSM 20	mir-720	0.44
TSM 22	mir-720	0.20

Tabella 3.10: valori di RQ medio del microRNAs 720 nei *TSM*

L'analisi effettuata sui **10** pazienti *TSM* ha evidenziato per il microRNA **720** un profilo d'espressione opposto a quello dei *TSS* dove il suddetto gene risultava essere regolato in senso *up* in tutti e **9** i pazienti con valori di **RQ** che vanno da un minimo di **1.13** ad un massimo di **5.38**. Sorprendentemente lo stesso gene risulterebbe regolato in senso *down* nei **10** pazienti *TSM* analizzati con valori di **RQ** che vanno da un minimo di **0.20** (-**5.0** in termini di *Fold Change*) ad un massimo di **0.83** (-**1.21** in termini di *Fold Change*). Il profilo d'espressione del **miR-1290** sembrerebbe essere simile sia nei *TSS* che nei *TSM*.

Anche in questo caso i risultati da noi ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica effettuando sia il **T-Test** che il **Wilcoxon Test** impostando un valore di **P-value** < **0.05** per la significatività dei nostri risultati.

Nelle **tabelle 3.11** e **3.12** sono mostrati i risultati ottenuti dal confronto statistico tra *TSM* e *NC* e *TSS* e *TSM*.

Risultati

Test statistico TSM vs NC	
miR-1290	
Two Independent Sample T-Test: 0.0103971183	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.0139959089
miR-720	
Two Independent Sample T-Test: 0.0000459255	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.0056149438

Tabella 3.11: test statistici sui *TSM* Vs *NC*.

Test statistico TSS vs TSM	
miR-1290	
Two Independent Sample T-Test: 0.0552222246	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.1103356820
miR-720	
Two Independent Sample T-Test: 0.0000000907	Two Independent Sample Wilcoxon Rank Sum Test: 0.0001192817

Tabella 3.12 test statistici sui *TSM* vs *TSS*

Alla luce del risultato ottenuto tramite i test statistici entrambi i microRNA si confermerebbero come marcatori sierici tra pazienti TSS e controlli ed il **microRNA 720** risulterebbe statisticamente discriminante tra i pazienti *TSS* e i pazienti *TSM*.

Il grafico 3.2 in basso mostra l'andamento di espressione del **miR-720** nei pazienti *TSS* e *TSM*.

Risultati

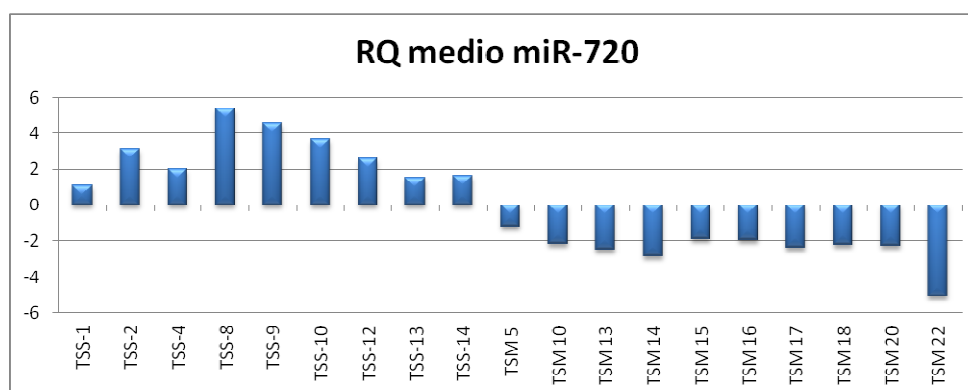


Grafico 3.2: valori di RQ medio dei microRNA 720 nei TSM e TSS

Di seguito sono mostrati in *box plot* e test statistici dei risultati complessivamente ottenuti dalle nostre indagini molecolari sui pazienti *TSS* e *TSM* per i **microRNA 720** e **microRNA 1290**

miRNA	Test statistico TSS vs NC		Test statistico TSM vs NC		Test statistico TSM vs TSS	
miR-1290	T-Test:	Wilcoxon Test:	T-Test:	Wilcoxon Test:	T-Test:	Wilcoxon Test:
	0.003423389 4	0.0062774599	0.0103971183	0.0139959089	0.0552222246	0.1103356820
miR-720	T-Test:	Wilcoxon Test:	T-Test:	Wilcoxon Test:	T-Test:	Wilcoxon Test:
	0.000381215 6	0.0104095035	0.0000459255	Test:0.0056149438	0.0000000907	Test:0.0001192817

