



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: NEUROSCIENZE

CICLO: XXVIII

***'MICRORNA E MOLECOLE PROTEICHE COME BIOMARCATORI
DEI SOTTOTIPI CLINICI DI SLA'***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Elena Pegoraro

Supervisore :Ch.mo Prof. Corrado Angelini

Dottoranda : Dott.ssa Valentina Pegoraro

INDICE

INDICE	3
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	5
ABSTRACT	7
ABSTRACT (italiano)	11
INTRODUZIONE	15
Aspetti generali, clinici e storici della SLA	15
SLA ed esercizio riabilitativo	18
I microRNA: introduzione e cenni storici	19
Nomenclatura dei microRNA	20
Biogenesi e meccanismi d'azione dei microRNA	21
SLA e disfunzioni nella biogenesi dei microRNA	24
Predizione dei target e metodi di validazione	25
MicroRNA circolanti	27
MicroRNA muscolari	29
Plasticità muscolare e myomiRNA	31
Regolatori dei myomiRNA	32
Giunzioni neuromuscolari e myomiRNA	33
MicroRNA infiammatori e angiogenici	35
Deregolazione dei microRNA nella patogenesi della SLA	38
Miostatina e Follistatina	39
SCOPO DELLA TESI	45
MATERIALI E METODI	47
Coorte di pazienti	47
Analisi morfometrica delle fibre	48
Estrazione di RNA da siero e da biopsie muscolari	49
Retrotrascrizione e Real-Time PCR Quantitativa	49
Saggi ELISA per la quantificazione di Miostatina e Follistatina	50
Analisi Statistica	51
RISULTATI	
1)STUDIO DI BIOMARKERS CIRCOLANTI NEL SIERO E NEL PLASMA	52
Espressione di myomiRNA nel siero	53
Espressione nel sierodei microRNA infiammatori e angiogenici	54
Espressione del miR-27a	55
Espressione quantitativa nel plasma delle proteine Miostatina e Follistatina	55
Analisi Morfometrica delle fibre muscolari	56
2)STUDIO DI BIOMARKERS IN BIOPSIE MUSCOLARI	57
Analisi morfometrica	58
Espressione dei microRNA muscolari e infiammatori nel muscolo	58

Differenze di genere dei microRNA in biopsie di pazienti SLA	59
Suddivisione di microRNA in donne con SLA a seconda dell'età	61
Sclerosi Laterale Amiotrofica e gruppi diversi di età d'esordio	63
3)STUDIO DI BIOMARCATORI SIERICI NEL CORSO DI RIABILITAZIONE	64
DISCUSSIONE	66
CONCLUSIONI.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	75
APPENDICE.....	94
Resoconto attività svolta nel triennio.....	94
Curriculum Vitae.....	98

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

- Ago: Proteine Argonate.
- AKT: Proteina chinasi B.
- C2C12: linea cellulare murina stabilizzata.
- epSPCs: Cellule Staminali Epidermali.
- GDF8: Fattore di Crescita 8.
- HDL: Lipoproteine ad alta densità.
- hnRNP: Ribonucleoproteina Nucleare.
- dsRNA: RNA a doppio filamento.
- IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1
- IL-6: Interleuchina 6.
- MAPK: Mitogen-activated protein kinase.
- MEF: Myeloid Elf-1.
- myomiR: myomiRNA.
- miR/miRNA: microRNA.
- MyoD: Myogenic Differentiation 1.
- mRNA: RNA messaggero.
- MSC: Cellule Staminali Mesenchimali.
- MVB: Corpi Multi Vescicolari.
- NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.
- NPM1: RNA-binding protein nucleophosmin 1.
- PCR: Reazione a catena della polimerasi.
- PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1.
- RhoA: Ras Homolog gene family, member A.
- Pol II: Polimerasi di tipo II.
- p27: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B.
- p53: Proteina Tumorale 53.
- RISC: Complesso che induce il silenziamento.
- SLA/ALS: Sclerosi Laterale Amiotrofica.
- SOD1: Super Ossido Dismutasi di tipo 1.
- SRF: fattore di risposta del siero.
- TDP-43: Tard DNA-Binding Protein 43.
- TGF β : Transforming Growth Factor- β .
- TLR: Toll-like receptor.
- UTR: Untranslated Region.

ABSTRACT

Background: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare, progressive, neurodegenerative disorder caused by degeneration of upper and lower motoneuron. The disease process leads to progressive muscle atrophy, weakness, fasciculations and spasticity. About two-thirds of ALS patients have a spinal form of the disease (spinal ALS), which involves the limbs. The spinal ALS has an upper or lower limb onset that starts with weakness and muscle atrophy in hands or feet whereas one-thirds of patients have a bulbar onset (bulbar ALS) usually presenting with dysarthria and dysphagia. The spinal ALS leads to death after 3-5 years from onset while the bulbar ALS die about after 2-3 years from onset. Incidence and prevalence of ALS are higher in men than in women. Male e female gender influences the clinical features of the disease: man have a greater likelihood spinal regions onset whereas women have onset at an older age. The effects of physical exercise and rehabilitation in patients with ALS are still debated: if a patient is inactive, the loss of exercise or muscle training leads to muscle atrophy and disuse that contribute to deterioration in addition to the weakness and muscle atrophy caused by denervation.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules (19-24 nucleotides), highly conserved, which regulate genes expression at the post transcriptional level. The up-regulation of a specific miRNA determines decreasing expression of the corresponding protein product.

Aim: The aim of this work is the identification of new molecular and biochemical biomarkers to facilitate the study of the various subtypes of ALS. We will study if they provide information on the onset and severity of disease and they might be used as indicators of a therapeutic response in rehabilitation. We will investigate the levels of both muscle-specific (myomiRNAs) and inflammatory/angiogenic microRNAs and other molecular signatures (Myostatin, Follistatin). MicroRNAs will

be analyzed and compared with morphometric study in muscle biopsies of ALS patient and controls. In serum, we will investigate the difference between spinal and bulbar ALS whereas, in muscle we will analyze the difference between male and female patients and in the effect of different age of onset of the disease on microRNAs.

Methods: In 14 ALS patients (10 spinal and 4 bulbar) we measure the serum levels of muscle-specific miR-1, miR-206, miR-133a/b, miR-27a and the inflammatory miRNAs miR-155, miR-146a, miR-221 and miR-149*, and the expression of Myostatin and Follistatin, which are two antagonist regulator of the muscle growth. Morphometric analysis of muscle fiber size is done to correlate muscle atrophy with biochemical-molecular parameters. In 16 muscles ALS biopsies (9 male and 7 female) we analyze the levels of myomiRNAs and inflammatory miRNAs. The circulating levels of myomiRNAs are analysed also in 12 ALS patients (8 male and 4 female) after rehabilitation treatment of 8 weeks in IRCCS San Camillo (Venice).

Results: In ALS patients the expression of serum miR-206 and miR-133 is significantly ($p < 0.005$) increased and miR-27a is significantly ($p < 0.005$) reduced compared to control, also the miRNA profile is significantly higher between spinal versus bulbar ALS. Myostatin/Follistatin ratio was significantly higher in ALS versus control and are higher in bulbar versus spinal ALS. Bulbar ALS patients present more pronounced muscle atrophy than spinal ALS, as documented by our muscle fiber morphometric analysis. In patients ALS biopsy all miRNAs we measured are strongly up-regulated in ALS patients versus control, with the exception of miR-149*. A strong up-regulation ($p < 0.0001$) of all miRNAs is present in male versus female ALS biopsies and in group of ALS patients with age of onset below 55 versus the group of older patients. In serum after 8 weeks of rehabilitation myomiRNAs result down-regulated indicating an active proliferation of satellite cells in muscle and increased neuromuscular junctions.

Conclusion: Muscle mass regulators are particularly down-expressed in bulbar ALS, suggesting a more rapid and diffuse muscle atrophic process. Similar results were obtained on Myostatin/Follistatin ratio. The differences in this regulators between clinical subgroups of ALS patients, in serum and in muscle, may suggest a possible differential role of miRNAs in the pathogenetic occurrence of muscle atrophy in motoneurons disease. Furthermore our data suggest that miRNAs are good indicators of muscle recovery in response to rehabilitation conducted for eight weeks consisting of aerobic exercise.

ABSTRACT (ITALIANO)

Background: La SLA è una malattia rara, neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni del midollo spinale, del tronco e della corteccia motoria. La perdita dei motoneuroni porta ad atrofia muscolare, debolezza muscolare, fascicolazioni e spasticità. Circa due terzi dei pazienti con SLA presentano una forma spinale della malattia che comincia sia dagli arti superiori che inferiori e sintomi associati a stanchezza con atrofia muscolare. Un terzo dei pazienti presentano un esordio bulbare della malattia che si manifesta inizialmente con disartria e disfagia per solidi e liquidi (paralisi bulbare progressiva). Nella maggior parte dei casi la forma spinale porta a decesso dopo 3-5 anni mentre la paralisi bulbare dopo una media di 2-3 anni. L'incidenza della SLA è riportata maggiore negli uomini che nelle donne. Il sesso influenza alcune caratteristiche fenotipiche della malattia tra cui l'età e il sito d'esordio e alcune caratteristiche cliniche. Gli effetti dell'esercizio fisico e della riabilitazione in pazienti affetti da SLA sono ancora dibattuti: se un paziente è inattivo, la perdita di allenamento e il disuso portano all'atrofia muscolare, che si va a sommare alla debolezza e all'atrofia muscolare causata dalla denervazione e dalla degenerazione dei motoneuroni. I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA (19-24 nucleotidi) a singolo filamento, non codificanti, altamente conservati nel corso dell'evoluzione che regolano finemente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. L'up-regolazione di uno specifico microRNA determina un decremento dell'espressione del prodotto proteico corrispondente.

Scopo: L'obiettivo di questo lavoro è l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari e biochimici che facilitino lo studio dei vari sottotipi di SLA, che diano informazioni su insorgenza e gravità di malattia e che possano essere utilizzati come indicatori di risposta in trials clinico-riabilitativi. Abbiamo studiato i livelli di espressione dei miRNA muscolo-specifici e infiammatori/angiogenici e altre

molecole proteiche (Miostatina/Follistatina). L'analisi dei miRNA è stata comparata con la morfometria delle fibre muscolari. Nel siero, in particolare, abbiamo indagato le differenze tra pazienti ad esordio spinale e pazienti ad esordio bulbare mentre, nel muscolo, abbiamo analizzato le differenze tra maschi e femmine e tra pazienti con diversa età d'esordio.

Metodi: In 14 pazienti SLA (10 spinali e 4 bulbari) abbiamo misurato i livelli sierici dei miRNA muscolo-specifici miR-1, miR-206, miR-133a/b, miR-27a e dei miRNA infiammatori miR-155, miR-146a, miR-221 e miR-149* e l'espressione della Miostatina e della Follistatina, due fattori regolatori antagonisti della crescita muscolare. L'analisi morfometrica delle fibre è stata correlata all'atrofia muscolare misurata con parametri biochimici molecolari. In 16 biopsie muscolari di pazienti SLA (9 maschi e 7 femmine) sono stati analizzati i livelli dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori. I livelli circolanti dei myomiRNA sono stati analizzati anche in 12 pazienti SLA (8 maschi e 4 femmine) dopo trattamento riabilitativo di 8 settimane.

Risultati: Nei pazienti SLA c'è un incremento significativo ($p < 0.005$) dei livelli sierici del miR-206, miR-133 mentre il miR-27a è significativamente ($p < 0.005$) ridotto confrontato con i controlli e anche tra pazienti spinali e bulbari. Il rapporto Miostatina/Follistatina risulta più alto nei pazienti SLA rispetto ai controlli, simili dati si riscontrano in pazienti SLA ad esordio bulbare rispetto a pazienti con esordio spinale. I pazienti con SLA bulbare presentano un grado più alto di atrofia muscolare rispetto ai pazienti con SLA spinale documentato dall'analisi morfometrica delle fibre. Nelle biopsie muscolari di pazienti SLA tutti i miRNA presi in esame risultano fortemente up-regolati ($p < 0.0001$) nei pazienti rispetto ai controlli ad eccezione del miR-149*. Vi è una up-regolazione significativa ($p < 0.0001$) di tutti i miRNA nei maschi rispetto alle femmine e nei pazienti con una età d'esordio sotto i 55 anni rispetto al gruppo di pazienti più vecchi. Dopo 8 settimane di riabilitazione tutti i myomiRNA risultano down-regolati.

Conclusioni: I microRNA e altre molecole proteiche (Miostatina/Follistatina) risultano particolarmente down-regolati nei pazienti con SLA bulbare, suggerendo così il risultato di un processo atrofico muscolare più rapido e diffuso. Le differenze osservate nei sottogruppi di pazienti SLA, nel siero e nelle biopsie muscolari, potrebbero suggerire un possibile ruolo differenziale dei miRNA negli eventi patogenetici della malattia dei motoneuroni. Inoltre i nostri dati suggeriscono che i myomiRNA rappresentano possibili indicatori di recupero muscolare in risposta alla riabilitazione.

INTRODUZIONE

ASPETTI GENERALI, CLINICI E STORICI DELLA SLA

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), nota anche, in Europa, come malattia di Charcot (in memoria del medico francese che la descrisse per primo) o dagli americani come morbo di Lou Gehrig (dal nome di un giocatore di baseball la cui malattia sollevò l'attenzione pubblica nel 1939) (Pratt et al.; 2012) è stata descritta per la prima volta nel 1860 (Charcot et al.; 1869) e costituisce la malattia dei moto neuroni più frequente nella popolazione adulta (Ma et al.; 2015).

La SLA è una malattia rara, progressiva, neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni del midollo spinale, del tronco e della corteccia motoria. La perdita dei motoneuroni porta ad atrofia muscolare, debolezza muscolare, fascicolazioni e spasticità (Robberecht and Philips; 2013).

L'incidenza della malattia è di circa 1/ 20000 abitanti. La malattia si presenta nella maggior parte dei casi come forma sporadica (S-ALS), mentre solo nel 10-15% dei casi come forma familiare (F-ALS) (Volonté et al.; 2015). Sono conosciuti numerosi geni correlati alla SLA però le mutazioni da sole non possono spiegare l'esistenza di numerosi casi idiopatici e la neurodegenerazione (Paez-Colasante et al.; 2015). La maggior parte dei casi familiari è dovuta alla mutazione di quattro geni: C9ORF72, SOD1, TARDBP e FUS (Volonté et al.; 2015) Circa un quinto dei casi di F-ALS sono attribuiti a mutazioni nel gene SOD1 (Boillee et al.; 2006) che codifica per la proteina super ossido dismutasi di tipo 1, un enzima fondamentale per la cellula implicato nei meccanismi di difesa contro gli agenti ossidanti, che agisce convertendo i radicali super ossidi in perossido di idrogeno e ossigeno (Su et al.; 2014). La proteina SOD1 difettosa forma aggregati proteici tossici per il motoneurone (Okado-Matsumoto et al.; 2002) e, sequestrata negli aggregati proteici, fa diminuire la sua presenza nel nucleo della cellula nervosa. Questo

causa una maggiore sensibilità del DNA ai danni provocati dagli agenti ossidanti (Turner et al.; 2010). Le proteine TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) e FUS sono membri della famiglia delle ribonucleoproteine nucleari (hnRNP), entrambe sono proteine nucleari che legano l'RNA e lo trasportano tra il nucleo e il citoplasma, coinvolte nella trascrizione, splicing e trasporto del messaggero (Voigt et al.; 2010, Yamazaki et al.; 2012). Nella SLA le proteine mutate TDP-43 e FUS si associano all' mRNA portando a fosforilazioni, ubiquitinazioni, all'aggregazione di proteine (Johnson et al; 2009) e alla formazione delle tipiche inclusioni granulari (Droppelmann et al.; 2014). La maggiore causa di SLA genetica e demenza fronto temporale è causata dalla ripetizione dell'espansione esanucleotide (GGGGCC)_n nell'introne uno del gene C9ORF72, posto sul cromosoma 9p21 (Renton et al.; 2011).

La SLA sporadica è spesso correlata a fattori ambientali, all' esposizione a pesticidi e metalli pesanti (Paez-Colasante et al.; 2015). Alcuni aspetti clinici della malattia sono molto simili nella forma familiare e in quella sporadica, salvo la precocità della forma familiare.

Circa due terzi dei pazienti con SLA presentano una 'forma spinale' della malattia (Brooks et al., 2000) che comincia dagli arti superiori od inferiori e sintomi associati a stanchezza con atrofia muscolare. La spasticità progredisce dagli arti inferiori causando (nella variante denominata di Patrikios) un graduale indebolimento e atrofia degli arti, con effetti clinici, nelle forme con coinvolgimento del primo motoneurone, sia sulle abilità manuali che nella marcia. I pazienti che presentano un esordio bulbare della malattia manifestano inizialmente disartria e disfagia per solidi e liquidi (Brooks et al., 2000). Nella maggior parte dei casi la paralisi progressiva bulbare causa la morte per insufficienza respiratoria dopo una media di 2-3 anni, nei casi ad esordio bulbare, mentre la SLA spinale porta a decesso dopo 3-5 anni, nei casi ad esordio spinale, ma esiste una grande variabilità nella durata clinica della malattia con alcuni pazienti che muoiono dopo pochi mesi dall'esordio ed altri che sopravvivono per più di vent'anni (Robberecht and Philips;

2013). L'incidenza della SLA è maggiore negli uomini che nelle donne (3: 1) (Rosen 1978), ma alcuni autori sottolineano una riduzione graduale nel rapporto di genere con l' aumento dell' età e, con una conseguente predominanza femminile sopra gli ottant'anni (Blasco et al.; 2012). Il sesso influenza alcune caratteristiche fenotipiche della malattia: l'età e il sito d'esordio e alcune caratteristiche cliniche. L'uomo tende a presentare una maggiore probabilità di insorgenza di malattia nelle regioni spinali mentre le donne hanno insorgenza in età più avanzata nella regione bulbare (Pamela et al., 2010, Blasco et al.; 2012). Mentre l'eziologia della SLA rimane ancora sconosciuta, la morte dei motoneuroni si verifica come il risultato di una complessa interazione tra meccanismi genetici e ambientali e l'attivazione di meccanismi patogenetici compreso lo stress ossidativo, disregolazione dei processi dell' RNA, disfunzioni mitocondriale, aggregazione proteica, esocitotossicità, problemi nel trasporto assonale e infiammazione (Toivonen et al.; 2014, Scaramozza et al.; 2014). I processi patogenetici coinvolgono sia i motoneuroni che le cellule non neuronali, come astrociti, microglia e, probabilmente, il muscolo scheletrico. L'atrofia muscolare nella SLA è associato ad una perturbazione nel controllo del 'network molecolare' di alcuni processi attinenti alla funzione muscolare, compresa l'autofagia, l'omeostasi mitocondriale e la rigenerazione muscolare (Toivonen et al.; 2014, Scaramozza et al.; 2014). Pertanto, alterazioni strutturali e metaboliche nel muscolo scheletrico, possono aggravare il decorso della malattia.