Tabella 3.13 somma dei test statistici sui *TSM* e *TSS*

Risultati

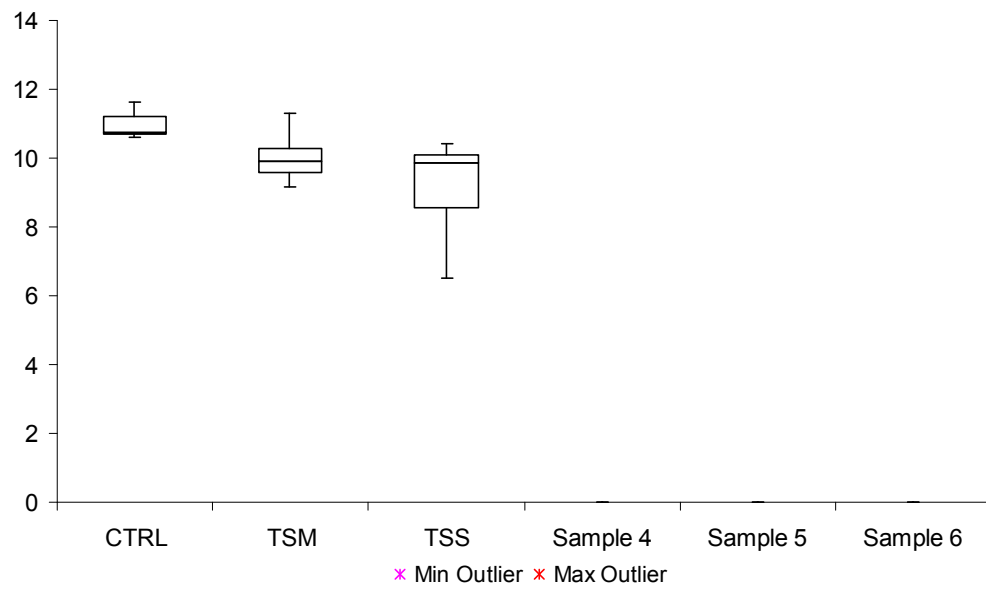


Grafico 3.3 Box plot dei dati di espressione del miR-1290

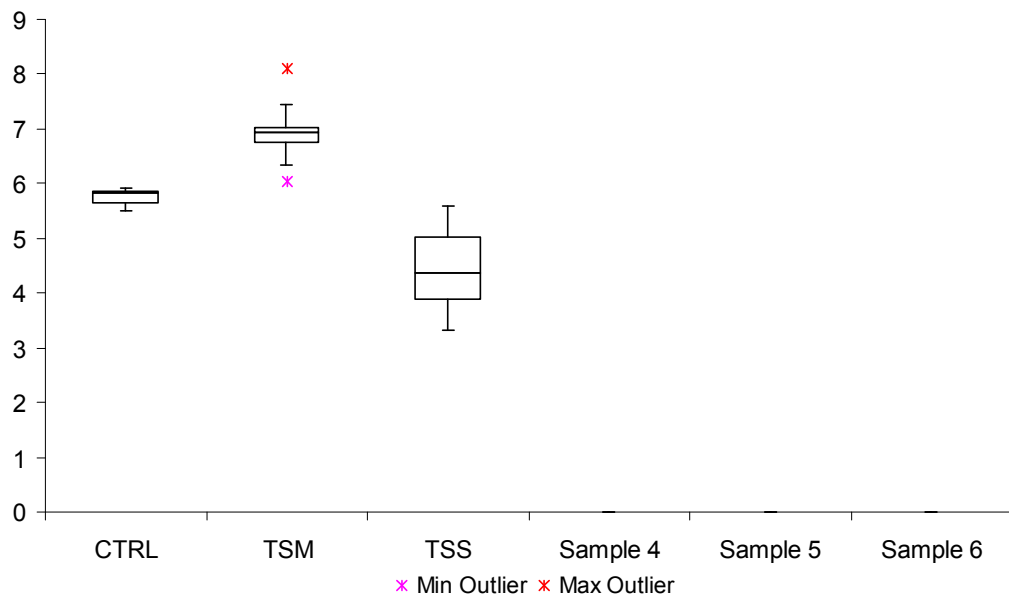


Grafico 3.4 Box plot dei dati di espressione del miR-720.

3.5 PREDIZIONE E STUDIO DEI *TARGETS* PREDETTI DEI microRNA VALIDATI E COSTRUZIONE DELLA NETWORK BIOLOGICA

I *targets* dei microRNA differenzialmente espressi e risultanti statisticamente significativi dall'analisi sui singoli pazienti ***TSS*** e ***TSM*** (miR-1290 e miR-720) sono stati ottenuti utilizzando una combinazione di diversi approcci. Una prima serie di *targets* predetti sono stati estratti dall'interpolazione di due database di predizione ***miRecords e starBase*** questa è stata poi confrontata con i risultati ottenuti mediante l'utilizzo di ***miRGator*** **3.0**. L'analisi condotta tramite il tool ***miRTarBase*** per la ricerca di *targets* validati ha dato esito negativo per entrambe le forme mature dei microRNA.

Dalle nostre analisi computazionali sono stati individuati 29 *targets* predetti per Hsa-miR-1290 e 10 *targets* per Hsa-miR-720 mostrati nelle tabelle **3.14 e 3.15** sottostanti.

Risultati

Official Gene Symbol	Official Gene Name	miRNA	Cor_val mirGator	Biological function Gene in the CNS	Implication in Neurological Disease	Reference
AASDHPPT	Aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	Hsa-miR-1290	2			
ARRDC4	Arrestin domain containing 4		1			
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A		1			
BPTF	Bromodomain PHD finger transcription factor		1	This gene was identified by the reactivity of its encoded protein to a monoclonal antibody prepared against brain homogenates from patients with Alzheimer's disease.	Neurodegenerative disease	PMID:16137655
CADM1	Cell adhesion molecule 1		2	synaptic adhesion protein	Autism spectrum disorder	PMID:22994563
CAMTA1	Calmodulin binding transcription activator 1		1	CAMTA1 is normally expressed predominantly in non-neoplastic adult brain tissue.	Memory performance	PMID:17470457
CD2AP	CD2-associated protein		1	This gene encodes a scaffolding molecule that regulates the actin cytoskeleton.	Alzheimer's disease	PMID:21460840
CHCHD1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1		2			
CTDSP2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2		2			
DDHD2	DDHD domain containing 2		2	Diagnostic biomarker in Spastic Paraplegia	Spastic Paraplegia	PMID:23176823
FAM98A	Family with sequence similarity 98, member A		1			
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa		2	This gene is physically associate with the glucocorticoid receptor whose function is implicated in MDD pathophysiology.	Major depressive disorder (MDD)	PMID:20726698
GOLGA4	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4		1			
ID4	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein		1	Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo	Rett syndrome	PMID: 16682435
KLF9	Kruppel-like factor 9		1	oligodendrocyte differentiation and myelin regeneration		PMID: 22472204
KLHL2	Kelch-like 2, Mayven (Drosophila)		1			
LEPROTL1	Leptin receptor overlapping transcript-like 1		1		Anorexia nervosa	PMID:17900053
LPHN2	Latrophilin 2		2			
LRRC8A	Leucine rich repeat containing 8 family, member A		1			
MED13	Mediator complex subunit 13		1			
PURB	Purine-rich element binding protein B		1			
PURG	Purine-rich element binding protein G		2			
SERF2	Small EDRK-rich factor 2		1			
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A		1	This gene, which belongs to the SMC gene family, is located in an area of the X-chromosome that escapes X inactivation. Mutations in this gene result in Cornelia de Lange syndrome.	Cornelia de Lange syndrome	PMID: 19842212
SPAG9	Sperm associated antigen 9		1			
STAU1	Staufen, RNA binding protein, homolog 1 (Drosophila)		2	Implicated in the microtubule-dependent transport of RNAs to dendrites of polarized neurons	Mental retardation	PMID:22584570
TNFAIP1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)		1	TNFAIP1 protein is the first identified TNF- α inducible protein. TNFAIP1 is a multifunctional gene involved in DNA replication, DNA repair, cell cycle and cell signal pathway.	Alzheimer's disease	PMID: 12600716
UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2K		1	This protein interacts with RING finger proteins, and it can ubiquitinate huntingtin, the gene product for Huntington's disease.	Huntington's disease	PMID:23070563
ZRANB2	Zinc finger, RAN-binding domain containing 2		1			

Tabella 3.14: target predetti del miR-1290.

Risultati

Official Gene Symbol	Official Gene Name	miRNA	Cor_val mirGator	Biological function Gene in the CNS	Implication in Neurological Disease	Reference
ANKRD13C	Ankyrin repeat domain 13C	Hsa-miR-720	2			
ARFIP2	ADP-ribosylation factor interacting protein 2		1			
DNMT3A	DNA (cytosine-5) methyltransferase 3 alpha		1	Neural Progenitor Cell Development; Neurogenesis	Neurodegenerative disorders; Neuropsychiatric disorders	PMID:16973295; PMID:19833297; PMID:19900616
FAM127C	Family with sequence similarity 127, member C		2			
FBXO18	F-box protein, helicase, 18		1			
FOXP1	forkhead box G1		1	Cajal-Retzius Neurogenesis and Hippocampal	Rett syndrome	PMID:20734096; PMID:15858069
KCTD15	Potassium channel tetramerization domain containing 15		1			
SAMD4B	Sterile alpha motif domain containing 4B		2			
TMEM200B	Transmembrane protein 200B		1			
ZNF238	Zinc finger and BTB domain containing 18		1	Neuronal differentiation and brain expansion		PMID:22095278;

Tabella 3.15: target predetti del miR-720

Poiché entrambi i microRNA sono sovraespressi nel siero di pazienti *TSS* e nell'ambito di uno studio sistemico quindi il dato potrebbe essere più interessante si è scelto di sottoporre i 30 geni *targets* predetti per i microRNA 1290 e 720 ad un'indagine di espressione tissutale tramite il tool **DAVID 6.7** considerando significativi risultati aventi un **Pvalue<0.05**. I risultati di questa analisi hanno mostrato che 23 geni su 30 sono espressi nel cervello (**p-value 0.0045**). Sulla base dei dati di letteratura (**vedi tabelle 3.14 e 3.15**) abbiamo scelto un ristretto set di *targets* predetti di entrambi i microRNA su cui abbiamo costruito ed analizzato la nostra *network* biologica mostrati nella **tabella 3.16** sottostante.

Risultati

DNMT3A	hsa-miR-720
FOXG1	hsa-miR-720
ZNF238	hsa-miR-720
BPTF	hsa-miR-1290
CADM1	hsa-miR-1290
CD2AP	hsa-miR-1290
FKBP4	hsa-miR-1290
ID4	hsa-miR-1290
KLF9	hsa-miR-1290
SMC1A	hsa-miR-1290
STAU1	hsa-miR-1290
TNFAIP1	hsa-miR-1290
UBE2K	hsa-miR-1290

Tabella 3.16: target selezionati dei miR-1290 e 720 per costruzione della *network*

I *targets* selezionati ed i loro primi interattori sono stati utilizzati per la costruzione della *network* regolata dai microRNA hsa-miR-720 e hsa-miR-1290 che comprende un totale di 268 nodi e 6542 archi.

Effettuata l'analisi di centralità dei nodi della *network* seguendo i parametri di *Betweenness Centrality*, *Closeness Centrality*, *Node Degree* e *Stress*, abbiamo selezionato 23 nodi i cui valori per tutti i parametri di centralità utilizzati superano la “soglia” data dalla media dei valori ottenuti per tutti i nodi della *network*. Il **plugin MiMI** non ha trovato interattori per CAMTA1 e DDH2, entrambi target predetti del miR-1290.

Dei 23 nodi della *network* che ricoprono un ruolo cruciale in termini di centralità il nodo identificato dalla proteina SMC1A *Structural Maintenance of Chromosomes 1A* (**tabella 3.17**) risulta di particolare importanza sia perché il suo mRNA è un bersaglio predetto del del miR-1290 sia perché dei 23 geni selezionati ben 22 risultano interagire con la stessa SMC1A.

Risultati

ENTREZ GENE ID	GENE NAME	CENTISCAPE BETWEENNESS	CENTISCAPE CLOSENESS	CENTISCAPE NODE DEGREE	CENTISCAPE STRESS
6872	TAF1	11100.5	0.00216	101.00	217780
3178	HNRNPA1	484.3	0.00210	113.00	16556
10421	CD2BP2	546.8	0.00197	108.00	5588
2962	GTF2F1	394.4	0.00204	110.00	10732
23450	SF3B3	998.9	0.00204	110.00	13376
4686	NCBP1	788.5	0.00211	112.00	17020
5430	POLR2A	1215.4	0.00210	115.00	14316
6637	SNRPG	859.1	0.00185	108.00	14264
5436	POLR2G	499.8	0.00200	110.00	7566
10921	RNPS1	432.9	0.00206	111.00	14090
3172	HNF4A	4805.6	0.00193	67.00	89630
8243	SMC1A	7132.0	0.00220	139.00	40158
9128	PRPF4	394.7	0.00203	110.00	8384
3183	HNRNPC	981.8	0.00207	111.00	13890
6625	SNRP70	893.6	0.00205	109.00	12490
3190	HNRPK	1781.6	0.00207	113.00	18186
3192	HNRNPU	970.7	0.00197	111.00	11004
4116	MAGOH	505.9	0.00205	110.00	12430
4609	MYC	5233.7	0.00200	59.00	110804
22916	NCBP2	469.7	0.00207	111.00	12692
1660	DHX9	721.0	0.00196	110.00	7746
4904	YBX1	1138.7	0.00210	113.00	12650
8106	PABPN1	517.8	0.00197	108.00	6650
VALORE SOGLIA MEDIO		372.2	0.00163	48.82	49.00

Tabella 3.17: valori *Betweenness Centrality*, *Closeness Centrality*, *Node Degree* e *Stress* dei *targets* predetti e dei loro primi interattori.