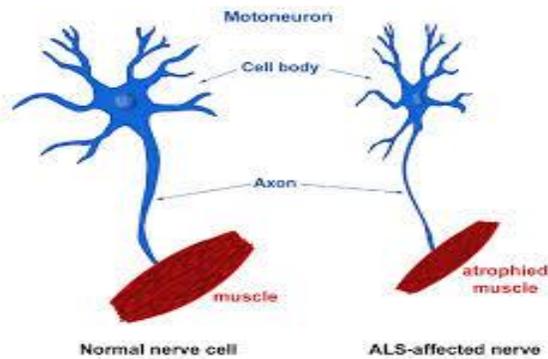


Figura 1: *Motoneurone Sano (sinistra) e affetto da SLA (destra).*

SLA ED ESERCIZIO RIABILITATIVO

Gli effetti dell'esercizio fisico e della riabilitazione in pazienti affetti da SLA sono ancora dibattuti. Un moderato e regolare esercizio fisico è sostenuto nella cura di molte malattie neuromuscolari (Aitkens et al.; 1993). Tuttavia ai pazienti ammalati di SLA spesso è raccomandato di evitare l'esercizio fisico per preservare la forza muscolare e minimizzare gli effetti del sovraccarico muscolare. Questa raccomandazione si basa su studi epidemiologici che mostrano un' alta incidenza di malattia in persone che svolgono un'intensa attività fisica come, ad esempio, nel caso dei calciatori (Chio et al.; 2009, Beghi et al.; 2010). Il ruolo dell'esercizio fisico dopo l'esordio della malattia è stato poco studiato. Nel modello di topo SLA si è visto che l'attività fisica non influenza la sopravvivenza (Gurney et al.; 1996). Una moderata e regolare attività fisica mostra un effetto temporaneo positivo sui sintomi della malattia (Drory et al.; 2001) e procura un miglioramento nel punteggio funzionale di disabilità (Bello-Haas et al.; 2007). In un altro studio, condotto in pochi pazienti SLA con insufficienza respiratoria, l'esercizio ha rallentato il deterioramento clinico della malattia (Pinto et al.; 1999).

Nelle persone sane una regolare attività fisica aiuta a mantenere una buona qualità di vita tenendo in forma sia l'apparato neuromuscolare, con una diminuzione del senso di fatica (Waling et al.; 2000), che la mente. La fatica e il dolore muscolare sono due sintomi comuni nei pazienti SLA (Sharma et al.; 1995) che hanno un effetto negativo sulla qualità di vita di queste persone. Un regolare esercizio a carattere riabilitativo potrebbe far diminuire il dolore e la fatica di origine muscolo-scheletrica. Se un paziente è inattivo, la perdita di allenamento e il disuso portano all'atrofia muscolare, che si va a sommare alla debolezza e all'atrofia muscolare causata dalla denervazione e dalla degenerazione dei motoneuroni nella SLA. Ipotizziamo che la reversione dell'atrofia muscolare dovuta all'esercizio fisico possa aumentare la funzione trofica muscolare e fornire un migliore stimolo per la formazione di nuove sinapsi.

I MICRORNA: INTRODUZIONE E CENNI STORICI

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA (19-24 nucleotidi) a singolo filamento, non codificanti, altamente conservati nel corso dell'evoluzione, e possiedono un'elevata specificità di tessuto e dei vari stadi di sviluppo. Regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Bhaskaran and Mohn; 2014) mediante appaiamento con specifici RNA messaggeri (mRNA), portando a degradazione o impedendo la traduzione nel corrispondente prodotto proteico. L'up-regolazione di uno specifico microRNA determina un decremento dell'espressione del prodotto proteico corrispondente. Studi hanno dimostrato che molti geni codificanti proteine umane sono regolati dai miRNAs, indicando che i miRNAs sono "master regulators" di molti importanti processi biologici.

La scoperta del primo miRNA risale al 1993 quando Lee e collaboratori (Lee et al.; 1993) condussero uno studio su lin-4, gene noto per il controllo sullo sviluppo larvale del nematode *Caenorhabditis elegans*. Essi scoprirono che l'abbondanza

della proteina LIN14 in *C. elegans* era regolata dal prodotto di un piccolo RNA codificato dal gene *lin-4*. Questa scoperta non fu presa in piena considerazione fino all'anno 2000 quando, sempre in *C.elegans*, fu individuata una seconda piccola molecola di RNA codificata dal gene *lin-7*, che presenta ortologi sia in *Drosophila* che nell'uomo, con azione repressiva del gene *lin-41* (Reinhart et al.; 2000). Questa scoperta rivelò che anche gli RNA possono giocare un ruolo chiave nella regolazione della sintesi proteica. Tali piccoli RNA furono chiamati microRNA e furono individuati anche negli animali e nelle piante. E' solo negli ultimi anni che i microRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando la loro importanza nella modulazione dell'espressione genica. Essi sono coinvolti nella maggior parte dei processi fisiologici della cellula quali ad esempio la crescita cellulare, la proliferazione, il differenziamento, la divisione cellulare e l'apoptosi. Hanno un ruolo chiave nella risposta allo stress e nella comunicazione cellulare. Le predizioni bioinformatiche indicano che i microRNA dei mammiferi potrebbero regolare più del 30% di tutte le proteine codificate dai geni (Lewis et al.; 2005).

NOMENCLATURA DEI MICRORNA

I microRNA vengono annotati con un sistema di catalogazione univoco (mbros et al.; 2003). Ogni microRNA viene identificato dal prefisso ' miR ' seguito da un trattino ' - ' e da un numero (es. miR-1; ...). Molto spesso questo è preceduto da tre lettere iniziali che indicano l'organismo (es. hsa per *Homo sapiens*, cel per *Caenorhabditis elegans*...). Sequenze di miRNA maturi identici che originano da diverse sequenze precursorie sono identificate con un suffisso numerico diverso (ad es. hsa-miR-219-1 e hsa-miR-219-2) mentre, sequenze mature che differiscono per 1 o 2 nucleotidi sono nominate con un suffisso letterale diverso (ad. es. hsa-miR-133a e hsa-miR-133b). Quando il miRNA maturo deriva dal

filamento opposto del precursore questo viene identificato con lo stesso numero ma seguito da un asterisco (*). Nel caso in cui non sia possibile determinare il filamento predominante si aggiungerà il suffisso 5p (per estremità 5') o 3p (per estremità 3') (Bhaskaran and Mohan; 2014).

BIOGENESI E MECCANISMI D'AZIONE DEI MICRORNA

I geni per i microRNA possono essere localizzati nel genoma, singolarmente o in cluster, in regioni intergeniche o in sequenze introniche di specifici geni (Rodriquez et al.; 2004). Circa il 50% dei loci dei miRNA nei mammiferi sono in stretta vicinanza con altri miRNA e, spesso, questi cluster di microRNA sono trascritti come singola unità trascrizionale policistronica (Lagos-Quintana et al.; 2003) mentre, in rari casi, tali microRNA vengono trascritti in modo individuale da promotori separati. Il processo di biosintesi che porta alla formazione di microRNA maturi è illustrato in Figura 2:

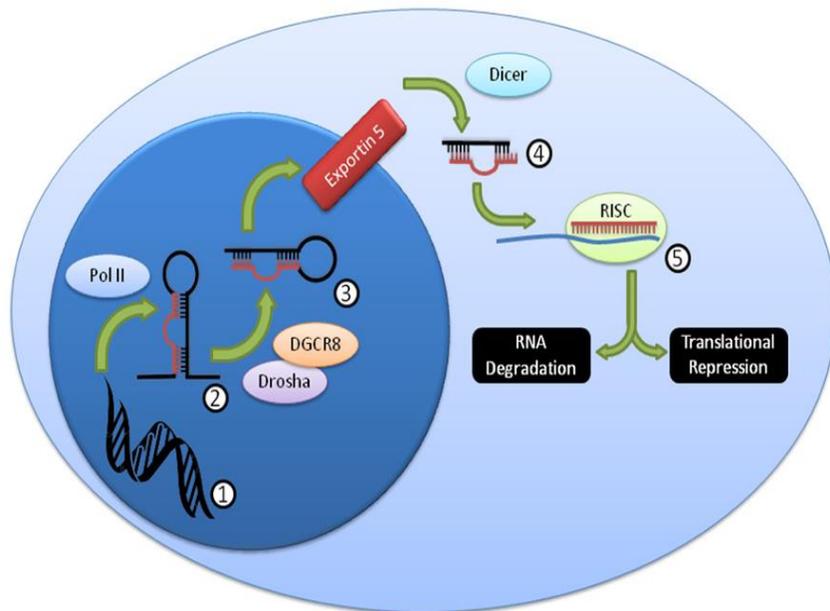


Figura 2: Rappresentazione schematica della Biogenesi dei microRNA.

Nel pathway classico i microRNA vengono codificati nel nucleo dalla RNA polimerasi II (Pol II), sotto forma di lunghi trascritti primari caratterizzati da una complessa struttura a forcina (pri-miRNA). Quest'ultimi vengono nuovamente processati nel nucleo dal Microprocessore, un grosso complesso che include Rnasi di tipo III (Drosha) e dal suo cofattore DGCR-8, a formare un microRNA precursore (pre-miRNA), a forma di forcina imperfetta, della lunghezza di circa 70-120 nucleotidi (Bhaskaran and Mohan; 2014). Il pre-miRNA viene trasportato dal nucleo al citoplasma attraverso un meccanismo mediato dall' Esportina 5 , un trasportatore della famiglia delle RAN-GTPase, dove subisce un ulteriore step di maturazione ad opera dell'Rnasi di tipo III Dicer, con la formazione di un piccolo RNA a doppio filamento (dsRNA) della lunghezza di circa 22 nucleotidi contenente sia il filamento del microRNA maturo (miRNA) che il suo complementare (miRNA*). Successivamente il dsRNA viene legato alle proteine Argonaute (Ago) ed incorporato nel complesso multiproteico RISC (complesso che induce il silenziamento) (Schwarz et al.; 2003). Uno dei due filamenti, filamento guida,

rimarrà legato alle proteine Argonaute costituendo il miRNA maturo mentre l'altro filamento, filamento passeggero, verrà degradato ad opera di un enzima con attività elicastica o, in rari casi verrà associato con le proteine Ago fungendo da miRNA funzionale.