Sulla *network* è stata effettuata l'analisi di *Gene Ontology* (mostrata in **tabella 3.18**) dove è rappresentato l'elenco dei primi 10 processi biologici che risultato statisticamente sovra-rappresentati all'interno della *network* dei bersagli molecolari dei microRNA hsa-miR-720 ed hsa-miR-1290 (**vedi tabella 3.18**).

Risultati

GO-ID	P-VALUE	CORR P-VALUE	DESCRIPTION
8380	4.52E-118	0.00E+00	RNA splicing
6396	6.46E-90	6.79E-87	RNA processing
16071	6.82E-79	4.78E-76	mRNA metabolic process
6397	2.33E-76	1.22E-73	mRNA processing
16070	2.71E-74	1.14E-71	RNA metabolic process
90304	8.23E-73	2.88E-70	nucleic acid metabolic process
10467	1.92E-65	5.75E-63	gene expression
6139	6.48E-62	1.70E-59	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
34641	5.36E-55	1.25E-52	cellular nitrogen compound metabolic process
44260	1.45E-54	3.04E-52	cellular macromolecule metabolic process

Tabella 3.18: processi maggiormente sovra rappresentati all'interno della network biologica

DISCUSSIONE

La comunità scientifica ha mostrato un crescente interesse nell'arco degli anni verso l'identificazione di molecole *makers* e test di *screening* quanto meno invasivi per il paziente e specifici nella diagnosi precoce di patologie neoplastiche o nella risposta a specifiche terapie farmacologiche [99]; tuttavia molte tra queste molecole nonostante la loro semplice reperibilità e semplicità di quantificazione non sempre sono rilevabili negli stadi precoci della malattia [71]. Nella ricerca della molecola che racchiuda in sé le caratteristiche attribuibili ad un *biomarker*, diversi studiosi, hanno proposto i microRNA circolanti come potenziali candidati. Queste piccole molecole infatti risultano essere molto stabili nei fluidi biologici, sono resistenti ad insulti esterni e possono essere facilmente dosate attraverso diverse metodiche quantitative risultando degli indicatori di uno stadio patologico o fisiologico, in ultimo, ma non meno importante, la loro reperibilità è non invasiva per il paziente [71];[72];[75][77].

Negli ultimi anni dunque i microRNA circolanti stanno diventando particolarmente interessanti da un punto di vista clinico, in quanto facilmente rilevabili da fluidi biologici come siero, plasma, urine, ed in grado di ridurre drasticamente i falsi positivi e negativi ottenuti con i metodi tradizionali di diagnosi quando accompagnati a questi ultimi; tutto ciò ha conferito a queste piccole molecole un notevole potenziale di utilizzo in campo prognostico e diagnostico [72];[81] [82] [88].

L'avvento delle tecnologie *High Throughput*, in grado di abbattere i costi ed i tempi di esecuzione di un'indagine analitica e l'analisi in simultanea di un numero considerevole di geni candidati oltre che al non trascurabile aumento di sensibilità e specificità del risultato ottenuto[2];[4] hanno potenziato l'uso in campo clinico dei microRNA circolanti nella diagnosi non invasiva [71];[88]. Queste piccole molecole infatti sono state quantificate da

fluidi biologici in diverse patologie neoplastiche [71];[75];[80];[82], ma anche neurologiche [85];[100].

Negli ultimi anni però la ricerca sui microRNA circolanti ha mostrato un notevole interesse verso le patologie psichiatriche: lo testimonia il numero di pubblicazioni recenti che riportano esperimenti di *profiling* da fluidi biologici in diverse patologie psichiatriche come depressione [101] disturbo bipolare [102] e schizofrenia [103]. Questo forte interessamento nasce dal fatto che queste malattie, oltre ad essere fortemente debilitanti per la qualità di vita del paziente, non hanno strumenti molecolari di diagnosi, al momento affidata esclusivamente al **DSM-V** (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V* edizione).

Dunque il potenziale che i microRNA circolanti possono offrire in campo diagnostico, in associazione alla sensibilità e specificità offerta dalle moderne tecnologie *high throughput* e l'assenza di strumenti molecolari di diagnosi nelle patologie psichiatriche ci ha spinto ad analizzare il trascrittoma di 754 miRNAs, tramite tecnologia *TaqMan® Low Density Array (TLDA)*, partendo da *pool* di siero di pazienti affetti dalla forma più grave di Sindrome di Tourette **TSS**(*Tourette Syndrome Severe Phenotype*); patologia ad esordio infantile che compromette la qualità della vita del paziente in relazione alla gravità fenotipica e alla comorbilità con altri disordini psichiatrici il cui fenotipo clinico può variare dalla manifestazione severa (*Severe*) a moderata (*mild*) [12];[16];[17].

I nostri risultati sperimentali ci hanno portato alla validazione statistica di due miRNA **miR-720** e **miR-1290**, i cui livelli d'espressione sono statisticamente più alti nei pazienti rispetto ai controlli; inoltre, il **miR-720** risulterebbe statisticamente discriminante tra il fenotipo **TSS** e **TSM** (*Tourette Syndrome Mild Phenotype*) in quanto ad alti livelli d'espressione del suddetto microRNA rilevati nei **TSS** corrispondono bassi livelli d'espressione nei **TSM**. I pazienti **TSS** reclutati dall'Unità di Neuropsichiatria Infantile coordinata dalla Prof.ssa Renata Rizzo, dell'azienda ospedaliera Policlinico di Catania, manifestano fenotipo grave (*Severe*) in accordo al *clinical global impression*

(*CGI-S*) e comorbidità con *ADHD* e *OCD*: dunque, dalle nostre indagini molecolari il **microRNA 720** potrebbe classificarsi come un potenziale marcatore sierico nella discriminazione fenotipica tra le due classi pazienti *Severe* e *Mild* e potrebbe avere un importante riscontro, in campo clinico, nella diagnosi differenziale dei due fenotipi patologici.

Naturalmente tutte le ipotesi di una eventuale candidatura dei microRNA da noi individuati come potenziali *markers* nella diagnosi di **TS**, dovranno essere avvalorate da ulteriori indagini su coorti molto più ampie sia di pazienti che di controlli.

Le nostre indagini in letteratura sui 30 geni *targets* predetti per i microRNA statisticamente validati hanno rilevato che il 45% dei *targets* del **miR-1290** sono coinvolti nei processi riguardanti la regolazione dello sviluppo del sistema nervoso centrale (**SNC**), o patologie ad esso connesse, in particolare patologie neurodegenerative. Tra questi, sei geni sono coinvolti in patologie riguardanti adolescenti e bambini ed in particolare il gene *CADMI* che è una proteina di adesione sinaptica associata al disordine dello spettro autistico *ASD* [104] e *ID4* che regola la proliferazione e differenziazione dei neuroni in vivo, coinvolto nella sindrome di Rett [105] entrambi inseribili nel contesto delle patologie neuropsichiatriche infantili. Altri geni come *DDHD2*, *LEPROTL1*, *SMC1A* e *STAUI* [106];[107];[108];[109] sono tutti coinvolti in patologie che riguardano disordini di sviluppo sia fisico che mentale di adolescenti e bambini. Il 30% dei *targets* del **miR-720** sono coinvolti nei processi riguardanti il **SNC** (sviluppo o patologie ad esso connesse); in particolare mutazioni nel gene *FOXG1* sono state attribuite alla suscettibilità verso la sindrome di Rett [110]. Il gene *DNMT3A* enzima coinvolto nei processi di metilazione del DNA sembrerebbe coinvolto in numerose patologie neurologiche come Alzheimer, Parkinson, Huntington, sclerosi multipla ma anche di patologie psichiatriche come l'epilessia [111]. Le nostre indagini computazionali sull'espressione tissutale hanno evidenziato che 23 geni su 30 sono espressi nel cervello ed hanno identificato un gene *target* predetto del miR-1290, **SMC1A**, come nodo cruciale della *network* dei bersagli molecolari

predetti del miR-1290 e 720. Mutazioni nella sequenza genica SMC1A sono responsabili della sindrome di Cornelia de Lange, una malattia multisistemica caratterizzata da malformazioni e disabilità mentale [108];[112]. Le analisi *Gene Ontology* sulla *network* dei bersagli molecolari predetti dei miR-1290 e miR-720 risulterebbero inseriti nel contesto della regolazione dell'espressione genica e processamento dell'RNA ed in modo particolare nei processi di *splicing* il quale potrebbe stare alla base della patofisiologia della *TS*; evidenze sperimentali dimostrano che vi sono sostanziali differenze in termini del numero di geni che subiscono l'evento di *splicing* alternativo tra pazienti *TS* ed individui normali [113].

I livelli sierici del microRNA 1290 secondo recenti studi sono in grado di discriminare pazienti con tumore pancreatico di basso grado dai soggetti sani in maniera molto più sensibile e specifica dell'attuale *marker* tumorale *CA19-9*, attualmente in uso in oncologia clinica [114] dimostrandone il potenziale utilizzo il campo clinico nella diagnosi precoce del tumore al pancreas [114]. Il miR-1290 risulterebbe un biomarcatore plasmatico nella rilevazione dell'aumento dell'ematoma cerebrale (HE) dopo un'emorragia intracerebrale ICH [115] ed è sovraespresso a seguito di un evento ischemico [116]. Il microRNA 720 è un microRNA circolante che è stato quantificato in molte patologie come il carcinoma al colon retto [117] e il mieloma multiplo, in particolare gli aumentati livelli di questo microRNA insieme al miR-1308 risulterebbero dei validi candidati nella discriminazione tra pazienti affetti da mieloma multiplo e soggetti sani [118]; risulta essere invece sottoespresso nel plasma di individui affetti da malattie autoimmuni come Lupus Eritematoso Sistemico (SLE) ed Artrite Reumatoide (RA) [119]. Asserito dunque che questi microRNA risultino essere stabili e facilmente quantificabili nel siero una delle nostre ipotesi è che potrebbero essere rilasciati dalle cellule ematiche [77] associati ad esosomi o complessati a proteine [83];[85];[120] e superando la barriera emato-encefalica [85] possano essere rilasciati [84] sulle aree principalmente implicate nel disturbo TS e ricoprire funzioni biologiche quali, secondo le nostre indagini computazionali, regolazione dell'evento di *splicing* tramite repressione dei loro bersagli molecolari.

Discussione

I risultati da noi ottenuti al momento ci hanno portato a candidare il **miR-1290** e **miR-720** come potenziali marcatori sierici nella diagnosi di TS ed il **miR-720** come marcatore discriminante all'interno della stessa patologia, distinguendo i pazienti con sintomatologia Grave (*Severe*) da quelli con una sintomatologia moderata (*mild*); se seguito i risultati da noi ottenuti saranno validati su una coorte più ampia di pazienti e controlli potrebbero trovare un importante riscontro in campo diagnostico, soprattutto nella valutazione clinica dei fenotipi TS.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il *profiling* dei microRNA da fluidi biologici come siero, plasma, urine fluido cerebro-spinale (*CSF*) ha contribuito all'identificazione di *biomarkers* diagnostici e prognostici di facile utilizzo in campo clinico trattandosi di un metodo di *screening* semplice, non invasivo, altamente sensibile ed in grado di discriminare il diverso stadio della patologia o dell'andamento terapeutico in corso.

Anche nel settore delle patologie neurodegenerative e psichiatriche questo approccio sta diventando produttivo nello sviluppo di test di *screening* che siano in grado di stratificare i diversi stadi della malattia, di monitorare la terapia farmacologica e di coadiuvare, mediante strumenti molecolari, alla diagnosi differenziale, al momento affidata, per le malattie mentali al *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V* edizione **DSM-V**. L'importanza ricoperta dalla sindrome di Tourette in campo clinico e sociale in relazione al potenziale utilizzo dei microRNA circolanti come strumenti molecolari di diagnosi ha spinto il nostro gruppo ad analizzare il trascrittoma dei miRNA del siero di pazienti affetti dalla forma più grave di Sindrome di Gilles de La Tourette (*Tourette Syndrome Severe Phenotype*) al fine di individuare dei potenziali *biomarkers* per la diagnosi molecolare di tale complessa patologia psichiatrica. Le nostre indagini sul *profiling* d'espressione dei microRNAs circolanti nel siero di pazienti affetti da **TS** ci hanno portato, al momento attuale, all'identificazione di **due** miRNA **miR-1290** e **miR-720** i cui livelli d'espressione sono statisticamente più alti nei pazienti **TS** rispetto ai controlli. Inoltre il **miR-720** risulterebbe statisticamente discriminante tra il fenotipo **TSS** (*Tourette Syndrome Severe Phenotype*) e **TSM** (*Tourette Syndrome Mild Phenotype*) in quanto ad alti livelli d'espressione quantificati nei **TSS** corrispondono bassi livelli d'espressione nei **TSM** ciò porterebbe a

Conclusioni

credere che questo microRNA risulti essere un buon candidato nella diagnosi differenziale tra fenotipo *Severe* e *Mild* .