All'interno del complesso proteico RISC il miRNA maturo sarà in grado di appaiarsi a sequenze complementari presenti nella regione 3' UTR di RNA messaggeri (mRNA) e di regolarne l'espressione genica a livello post-trascrizionale, prevalentemente, tramite due meccanismi che variano a seconda del grado di complementarietà tra il miRNA e il suo sito bersaglio. I microRNA che presentano complementarietà perfetta con mRNA target, meccanismo che di solito avviene nelle piante, ne determinano la degradazione; al contrario, quando la complementarietà delle basi è imperfetta, meccanismo che avviene prevalentemente negli animali, si avrà blocco della traduzione, senza degradazione dell'mRNA (Filipawicz et al.; 2008). In questo meccanismo è stato osservato che la sequenza dei primi 7-8 nucleotidi che si trovano al 5' del microRNA, denominata seed sequence, si appaia in modo perfettamente complementare con il sito 3' UTR del mRNA bersaglio e ciò è fondamentale per la corretta azione dei microRNA.

Sono stati proposti altri meccanismi d'azione: i microRNA possono aumentare la velocità di deadenilazione dell' mRNA e provocare una più rapida degradazione del trascritto (Wu et al.; 2006). Raramente possono essere coinvolti nella metilazione del DNA ed essere implicati nelle modifiche agli istoni a livello di specifici siti di promozione dell'espressione genica (Hawkins and Morris; 2008). E' stato dimostrato, inoltre, che i microRNA possono funzionare da 'esche' e interferire con la regolazione e il funzionamento delle proteine legando l' mRNA senza aver bisogno della seed sequence (Eiring et al.; 2010) e che possono legarsi sia alla regione 3' UTR che alla regione 5' UTR, diversamente da quanto creduto inizialmente (Lytle et al.;2007). In alcuni casi i microRNA possono fungere anche da attivatori della trascrizione dell' mRNA (Vasuolevan; 2012).

I microRNA non sono esenti a mutazioni che agiscono in cis, regolazioni post-trascrizionali e cambiamenti nel processo di biogenesi. Tutte queste variabili possono originare cambiamenti ereditabili nel genoma con conseguenze drammatiche. Ogni passaggio implicato nella biogenesi e nella regolazione dei microRNA costituisce un punto critico nel corretto processo di formazione del microRNA maturo ed è altamente regolato (Volonté et al.; 2015). Ad esempio, un fattore di controllo è costituito dalla corretta sequenza di ripiegamento del Pri-miRNA, con la sua tipica struttura a forcina imperfetta, che guida l'azione concertata di specifiche proteine che legano RNA (Zeng Y et al.; 2005).

Variazioni nel numero di copie e polimorfismi nei geni implicati nel pathway di biogenesi dei miRNA possono contribuire alla patofisiologia di parecchi organi o tessuti. In aggiunta, mutazioni e polimorfismi genetici sul sito di riconoscimento al 3' UTR dell' m-RNA target possono influenzare l'attività del miRNA maturo non permettendo l'attacco al suo sito di legame e/o creando una sequenza di legame per un altro e, causando in questo modo, una down-regolazione o l'accumulo di una particolare proteina (Jurm et al.; 2011). Tutte queste situazioni, che implicano una deregolazione nel normale processamento e funzionamento dei microRNA, possono portare a gravi situazioni patologiche.

SLA E DISFUNZIONI NELLA BIOGENESI DEI MICRORNA

Recentemente le proteine TDP43 e FUS/TLS sono state identificate in associazione con componenti che prendono parte al pathway di biogenesi dei microRNA. Inizialmente TDP43 era stata identificata solamente come una proteina minore associata al complesso multienzimatico Drosha mentre, più recentemente, si è visto che, durante il differenziamento neuronale in cellule umane, TDP43 è essenziale nel processo di biogenesi dei microRNA poiché controlla la stabilità di Drosha e di conseguenza la produzione dei miRNA (Di Carlo et al.; 2013).

Esperimenti di silenziamento genico hanno dimostrato che TDP43 modula i livelli di espressione di due miRNA: miR-let7b e miR-663 legandosi alla loro sequenza o agli elementi precursori (Buratti et al.; 2010).

TDP-43 agisce sul processo di maturazione dei miRNA non solo nel nucleo, dove opera sulla formazione del pre-miRNA, facilitando il legame di Drosha al pre-miRNA, ma anche nel citoplasma dove è associata al complesso Dicer (Kawahara e Mieda-Sato; 2012).

Anche FUS/TLS influenza la biogenesi di numerosi microRNA, molti dei quali hanno un ruolo nella sinaptogenesi e nel differenziamento neuronale, facilitando il reclutamento co-trascrizionale di Drosha (Morlando et al.; 2012).

Inoltre numerosi miRNA sono controllati sia da TDP43 che da FUS/TLS e, questi, sono stati trovati deregolati nel liquido cerebrospinale e in linee cellulari linfoblastoidi di pazienti affetti da SLA, sia familiare che sporadica (Freischmidt et al.; 2013), suggerendo che la deregolazione nel processo di biogenesi dei miRNA possa essere un meccanismo comune delle diverse forme genetiche di malattia (Volonté et al.; 2015).

PREDIZIONE DEI TARGET E METODI DI VALIDAZIONE

Negli ultimi anni è diventato sempre più importante il ruolo di fine regolazione dei microRNA nei processi di sviluppo, nel controllo dei tessuti nella fisiologia e nella risposta a stress e danni cellulari. A tal scopo, l'individuazione e la caratterizzazione dei bersagli e dei pathway molecolari regolati dai microRNA rappresenta un passo fondamentale per capire il loro ampio spettro d'azione. Insieme ad una accurata analisi genetica è necessario eseguire un'analisi computazionale ed una successiva analisi funzionale in vitro. L'analisi di predizione dei target biologici prevede l' utilizzo di algoritmi bioinformatici quali TargetScan, miRanda, PicTar ed altri. Tali algoritmi si basano su programmi di allineamento che

consentono di individuare sequenze conservate di 7 nucleotidi che presentano un'elevata stabilità termodinamica, sono altamente complementari alle *seed sequence* dei miRNA e restituiscono punteggi tra 0 e 100, dove 100 rappresenta perfetta complementarietà mentre 0 nessuna. Questi approcci computazionali sono molto validi nelle piante dove il miRNA e l'mRNA target sono perfettamente complementari, ma sono meno predittivi nei mammiferi dove la complementarietà non è perfetta ed è interrotta da *gap* e *mismatches* che fanno crescere il numero di falsi positivi (Brennecke et al.; 2005). Per tale motivo l'analisi di predizione dovrà essere seguita da un'analisi funzionale in vitro che verifichi l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei miRNA e , da studi con gene reporter per dimostrare l'azione diretta tra il miRNA ed il sito complementare presente nel 3' UTR dell' mRNA bersaglio. Dato che un singolo miRNA ha la possibilità di regolare centinaia di mRNA target, questi approcci classici sono uniti ad analisi '*high-throughput*' di '*genome-wide profiling*'. Queste tecniche associano l'isolamento del target tramite immunoprecipitazione con profili trascrizionali di *next generation sequencing*.

MICRORNA CIRCOLANTI

Studi recenti hanno dimostrato la presenza extracellulare dei microRNA in diversi fluidi corporei quali ad esempio siero, plasma, saliva, urina, lacrime (Bhaskaran and Mohan; 2014). La funzione e l'origine di questi microRNA non è ancora nota. Alcune ricerche suggeriscono che potrebbero avere un ruolo chiave nella comunicazione cellulare (Etheridge et al.; 2011) ed essere attivi nella risposta a stress intra ed extra cellulari. I *microRNA circolanti* sono stabili e resistenti all'attività delle Rnasi, a bruschi cambiamenti di temperatura e a pH estremi (Chen et al.; 2008). Dato che i fluidi corporei contengono numerose ribonucleasi si pensa che i microRNA siano inglobati all'interno di strutture che li proteggono dalla degradazione (Zhu and Fan; 2011). Altre possibilità includono la protezione attraverso modifiche chimiche o l'associazione con complessi proteici.

E' stato proposto che i microRNA extracellulari possano essere trasportati in circolo attraverso vari meccanismi (Figura n. 3):

- Piccole vescicole di membrana (microvescicole ed endosomi): I pre-miRNA, dopo essere stati trascritti nel nucleo e trasportati nel citoplasma, possono essere associati con microvescicole ed esosomi (Cortez et al.; 2012). Generalmente gli esosomi possono essere formati attraverso gemmazione interna delle membrane endosomiali, dando origine a corpi multivescicolari intracellulari (MVB) che poi si fondono con la membrana plasmatica, rilasciando gli esosomi all'esterno (Thery; 2002). I miRNA possono essere donati dagli esosomi alle cellule riceventi e svolgere attivamente la loro funzione.
- Corpi apoptotici: in uno studio del 2009 (Zernecke et al.; 2009) sono stati trovati dei corpi apoptotici di cellule endoteliali ricchi di miR-126. L'incubazione di questi corpi apoptotici con cellule ombelicali (HUVEC) ha

comportato il trasferimento del miR-126 in cellule riceventi e la produzione di chemochine anti-infiammatorie attraverso l'inibizione del gene RGS16, un bersaglio noto del miR-126.

- Trasporto proteina-mediato: recentemente è stato dimostrato che la maggior parte dei miRNA presenti nel torrente sanguigno non vengono incapsulati da vescicole, ma associati a complessi proteici. A questo proposito è stato visto che l'RNA-binding protein nucleophosmin 1 (NPM1) può avere un ruolo nell'esportazione, l'imballaggio e la protezione dei miRNA extracellulari (Wang et al.; 2010). Inoltre i microRNA circolanti possono essere complessati con lipoproteine ad alta densità (HDL) (Vickers et al.; 2011) o, nella maggior parte dei casi, con le proteine Ago 2 (Arroyo et al.; 2011).

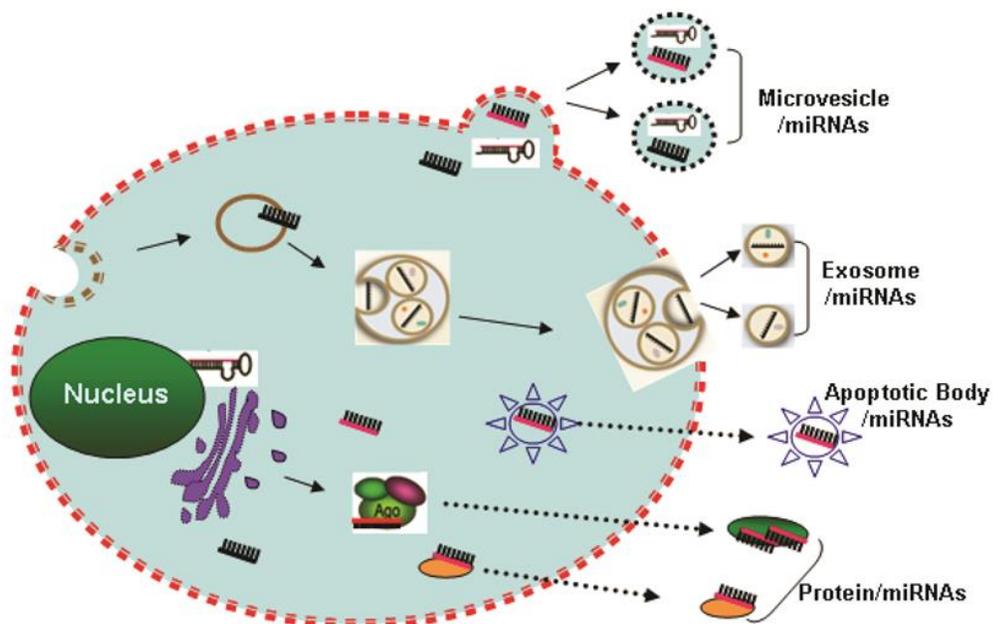


Figura 3: Meccanismi di trasporto dei microRNA (Zhu et Fan; 2011).

Numerose ricerche hanno dimostrato che i microRNA circolanti possano prender parte alla via di segnalazione paracrina (Zhu and Fan; 2011) mediante l'interazione con cellule vicine o lontane al sito di produzione e modulare, in questo modo, numerosi processi tra cui la proliferazione e la morte cellulare, l'angiogenesi, l'invasione delle cellule tumorali e la comunicazione cellula-cellula. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per chiarire il meccanismo con cui miRNA raggiungono il flusso sanguigno e l'impatto fisiologico dei miRNA circolanti nei processi cellulari a livello globale. I microRNA circolanti sono, quindi, dei potenziali buoni biomarcatori, non invasivi, nello studio di patologie umane, in quanto sono facilmente rilevabili attraverso Real-Time PCR, sono stabili e resistenti alla manipolazione e allo stoccaggio, a condizioni estreme e a numerosi cicli di congelamento e scongelamento del campione (Chen et al.; 2008).

MICRORNA MUSCOLARI

I microRNA muscolari, identificati con il nome di 'myomiRNA', hanno un ruolo centrale nello sviluppo e nella salute del muscolo scheletrico e cardiaco. I myomiRNA canonici sono costituiti da tre famiglie di microRNA: miR-1, miR-133 e miR-206 prevalentemente espresse nel muscolo cardiaco e scheletrico (Townley-Tilson et al.; 2010) e implicate nella regolazione della miogenesi, nello sviluppo muscolare e nel rimodellamento (Chen et al.; 2008).

Nell'uomo i geni codificanti i microRNA muscolari si trovano in tre cluster (miR-1-2, miR-133a-1), (miR-1-1, miR-133a-2) e (miR-133b, miR-206) e sono collocati rispettivamente sui cromosomi 18q11.2, 20q13.33 e 6p12.2 (Mitchelson and Qin; 2015). Il cluster miR-206/miR-133b compare tardi nell'evoluzione ed è espresso solamente nei vertebrati, mentre gli altri due cluster sono altamente conservati tra le specie suggerendo che questo locus

potrebbe contribuire alla complessità del muscolo scheletrico dei vertebrati, composto da tipi di fibre differenti e da cellule satelliti (Ma et al.; 2015).

I due isomeri del miR-1 hanno sequenza nucleotidica matura identica e, questa, differisce solamente di 4 nucleotidi dalla sequenza matura del miR-206. MiR-133a-1 e miR-133a-2 presentano la stessa sequenza matura e quest'ultima differisce con il miR-133b solamente di una base all'estremità 3' (Townley-Tilson et al.; 2010).

Sebbene i microRNA-1 e -206 differiscano per quanto riguarda la localizzazione cromosomica, i target specifici e la loro attivazione, essi sono strettamente correlati per quanto riguarda l'espressione e la funzione. Si è visto, infatti, che entrambi promuovono il differenziamento dei mioblasti in miotubi e la proliferazione cellulare (Townley-Tilson et al.; 2010). Al contrario, la famiglia dei miR-133 inibisce il differenziamento promuovendo la proliferazione dei mioblasti. Il miR-206 è specifico esclusivamente per il muscolo scheletrico mentre il miR-1 e miR-133 sono stati trovati anche nel muscolo cardiaco dove, sono coinvolti nel differenziamento dei cardiomiociti e nello sviluppo del cuore. Si è visto inoltre che il miR-206 e il miR-133b sono coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento delle sinapsi neuromuscolari (Williams et al.; 2009)..

I miR-133a e miR-133b presentano la stessa *seed sequence* ed hanno diversi target in comune (Mitchelson and Qin; 2015). Il miR-133a ha un ruolo chiave in tutti gli stadi di sviluppo del muscolo partendo dal differenziamento delle cellule staminali miogeniche in mioblasti (Che et al.; 2006), passando attraverso la crescita delle complesse strutture muscolari fino al mantenimento e alla protezione del muscolo maturo e nella rigenerazione muscolare dovuta a stress o traumi (Townley-Tilson et al.; 2015).

Sembra che i myomiR agiscano da regolatori muscolari e che, in condizioni normali, la loro espressione equilibrata aiuti il mantenimento, il funzionamento e l'omeostasi muscolare (Mitchelson and Qin; 2015).

PLASTICITÀ MUSCOLARE E MYOMIRNA

Il muscolo scheletrico è un tessuto uniforme composto di miofibre eterogenee per dimensioni, metabolismo e funzioni contrattili (Bassel-Duby and Olson; 2006). Le fibre muscolari possono essere classificate in:

- rapide e lente sulla base della loro cinetica di contrazione e velocità di accorciamento;
- ossidative e glicolitiche a seconda della loro attività metabolica.

Il tipo di fibra muscolare è mantenuto dai segnali nervosi ricevuti dai muscoli. E' il patrimonio genetico che determina quali motoneuroni innervano ciascuna fibra muscolare ed è solo dopo l'innervazione che le fibre muscolari si differenziano a seconda del tipo di neurone da cui vengono stimulate.

La plasticità muscolare è la capacità innata di una data fibra muscolare di adattarsi a stimoli che ne alterino la sua normale omeostasi. Le fibre muscolari si rimodellano in seguito a stimoli fisiologici (allenamento sportivo), oppure in situazioni patologiche (immobilità, invecchiamento, distrofie). Il più importante adattamento del muscolo consiste nel modificare la sua massa e questo avviene sostanzialmente per sintesi (ipertrofia) e degradazione (atrofia) delle proteine (Ma et al.; 2015). La plasticità muscolare corrisponde alla capacità di cambiare il tipo (da un fenotipo rapido-glicolitico a lento-ossidativo) o la dimensione delle fibre (atrofia o ipertrofia muscolare) (Baldwin and Haddad; 2002). In tali situazioni i muscoli possono efficientemente modificare le proprie prestazioni cambiando le proprietà contrattili e metaboliche delle fibre. La plasticità del muscolo può coinvolgere un cambiamento nella quantità di proteine, nel tipo di isoforma di proteina espressa o una combinazione di entrambi gli eventi. Le conseguenze funzionali che ne derivano dipenderanno da quali componenti della miofibra sono state modificate, in termini di quantità e qualità delle proteine espresse.

La plasticità del muscolo scheletrico è in parte influenzata dalla regolazione dei myomiRNA. Si è visto, infatti, che il miR-1 e il miR-133a giocano un ruolo chiave nei meccanismi di rimodellamento muscolare (Patthoff et al.; 2007) ed è stato osservato un decremento nei livelli di espressione di questi due microRNA nel muscolo scheletrico ipertrofico (McCarthy and Esser; 2007). Diversi studi dimostrano che anche il miR-206 è implicato nella regolazione della massa muscolare, in particolare si è visto che l'inibizione del miR-206 promuove la crescita del muscolo scheletrico tramite l'up-regolazione di IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (Yan et al.; 2013) e incrementa la larghezza dei miotubi in cellule C2C12 (Winbanks et al.; 2013). Infine il miR-206 è largamente espresso nelle fibre muscolari di nuova formazione suggerendo che questo microRNA sia implicato nella rigenerazione e maturazione del muscolo durante atrofia muscolare (Yuasa et al; 2008).

REGOLATORI DEI MYOMIRNA

Sono stati studiati numerosi regolatori dei microRNA muscolari, i meglio conosciuti sono MyoD e miogenina, due noti fattori miogenici, che agiscono regolando positivamente l'espressione dei myomiR legandosi a monte dei geni per miR-1 e il miR-133a (Rao et al.; 2006) e attivando il promotore del miR-206. Inoltre SRF, MyoD e MEF2 attivano positivamente il miR-1 nel muscolo cardiaco (Mitchelson and Qin; 2015). Al contrario la Miostatina è un repressore della miogenesi e la sua down-regolazione permette l'incremento dei livelli di espressione dei myomiR (Rachagani et al.; 2010). Probabilmente l'espressione del miR-133b e del miR-206 è finemente controllata sia dall'azione di MyoD/Miogenina che dalla Miostatina.

Recentemente è stato riportato che, in mioblasti, l'interazione della proteina TDP 43 con la famiglia miR-1/miR-206 diminuisce la loro attività, prevenendo la loro interazione con il complesso di silenziamento RISC (King et al.; 2014).

GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI E MYOMIRNA

La giunzione neuromuscolare (o placca motrice o sinapsi neuromuscolare o giunzione mioneurale) è la giunzione periferica che si forma tra una fibra nervosa (di un motoneurone) e una fibra muscolare striata scheletrica (Krause Neto et al.; 2015).