Naturalmente ulteriori indagini su coorti più ampie di pazienti e controlli saranno necessarie per validare i risultati da noi ottenuti, che attualmente, ci hanno portato a candidare il **miR-1290** e **miR-720** come potenziali marcatori sierici nella diagnosi di **TS** ed il **miR-720** come potenziale candidato discriminate tra il fenotipo grave e moderato nella sindrome di Tourette e le prospettive future sono orientate in questa direzione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Vaidyanathapuram S. Balakrishnan, et al. **Genomic Medicine, Gene Polymorphisms, and Human Biological Diversity.** *Seminars in Dialysis — Vol 18, No 1 (January–February) 2005 pp. 37–40.*
- [2] Nicole M. Morel, Joanne M. Holland et al. **Primer on Medical Genomics Part XIV: Introduction to Systems Biology—A New Approach to Understanding Disease and Treatment.** *Mayo Clin Proc.* 2004;79:651-658.
- [3] Oltvai ZN, Barabasi AL. Systems biology. **Life's complexity pyramid.** *Science* 2002, 298: 763-4.
- [4] Mildred K Cho. **Translating genomics into the clinic: moving to the post-Mendelian world.** *Genome Medicine* 2009, 1:7.
- [5] Joseph Loscalzo, Isaac Kohane et al. **Human disease classification in the postgenomic era: A complex systems approach to human pathobiology.** *Molecular Systems Biology* 2007.
- [6] Harold I. Kaplan et. Al. **Psichiatria. Manuale di scienze del comportamento e psichiatria** 8a ed., Torino, Centro Scientifico Editore, 2002.
- [7] Rudolf Uher. **Genomics and the classification of mental illness: focus on broader categories.** *Genome Medicine* 2013, 5:97.
- [8] Matthew W State. **The genetics of Tourette disorder.** *Genetics & Development* 2011, 21:302–309.
- [9] Joseph Jankovic, and Roger Kurlan. **Tourette Syndrome: Evolving Concepts.** *Movement Disorders, Vol. 26, No. 6, 2011.*
- [10] Roger L. Albin and Jonathan W. Mink. **Recent advances in Tourette syndrome research.** *TRENDS in Neurosciences Vol.29 No.3 March 2006.*
- [11] Jung-Chieh Du, Ting-Fang Chiu et al. **Tourette Syndrome in Children: An Updated Review.** *Pediatr Neonatol* 2010;51(5):255–264.

- [12] Mary May Robertson, Valsamma Eapen et al. **The international prevalence, epidemiology, and clinical phenomenology of Tourette syndrome: A cross-cultural perspective.** *Journal of Psychosomatic Research* 67 (2009) 475–483.
- [13] Lea K. Davis, Dongmei Yu et al. **Partitioning the Heritability of Tourette Syndrome and Obsessive Compulsive Disorder Reveals Differences in Genetic Architecture.** *PLOS Genetics* October 2013.
- [14] Mary M. Robertson. **The prevalence and epidemiology of Gilles de la Tourette syndrome Part 1: The epidemiological and prevalence studies.** *Journal of Psychosomatic Research* 65 (2008) 461–472.
- [15] Julia A. O'Rourke, Jeremiah M. Scharf et al. **The Genetics of Tourette Syndrome: A review.** *J Psychosom Res.* 2009 December; 67(6): 533–545.
- [16] Cavanna AE, Luoni C, et al. **The Gilles de la Tourette Syndrome-Quality of Life Scale for children and adolescents (C&A-GTS-QOL): Development and validation of the Italian version.** *Behav Neurol.* 2012 Aug
[
- [17] Clare M. Eddy, Renata Rizzo et al. **Neuropsychological aspects of Tourette syndrome: A review.** *Journal of Psychosomatic Research* 67 (2009) 503–513.
- [18] Roger Kurlan. **Tourette's Syndrome.** *n engl j med* 363;24 december 9, 2010.
- [19] Bin Xu, Maria Karayiorgou et al **microRNAs in Psychiatric and Neurodevelopmental Disorders.** *Brain Res.* 2010 June 18; 1338C: 78–88. doi:10.1016/j.brainres.2010.
- [20] Matthew W. State. **The Genetics of Child Psychiatric Disorders: Focus on autism and Tourette syndrome.** *Neuron.* 2010 October 21; 68(2): 254–269.
- [21] Petek E, Windpassinger C et al. **Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome.** *Am J Hum Genet* 2001; 68:848–858.
- [23] Hao Deng, Kai Gao et al. **The genetics of Tourette syndrome.** *Nat. Rev. Neurol.* advance online publication 13 March 2012.
- [24] Abhishek Nag1, Elena G. Bochukova et al. **CNV Analysis in Tourette Syndrome Implicates Large Genomic Rearrangements in COL8A1 and NRXN1.** *PLOS Genetics* March 2013.