Un potenziale d'azione originatosi in un neurone motorio viaggia lungo l'assone verso le giunzioni neuromuscolari. L'assone è isolato da una guaina mielinica formata dalla membrana delle cellule di Schwann. Prima di innervare la fibra muscolare, la fibra nervosa effettrice si divide in due o più rami in corrispondenza di un nodo di Ranvier e generalmente un'unica fibra nervosa innerva molte fibre muscolari. La fibra nervosa a livello di una fibra muscolare perde il suo rivestimento mielinico, fonde la sua membrana basale con quella della fibra muscolare, costituisce una serie di espansioni a forma di bottoncino. Nella terminazione assonica l'arrivo del potenziale d'azione induce le vescicole sinaptiche a liberare acetilcolina nello spazio intersinaptico (Gonzalez-Freireet et al.; 2014). L'acetilcolina si combina con i siti recettori posti sul sarcolemma alterando la permeabilità della membrana. Questo innesca un potenziale d'azione che scorre lungo il sarcolemma della fibra muscolare e lungo i tubuli. Tutto ciò a sua volta, favorisce la liberazione di ioni Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico e la contrazione dei sarcomeri.

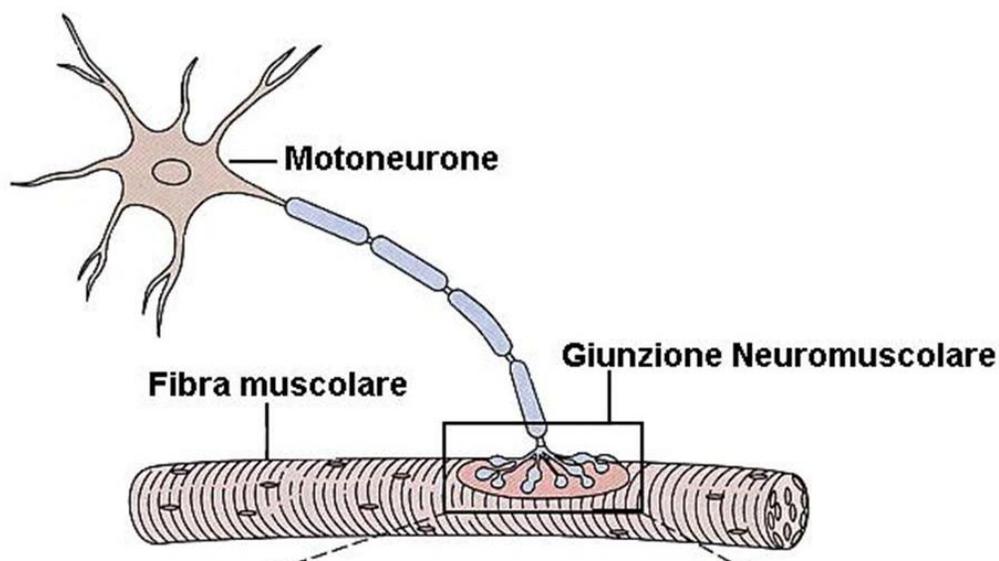


Figura 4: *Rappresentazione schematica degli elementi coinvolti nella plasticità muscolare: Motoneurone, Fibra muscolare e Giunzione Neuromuscolare.*

Numerosi studi suggeriscono un coinvolgimento del miR-206 e del miR-133b nel ripristino e nella conservazione delle giunzioni neuromuscolari. Nel muscolo dopo denervazione sono stati trovati altri livelli di questi due myomiRNA, mentre il miR-1 e miR-133a risultano down-regolati (Williams et al.; 2009). Inoltre si è notato che dopo la re-innervazione predominano le fibre glicolitiche di tipo II suggerendo che il miR-206 possa essere implicato nella determinazione del tipo di fibra, regolando l'attività del fattore di trascrizione MEF2 (Jeng et al.; 2009). Anche Valdez e collaboratori (Valdez et al.; 2014) hanno studiato nel topo il ruolo del miR-206 e del miR-133b nella riparazione delle giunzioni neuromuscolari. Essi crearono dei topi knockout per il miR-206, per il miR-133b e topi null per entrambi: i primi presentavano una

reinnervazione ridotta dopo il danno al nervo, i secondi avevano uno sviluppo e una reinnervazione normale mentre, l'ultimo gruppo, mostrava caratteristiche del tutto simili al primo, dimostrando che il miR-206 è il maggior regolatore della riparazione delle giunzioni neuromuscolari dopo un danno. Tuttavia in un altro studio non si notarono grosse differenze nel muscolo dei topi null per miR-206 rispetto al wild type, sia in condizioni normali che dopo '*injury*', ipotizzando che altri fattori, tra cui anche il miR-133b, possano sopperire a questa mancanza (Sokol; 2012). Il ruolo del miR-133b è avvalorato dall'osservazione che questo miRNA stimola la crescita dei neuriti nel cervello di ratto in seguito ad un danno al nervo, dopo trattamento con cellule MSC (Xin et al.; 2012). Gli alti livelli del miR-133b, riscontrati dopo denervazione, si suppone siano correlati alla rigenerazione del nervo.

MICRORNA INFIAMMATORI E ANGIOGENICI

I microRNA svolgono un ruolo chiave anche nella risposta immunitaria, infiammatoria e nei processi angiogenici. Di seguito verranno brevemente descritte le caratteristiche salienti dei microRNA inclusi in questo lavoro:

- **miR-155:** è un microRNA molto studiato coinvolto sia nella risposta immunitaria innata che adattativa (Rodriguez et al.;2007, O' Connell et al.; 2007). E' largamente espresso nelle cellule ematopoietiche, cellule T infiammatorie e nei monociti. Promuove via pro-infiammatoria attraverso la repressione dei mediatori anti-infiammatori (SHIP; SOCS). Porta all'incremento delle citochine pro-infiammatorie e induce l'infiammazione dei tessuti promuovendo la produzione delle cellule Th17 (cellule che proteggono il corpo dai patogeni) ed è up-regolato durante la risposta infiammatoria dei macrofagi (Murugaiyan et al.; 2011). Nella microglia il miR-155 è coinvolto nel pathway di p53 che down-regola i livelli di c-Maf, un fattore trascrizionale noto per

promuovere il differenziamento funzionale e la risposta anti-infiammatoria (Su et al.; 2015) e che nel muscolo è stato visto essere correlato positivamente con i livelli di espressione di MyoD (Serria et al.; 2003).

- **miR-146a** è stato descritto come il primo microRNA pro-infiammatorio regolato da NF- κ B (Taganov et al.; 2006), è coinvolto nell'immunità innata e opera come un regolatore a feedback negativo di TLR (Rujuan and S. Ansar Ahmed, 2011). I livelli di espressione del miR-146a sono stati trovati deregolati in diverse malattie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di Alzheimer, la malattia da prioni e la degenerazione maculare correlata all'età. (Alexandrov et al.; 2014). Si è visto che il miR-146a e il miR-155 spesso agiscono insieme nella modulazione dei vari stadi di infiammazione ed infezione durante la risposta immunitaria innata (O' Connell et al.; 2010). Il miR-146a è un regolatore negativo dell'infiammazione in quanto sopprime l'attività trascrizionale di NF- κ B mentre il miR-155 promuove la risposta pro-infiammatoria (Su et al.; 2015). Inoltre il miR-146a regola negativamente l'espressione delle citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6). Il miR-146a è stato trovato up-regolato in soggetti sani dopo esercizio fisico (Bagghish et al.; 2011).
- **MiR-221** è un microRNA X-linked implicato nella risposta immunitaria, nell'angiogenesi ed è stato descritto, anche, come miR-oncogenico. Regola la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule immunitarie (Lu et al.; 2011). Inoltre è fortemente up-regolato durante l'attivazione dei linfociti T helper (Grigoryev et al.; 2011). Gli estrogeni stimolano l'espressione di questo microRNA contribuendo alla diversa severità, legata al sesso, di alcune malattie immunitarie (Dai and Ahmed; 2014). Recentemente è stato trovato che il miR-221 ricopre un ruolo nella

miogenesi: è implicato sia nel passaggio da mioblasti indifferenziati a miociti che nel raggiungimento del fenotipo completamente differenziato (Cardinali et al.; 2009). Nelle cellule miogeniche l'espressione coordinata del miR-221 e del miR-222 è inversamente correlata con l'espressione di p27 che è un target diretto di questi microRNA nei mioblasti. E' stato descritto un meccanismo a feedback negativo tra p27 e RhoA, un regolatore pilota dell'actina citoscheletrica. L'espressione del miR-221 è controllata positivamente dal pathway di segnale Ras-MAPK che, nei mioblasti, regola negativamente l'espressione del miR-1 ed è implicato nella repressione dell'attività trascrizionale dei fattori MyoD e Miogenina.

- **MiR-149*** è un fattore pro-apoptotico, reprime l'espressione di Akt e E2F1 in cellule Hela e Be2C, attivando caspasi 3-7 (Li et al.; 2010). E' stato trovato up-regolato nel siero di soggetti sani dopo esercizio (Sawada et al.; 2013)
- **MiR-27a** è implicato in diversi processi tra cui l'infiammazione, l'angiogenesi e lo stress ossidativo. Può essere considerato un myomiRNA, in aggiunta a quelli canonici, poiché influenza alcuni importanti processi che avvengono durante la miogenesi del muscolo scheletrico: promuove la proliferazione dei mioblasti (Huang et al.; 2012) e il differenziamento (Chen et al.; 2013). La sequenza matura del miR-27a è ben conservata tra i mammiferi. Si è visto che la sequenza 3' UTR della Miostatina presenta un potenziale sito di legame per il miR-27a nel ratto, nel cane, nel cavallo, nei bovini. Nei maiali è stato dimostrato che tale microRNA regola positivamente la proliferazione dei mioblasti down-regolando la Miostatina, tramite legame alla sua regione 3' UTR (Yang et al.; 2014). Un recente studio propone un nuovo meccanismo a feed-back negativo nel quale la

Miostatina, attraverso la via di segnale di Smad3, incrementa l'espressione del miR-27a/b che a sua volta regola negativamente l'espressione della Miostatina (McFarlane et al.; 2014). Pertanto, il miR-27a/b, attraverso la regolazione negativamente della Miostatina, gioca un ruolo nel promuovere l'attivazione delle cellule satellite, la proliferazione dei mioblasti e nel prevenire l'atrofia muscolare.