- [25] Jesse F, Abelson et al. **Sequence Variants in SLITRK1 Are Associated with Tourette's Syndrome.** *SCIENCE VOL 310 14 OCTOBER 2005.*
- [26] Althea A. Stillman, Zeljka Krsnik, et al. **Developmentally Regulated and Evolutionarily Conserved Expression of SLITRK1 in Brain Circuits Implicated in Tourette Syndrome.** *The Journal of Comparative Neurology* 513:21–37 (2009).
- [27] Miranda DM, Wigg K et al. **Association of SLITRK1 to Gilles de la Tourette Syndrome.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008.
- [28] S Zuhner, ML Cuccaro et al. **SLITRK1 mutations in Trichotillomania.** *Molecular Psychiatry* (2006) 11, 888–891.
- [29] Jacquelyn Crane and International Consortium for Genetics (TSAICG). **Family-based Genetic Association Study of DLGAP3 in Tourette Syndrome.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011 January.
- [30] Yang Tang, Donald L et al. **Blood Gene Expression Profiling of Neurologic Diseases.** *Arch Neurol.* 2005;62:210-215.
- [31] Thomas E. Kimber. **An Update on Tourette Syndrome.** *Curr Neurol Neurosci Rep* (2010) 10:286–291.
- [32] Yong Zhao and Deepak Srivastava. **A developmental view of microRNA function.** *Trends Biochem Sci.* 2007 Apr;32(4):189-97. *Epub* 2007 Mar 9.
- [33] Zhang B, Wang Q et al. **MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants.** *J Cell Physiol.* 2007 Feb;210(2):279-89.
- [34] Lee, R. C., Feinbaum, R et al. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- [35] Reinhart, B. J. et al. **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
- [36] Pasquinelli, A. E. et al. **Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.** *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):86-9.
- [37] Lagos-Quintana, M., Rauhut et al. **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.** *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):86-9.

- [38] Lau, N. C., Lim, L. P et al. **An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*.** *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
- [39] Berezikov. **Evolution of microRNA diversity and regulation in animals.** *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 18;12(12):846-60.
- [40] Hertel, J. et al. **The expansion of the metazoan microRNA repertoire.** *BMC Genomics*. 2006 Feb 15;7:25.
- [41] Heimberg, A. M., Sempere et al. **MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2946-50.
- [42] Kim VN, Nam JW. **Genomics of microRNA.** *Trends Genet*. 2006 Mar;22(3):165-73. Epub 2006 Jan 30.
- [43] Lee Y Kim M, Han et al. **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
- [44] Cai X, Hagedorn CH et al. **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957-66.
- [45] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. **RNA polymerase III transcribes human microRNAs.** *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097-101.
- [46] Winter J, Jung S et al. **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228-34.
- [47] Kim VN: **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 May;6(5):376-85.
- [48] Lund E, Guttinger S et al. **Nuclear export of microRNA precursors.** *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.
- [49] Hutvagner G, McLachlan et al. **A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.** *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):834-8.
- [50] Ketting RF, Fischer SE et al. **Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*.** *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2654-9.
- [51] Schwarz DS Hutvagner G et al. **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.

- [52] He L, Hannon GJ. **MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation.** *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31.
- [53] Ruby JG, Jan CH et al. **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** *Nature.* 2007 Jul 5;448(7149):83-6.
- [54] Carthew RW and Sontheimer EJ. **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell,* 2009 February 20; 136 (4): 642–655.
- [55] Zeng Y, Sankala H et al. **Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies.** *Biochem. J,* 2008; 413: 429–436.
- [56] Sen GL & Blau HM. **Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies.** *Nature Cell Biol,* 2007; 7: 633–636.
- [55] Chendrimada TP, Finn KJ et al Pasquinelli AE, Shiekhattar R: **MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6.** *Nature,* 2007; 447:823–828.
- [56] Marina Chekulaeva and Witold Filipowicz. **Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells.** *Cell Biology* 2009, 21:452–460.
- [57] Jacek Krol ,Inga Loedige et al. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nature Reviews Genetics* 11, 597–610 (1 September 2010).
- [58] O'Donnell KA, Wentzel EA et al. **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression.** *Nature.* 2005, 435:839-43.
- [59] Conaco C, Otto S et al. **Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103:2422-7.
- [60] Krol J, Busskamp V, Markiewicz I et al. **Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs.** *Cell.* 2010, 141:618-31.
- [61] Stefanie Sassen & Eric A. Miska et al. **MicroRNA—implications for cancer.** *Virchows Arch.* 2008 Jan;452(1):1-10.
- [62] Calin GA, Sevignani C et al. **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.

- [63] Barbato C, Giorgi C et al. **Thinking about RNA? MicroRNAs in the brain.** *Mamm Genome*. 2008 Aug;19(7-8):541-51. Epub 2008 Aug 1.
- [64] Sempere LF, Freemantle S et al. **Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation.** *Genome Biol*. 2004;5(3):R13. Epub 2004 Feb 16.
- [65] Sabata Martino, Ilaria di Girolamo et al. **MicroRNA Implications across Neurodevelopment and Neuropathology.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2009*.
- [66] Kenneth S. Kosik. **The neuronal microRNA system.** *NATURE REVIEWS. VOLUME 7 | DECEMBER 2006*
- [67] Gerhard M. Schratt et al. **A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development.** *NATURE* | Vol 439 | 19 January 2006.
- [68] Enrico De Smaele, Elisabetta Ferretti et al. **MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders.** *BRAIN RESEARCH 1338 (2010) 100–111*.
- [69] Praveen Sethupathy and Francis S. Collins. **MicroRNA target site polymorphisms and human disease.** *Trends in Genetics Vol.24 No.10*.
- [70] A. Clop, F. Marcq et al. **A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.** *Nature Genetics*, vol. 38, no. 7, pp. 813–818, 2006.
- [71] Mitchell PS, Parkin RK et al. **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10513–10518.
- [72] Nathalie Schooler, Christian Langer et al. **Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature.** *Experimental Hematology* 2010;38:1126–113.
- [73] Chim SS, Shing et al. **Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma.** *Clin Chem* 2008;54:482-90.
- [74] Shlomit Gilad, Eti Meiri et al. **Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers.** *PLoS ONE* | 1 September 2008 | Volume 3 | Issue 9 |

- [75] Xi Chen, Yi Ba, et al. **Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.** *Cell Research* (2008) 18:997-1006.
- [76] Hunter MP, Ismail N et al. **Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles.** *PLoS ONE* 2008;3:e3694.
- [77] Glen Reid, Michaela B. Kirschner et al. **Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80 (2011) 193–208.
- [78] Maria Angelica Cortez & George Adrian Calin. **MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases.** *Expert Opin. Biol. Ther.* (2009) 9(6):703-711.
- [79] Francesco Russo, Sebastiano Di Bella et al. **miRandola: Extracellular Circulating MicroRNAs Database.** *PLOS ONE* October 2012 | Volume 7 | Issue 10.
- [80] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. **Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *Br J Haematol* 2008;141:672-5.
- [81] Maria Angelica Cortez, Carlos Bueso-Ramos et al. **MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers.** *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 467–477 June 2011.
- [82] Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi et al. **Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Sci* | October 2010 | vol. 101 | no. 10 | 2087–2092.
- [83] Kasey C. Vickers et al. **MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.** *NATURE CELL BIOLOGY VOLUME 13 NUMBER 4 APRIL 2011.*
- [84] Valadi H, Ekstrom K, et al. **Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654–9.
- [85] Kira S. Sheinerman and Samuil R. Umansky. **Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies.** *Frontiers in Cellular Neuroscience.* September 2013.