DEREGOLAZIONE DEI MICRORNA NELLA PATOGENESI DELLA SLA

Nella SLA è stato ampiamente studiato il ruolo di biomarcatori correlati alla neurodegenerazione, all'infiammazione, all'angiogenesi e allo stress ossidativo. Il miR-27a, miR-155, miR-142-5p, miR-223 e miR-523-3p sono largamente espressi nei pazienti SLA e il miR-27b, miR-146a e miR-532-3p sono elevati nel liquido cerebro-spinale (Butovsky et al.; 2012). Inoltre i livelli di espressione del miR-338-3p sono correlati con la durata di malattia. Nei progenitori delle cellule staminali epindemali (epSPCs) del modello di topo SLA SOD1-G93A il miR-9, miR-124a, miR-19a e miR-19b sono differenzialmente espressi (Marcuzzo et al.; 2014). In particolare il miR-9 è controllato spazialmente e temporalmente nel midollo spinale, mostrando una up-regolazione durante la fase pre-sintomatica o negli stadi iniziali di malattia nella materia grigia (Zhou et al.; 2013). E' stato proposto che le normali funzioni neuronali necessitino di costanti livelli di miR-9 e che una sua deregolazione, sia positiva che negativa, porti alla neurodegenerazione (Volonté et al.; 2015).

Pochi studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo dei microRNA nel deterioramento muscolare nella SLA. In biopsie di muscolo SLA l' up-regolazione del miR-23 porta all'inibizione di PGC-1alpha (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1) (Russell et al.; 2012) che è

coinvolto nella biogenesi e funzionamento mitocondriale del muscolo (Cozzolino et al.; 2013). In un altro studio, condotto sul modello murino di SLA, si è visto che il miR-206 è fortemente indotto all' esordio dei sintomi neurologici della malattia. Nel topo knockout per miR-206 si è notata una accelerazione della progressione di malattia accompagnata da atrofia muscolare e una grande disorganizzazione delle giunzioni neuromuscolari con un rallentamento della riinnervazione del muscolo denervato (Williams et al.; 2009)

Per quanto riguarda i microRNA circolanti è stata trovata un incremento del myomiR-206 nel modello SLA del topo SOD1-G93A (Williams et al.; 2009) e in un gruppo di pazienti SLA (Toivonen et al.; 2014).

MIOSTATINA E FOLLISTATINA

Miostatina

La Miostatina, chiamata anche fattore di crescita 8 (GDF8), è una miocina, un membro della super-famiglia TGF- β (transforming growth factor- β), che agisce come potente regolatore negativo della massa muscolare (Wu et al.; 2011). Numerosi fattori di crescita che appartengono a questa famiglia hanno un ruolo durante lo sviluppo nella crescita e nel differenziamento, mentre altri sono implicati nella proliferazione e rigenerazione dei tessuti adulti. La Miostatina è l'unico membro della super-famiglia TGF- β che è espressa, quasi esclusivamente, nel muscolo scheletrico, sia durante lo sviluppo che nel muscolo adulto (McPherron et al.; 1997)

Il gene che codifica per Miostatina fu scoperto circa vent'anni fa (1997), dal gruppo della genetista Alexandra McPherron, che caratterizzò nei topi la risposta fenotipica di una mutazione del gene della Miostatina. Topi knockout per il gene della Miostatina avevano una massa muscolare due o tre volte maggiore rispetto ai topi wild type e questo era il risultato dell'ipertrofia e

dell'iperplasia delle fibre (McPherron et al.; 1997). Questo studio iniziale è stato seguito da altri che mostrano che mutazioni per miostatina sono accompagnate da una eccessiva ipertrofia/iperplasia muscolare in diversi animali tra cui bovini, ovini e cani (Grobet et al.; 1997), (Kambadur et al.; 1997), (Mosher et al.; 2007). E' stato provato, inoltre, che nel topo adulto l'inibizione della Miostatina con un anticorpo specifico porta ad un incremento della forza e della massa muscolare lasciando inalterati gli altri organi e parametri vitali. (Whittemore LA et al.; 2002). Gli autori suggeriscono che la Miostatina funzioni da regolatore negativo della massa muscolare. Per quanto riguarda gli esseri umani, un singolo case-report è stato pubblicato in cui un bambino appena nato presentava un'insolita quantità di massa muscolare dovuta ad una mutazione nulla per il gene per la Miostatina (Schuelke et al., 2004).

Sono stati identificati numerosi meccanismi con i quali la Miostatina è in grado di regolare la crescita della massa muscolare. La Miostatina agisce, ad esempio, attraverso la regolazione della miogenesi inducendo una down-regolazione di MyoD (Langley et al., 2002) ed una up-regolazione di p21 (McFarlane et al., 2011) che portano al blocco della proliferazione dei mioblasti (Thomas et al., 2000; Taylor et al., 2001) e del differenziamento. La Miostatina può, inoltre, portare alla degradazione del muscolo, agendo sul sistema proteolitico di degradazione up-regolando geni come atrogin-1, FoxO1, and MuRF-1 (McFarlane et al., 2006).

E' stato proposto che la Miostatina, oltre ad essere un potente regolatore negativo della crescita muscolare, possa essere anche un fattore critico nella risposta adattativa della fibra muscolare (Snijders et al.; 2015).

Miostatina: Struttura e meccanismo d'azione

La sequenza della Miostatina presenta caratteristiche comuni agli altri membri della famiglia TGF- β , tra cui una sequenza segnale carbossi-terminale per la

secrezione, un sito processamento proteolitico e una regione contenente un pattern di cisteine conservate. Simile ad altri membri della superfamiglia, la Miostatina è sintetizzata come una proteina precursore di 375 amminoacidi (Uniprot:014793), costituita da peptide segnale, un pro-peptide N-terminale e un dominio C-terminale da dove proviene il ligando attivo.

L'attivazione della Miostatina richiede due tagli proteolitici: il primo è dato da un enzima della famiglia della Furina che elimina la sequenza segnale, mentre il secondo è dato dall'azione delle metalloproteasi appartenenti alla famiglia BMP-1/TLD (Wolfman et al.; 2003). La Miostatina matura è costituita dal dimero C-terminale (Lee; 2004) come mostrato in Figura 5.

Quando la proteina viene secreta nel sistema circolatorio, il peptide N-terminale rimane legato in modo non covalente al dimero C-terminale che mantiene la Miostatina in uno stato latente inattivo. L'arrivo della Miostatina alle cellule target del muscolo scheletrico determina l'attivazione del dimero C-terminale che viene rilasciato e il legame con il suo recettore, l'Activina di tipo II, permette l'attivazione del pathway di segnale. (Thies et al.; 2001).

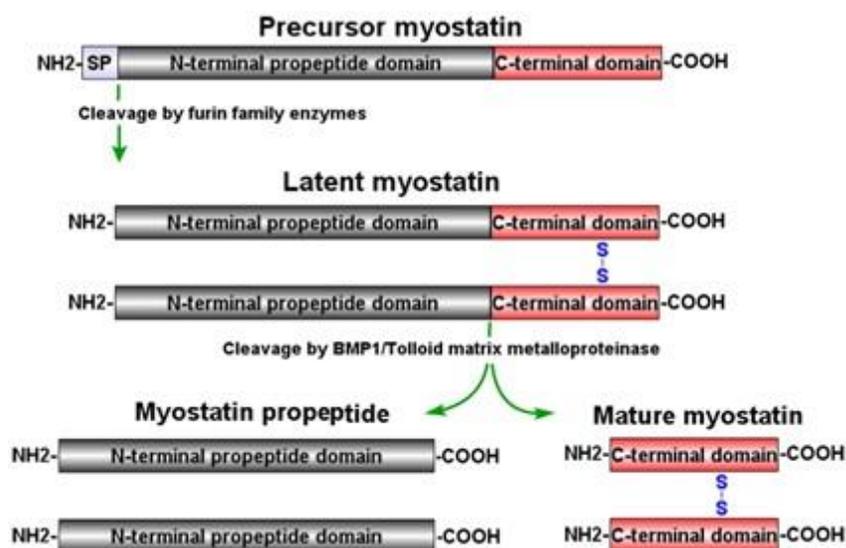


Figura 5: *Struttura e meccanismo di attivazione della Miostatina.*

Miostatina presenta sequenza e funzione altamente conservate tra le varie specie. La sequenza aminoacidica del topo e dell'uomo è identica così come il pattern di espressione dell' mRNA e, ciò suggerisce che l'inibizione della miostatina, vista nei topi dal gruppo di Whittemore, possa avere gli stessi effetti pure nell'uomo, con risvolti positivi nella cura di diverse patologie muscolari (Whittemore et al.; 2003).

Miostatina e microRNA

I microRNA sono implicati anche nella regolazione dei livelli di espressione della Miostatina. Nel cuore l'up-regolazione del miR-208a porta ad atrofia cardiaca insieme ad una riduzione della Miostatina (Callis et al.; 2009) Inoltre, si è visto, che la Miostatina è un target del miR-499 (Bell et al.; 2010). Interessante è che gli aminoacidi essenziali promuovono l'ipertrofia sopprimendo i livelli di Miostatina e, inducendo una forte espressione dei miR-1, miR-23a, miR-206, miR-208a e miR-499 (Drummond et al.; 2009). In aggiunta, in un altro studio, è stato visto che una mutazione naturale *gain of function*, nella regione 3' UTR della Miostatina, in pecore Texel, crea un sito di legame per il miR-206 che porta ad un' inibizione della miostatina e causa in queste pecore il famoso fenotipo del *double muscling* (Clon et al.; 2006). Per quanto visto precedentemente in questa tesi i livelli di espressione della Miostatina sono inversamente correlati con il miR-27a.