- [86] Chan JA, Krichevsky AM et al. **MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.** *Cancer Res* 2005; 65: 6029–6033.
- [87] Heneghan HM, Miller N et al. **Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer.** *Ann Surg.* 2010;251:499–505.
- [88] Evan M. Kroh et al. **Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).** *Methods* 50 (2010) 298–301.
- [89] Chomczynski P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem.* 1987;162:156–159.
- [90] Jennifer S. McDonald et al. **Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges.** *Clinical Chemistry* 57:6000–000 (2011).
- [91] Shizuka Masaki, Rie Ohtsuka et al. **Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364 (2007) 509–514.
- [92] Anna M. Krichevsky. **MicroRNA Profiling: From Dark Matter to White Matter, or Identifying New Players in Neurobiology.** *The Scientific World JOURNAL* (2007) 7(S2), 155–166. ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.2007.201.
- [93] Radha Duttagupta, Rong J et al. **Impact of Cellular miRNAs on Circulating miRNA Biomarker Signatures.** *PLoS ONE* June 2011 | Volume 6 | Issue 6
- [94] M. Kirschner et al. **Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma.** *PLoS One.* 2011;6(9):e24145.
- [95] M Ragusa, L Statello, et al. **Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in CRC after treatment with inhibitors of MAP kinases.** *Journal of Molecular Medicine*, 2012, Jun 4.
- [96] Arya M, Shergill IS et al. **Basic principles of real-time quantitative PCR.** *Expert Rev Mol Diagn.* 5(2):209-19 (2005).

- [97] Johansson MK. **Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers.** *Methods Mol Biol.* 2006;335:17-29.
- [98] Yuan JS, Reed A et al. **Statistical analysis of real-time PCR data.** *BMC Bioinformatics.* 22;7:85 (2006).
- [99] David Z. Chang, Vikas Kumar et al. **Individualized Therapies in Colorectal Cancer: KRAS as a Marker for Response to EGFR-targeted Therapy.** *Journal of Hematology & Oncology.*
- [100] Hirosha Geekiyanage. **Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease.** *Experimental Neurology* 235 (2012) 491–496.
- [101] Li.Y, J. Xu, M. Gao, Z.H. Wang, Y.Q. Yue, Z. Zhang et al. **Alterations of serum levels of BDNF-related miRNA sin patients with depression.** *PLoS ONE* (2013).
- [102] Han Rong, Tie Bang Liu et al. **MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania.** *Journal of Psychiatric Research* 45 (2011) 92e95.
- [103] Shi, W. Du. J. Qi, Y. Liang, G. Wang. T Li, S. et al **Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia.** *J. Psychiatr. Res.* 46, 198–204.2012.
- [104] Fujita E, Tanabe Y et al. **A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum.** *Neurochem.* (2012) 123, 886–894.
- [105] Sailaja Peddada, Dag H et al. **Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome.** *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 12.
- [106] Schuurs-Hoeijmakers JH, Geraghty MT, et al. **Mutations in DDHD2, encoding an intracellular phospholipase A(1), cause a recessive form of complex hereditary spastic paraplegia.** *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7;91(6):1073-81.
- [107] Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I et al. **Anorexia nervosa with regard to oligonucleotide microarray technique-own data.** *Psychiatr Pol.* 2007 May-Jun;41(3):377-86.

- [108] Mannini L, Liu J et al. **Spectrum and consequences of SMC1A mutations: the unexpected involvement of a core component of cohesin in human disease.** *Hum Mutat.* 2010 Jan;31(1):5-10. doi: 10.1002/humu.21129.
- [109] Yu Z, Fan D, Gui B et al. **Neurodegeneration-associated TDP-43 interacts with fragile X mental retardation protein (FMRP)/Staufen (STAU1) and regulates SIRT1 expression in neuronal cells.** *J Biol Chem.* 2012 Jun 29;287(27):22560-72.
- [110] C Philippe, D Amsallem et al. **Phenotypic variability in Rett syndrome associated with FOXP1 mutations in females.** *J.Med.Genet* 2010;47:59-65 doi:10.1136/jmg.2009.067355.
- [111] Rocio G Urdinguio, Jose V Sanchez-Mut et al. **Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies.** *Lancet Neurol* 2009; 8: 1056–72.
- [112] Cristina Gervasini, Silvia Russo, et al. **Cornelia de Lange Individuals With New and Recurrent SMC1A Mutations Enhance Delineation of Mutation Repertoire and Phenotypic Spectrum.** *American Journal of Medical Genetics* 2013.
- [113] Yingfang Tian, Isaac H. Liao, et al. **Exon Expression and Alternatively Spliced Genes in Tourette Syndrome** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011 January.
- [114] Ang Li, Jun Yu, Haeryoung Kim, et al. **MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls.** *Clin Cancer Res* May 22, 2013.
- [115] Hong-Wei Zheng, Yi-Long Wang et al. **Circulating MicroRNAs as Potential Risk Biomarkers for Hematoma Enlargement after Intracerebral Hemorrhage.** *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18 (2012) 1003–1011.
- [116] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. **Expression profile of microRNAs in young stroke patients.** *PLoS ONE.* 2009.
- [117] Qifeng Wang, Zhaohui Huang et al. **Plasma miR-601 and miR-760 Are Novel Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Cancer.** *PLOS ONE.* September 2012.

Bibliografia

[118] CI Jones, MV Zabolotskaya et al. **Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma.** *British Journal of Cancer* (2012) 107, 1987–1996.

[119] Honglei Wang, Wujian Peng, et al **Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus.** *Translational Research* Volume 160, Number 3 September 2012.

[120] Jason D. Arroyoa, John R et al. **Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.** *PNAS* | March 22, 2011 | vol. 108 | no. 12 | 5003–5008.