Follistatina

La Follistatina, conosciuta anche come proteina che lega l'Activina, è un antagonista di diversi membri della famiglia TGF- β , inclusa la Miostatina (Amthor et al.; 2004). L'aumento di Follistatina è associato ad un'eccessiva

crescita della massa muscolare mentre una diminuzione porta alla perdita di massa muscolare (Matzuk et al; 1995). Numerosi studi sia in vivo che in vitro mostrano che la Follistatina agisce da antagonista della Miostatina (Amthor et al.; 2004, Rodino-Klapac et al.; 2009).

Rapporto Follistatina/Miostatina quale indice di atrofia muscolare

La concentrazione di Miostatina nel muscolo è paragonabile alla concentrazione di Miostatina nel sangue (Wu et al.; 2011). Inoltre nel siero la Follistatina agisce come *inhibitory binding protein* della Miostatina. Questo peptide blocca l'attivazione del pathway della Miostatina, mantenendola nella forma inattiva. (Rodino-Klapac et al.; 2009) La funzione della Miostatina viene distrutta poiché non può più legare il suo recettore. Quindi l'inibizione della Miostatina o l'incremento della Follistatina porta ad un aumento della massa muscolare.

E' stato visto che nelle persone sane i livelli di Miostatina e Follistatina si bilanciano per mantenere la massa muscolare e che, il rapporto Follistatina/Miostatina, in questi individui, è circa 1 (Wu et al.; 2011). Tale rapporto può essere utilizzato come marker, non invasivo, di degradazione e atrofia muscolare.

SCOPO DELLA TESI

Gli obiettivi di questa tesi sono l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari e biochimici che facilitino lo studio dei vari sottotipi di SLA, che diano informazioni su insorgenza e gravità di malattia. A tal fine ho concentrato la mia attenzione sullo studio dei microRNA nel siero e nel muscolo di pazienti SLA affiancando tali analisi a misurazioni morfometriche e biochimiche (Miostatina /Follistatina). I microRNA sono piccole molecole di RNA implicate nella regolazione fine a livello post-trascrizionale, disregolati in numerose situazioni patologiche. Ho inoltre focalizzato la mia attenzione sull'identificazione di biomarcatori che possano essere utilizzati come indicatori di risposta funzionale alla riabilitazione.

MATERIALI E METODI

COORTE DI PAZIENTI:

Per lo **studio di biomarkers circolanti nel siero e nel plasma** abbiamo collezionato campioni di siero e plasma di 14 pazienti affetti da SLA sporadica (età media 64 anni) e 8 soggetti sani usati come controlli (età media 55 anni). I pazienti SLA sono stati esaminati clinicamente all' IRCCS San Camillo e diagnosticati in accordo con i criteri ' El Escorial' (Brook et al.; 2000). I pazienti SLA sono stati divisi in due gruppi: 10 pazienti presentano un esordio spinale (gruppo di SLA spinali) e 4 un esordio bulbare (gruppo di SLA bulbari). Il punteggio di disabilità fisica è stato assegnato utilizzando la *revised ALS functional rating scale* (ALS-FRS-R).

Per lo **studio di biomarkers nel tessuto muscolare** abbiamo utilizzato biopsie muscolari derivanti dal quadricipite femorale di 16 pazienti SLA (9 maschi e 7 femmine) con un'età media di 56 anni e di 5 controlli di età paragonabile (che non risultano affetti da nessuna malattia muscolare) usati come normali, donati dalla Biobanca del muscolo Telethon di Padova, dopo compilazione di opportuna richiesta.

Per lo **studio di biomarkers sierici sierici nel corso della riabilitazione** sono stati collezionati i campioni biologici di siero di 12 pazienti affetti da SLA sporadica (8 maschi e 4 femmine) al T0 (prima della riabilitazione) e al T1 (dopo riabilitazione) con un'età media di 59 anni che hanno seguito, per 8 settimane, un piano riabilitativo di rinforzo muscolare associato a training aerobico.

Tutti i pazienti e i controlli hanno firmato un consenso informato prima del prelievo di sangue periferico. Circa 10ml di sangue sono stati raccolti in appositi tubi e centrifugati a 1500g a temperatura ambiente per 15 minuti per

ottenere siero (per lo studio dei microRNA) e plasma (per saggi ELISA). Il siero ed il plasma sono stati conservati a -80°C prima dell'utilizzo.

ANALISI MORFOMETRICA DELLE FIBRE

L'analisi morfometrica delle fibre muscolari, derivanti da biopsia muscolare del quadricipite femorale, è stata condotta sulla sezione trasversale, dopo colorazione con ematossilina-eusina che permette la digitalizzazione da 5 a 7 campi random non sovrapposti, utilizzando un microscopio con ingrandimento 10X (Zeiss Axioskop, Gottingen, Germany). È stato adoperato il software ImageJ (v. 1.34) per tracciare i bordi di 200-500 fibre per paziente e calcolare l'area della sezione trasversale e il diametro della fibra. Questi valori sono stati utilizzati per calcolare una serie di parametri morfometrici: area delle fibre, diametro fibrile, coefficiente di variabilità delle fibre, fattore di atrofia e ipertrofia delle fibre, seguendo il metodo di Dubowitz (Dubowitz et al.; 2007). L'area e il diametro delle fibre sono due parametri utilizzati per valutare l'atrofia delle fibre. Il coefficiente di variabilità delle fibre valuta l'assortimento e la distribuzione di fibre piccole e grandi (valore normale: 0-250 units), mentre i coefficienti di atrofia e ipertrofia esprimono la proporzione di fibre anormali piccole e grandi presenti nella biopsia (valore normale: 0-200 units).

ESTRAZIONE DI RNA DA SIERO E BIOPSIE MUSCOLARI

I campioni di siero (400µl) devono essere scongelati lentamente, mantenendoli in ghiaccio, prima dell' utilizzo; le biopsie muscolari vanno utilizzate immediatamente, una volta tirate fuori dal -80°C, per impedirne la degradazione. Sia l'estrazione da siero che da biopsia muscolare è stata condotta utilizzando il kit miRNeasy extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore con l'aggiunta di 10µl (5nM) del miR sintetico miR-39-3p di *Caenorhabditis elegans* utilizzato come standard per aggiustare le differenze di estrazione e trascrizione inversa dell'RNA.

RETROTRASCRIZIONE E REAL-TIME PCR QUANTITATIVA

L'RNA è stato retrotrascritto utilizzando il kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, Foster City, CA, USA). La qRT-PCR è stata eseguita utilizzando il kit TaqMan Universal Master Mix e sonde miRNA specifiche (Applied Biosystem) utilizzando la macchina per real-time PCR modello CFX96 (Biorad, Milan, Italy), seguendo indicazioni del produttore. In particolare sono stati utilizzati i primer: hsa-miR-1, hsa-miR-206, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-27a, hsa-miR-155, hsa-miR-146a, hsa-miR-221, hsa-miR-149* e cel-miR-39-3p. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato e replicati almeno due volte. I livelli di espressione dei miRNA sono stati normalizzati sul miR-39-3p di *C. elegans* e calcolati utilizzando il metodo del $\Delta\Delta Ct$. I valori ottenuti sono stati normalizzati sulla media dei controlli.

SAGGI ELISA PER LA QUANTIFICAZIONE DI MIOSTATINA E FOLLISTATINA

Per la quantificazione dei livelli plasmatici di Miostatina è stato utilizzato il kit K1012 (Immunodiagnostik Bensheim, Germany) seguendo le indicazioni del libretto illustrativo. Sono state eseguite una serie di diluizioni seriali per i campioni standard. Di seguito sono elencate le concentrazioni finali degli standard per la Miostatina 0; 0.4; 1.2; 3.6, 10.8, 32.5 ng/ml. Il campione di plasma (20 μ l) è stato diluito 1:10 nella soluzione buffer; 200 μ l del tracer di Miostatina biotinilata sono stati aggiunti a 200 μ l dei campioni standard e dei controlli opportunamente diluiti. La piastra è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente sopra ad un agitatore orbitale. I pozzetti sono stati lavati per 5 volte. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di streptavidin-labeled peroxidase complex e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente in agitazione per 1 ora. Infine sono stati aggiunti 100 μ l di stop solution per completare la reazione

Per la quantificazione della Follistatina è stato utilizzato il kit ab113319 (Abcam Cambridge, MA, USA). Gli standard sono stati diluiti nel modo seguente: 0; 0.5, 1.2, 1.28, 3.2, 8, 20, 50, 125 ng/ml. 25 μ l di ogni campione di plasma sono stati diluiti 1:10 in assay solution. 100 μ l di ogni standard e di ogni campione, opportunamente diluiti, sono stati messi nei pozzetti assegnati della piastra. La piastra, protetta dalla luce, è stata incubata a temperatura ambiente per 2.5 ore e agitata gentilmente. I pozzetti sono stati lavati per 4 volte e poi, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l dell'anticorpo biotinilato per la rilevazione della Follistatina e incubato per 1

ora alle condizioni precedenti. Dopo 4 lavaggi sono stati aggiunti 100 μ l di della soluzione di streptavidina in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata in agitazione protetta dalla luce per 45 minuti. Sono seguiti 5 lavaggi alla fine dei quali sono stati aggiunti 100 μ l del substrato tetra-methyl-benzidine ed incubato il tutto, al buio, per 15 minuti. Infine sono stati aggiunti 50 μ l di stop solution per completare la reazione.

Le piastre per la rilevazione dei livelli di concentrazione di Miostatina e Follistatina sono state lette, entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop, nel lettore di piastre INFINITE F50 (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) misurando l'assorbanza a 450nm. Per il calcolo della curva standard della della Miostatina è stato utilizzato l'algoritmo 4-parameter mentre la concentrazione della Follistatina è stata determinata disegnando la linea che intercala meglio i punti standard. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato e ripetuti due volte. Infine è stato calcolato il rapporto tra concentrazione di Miostatina e Follistatina.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test-t di Student e sono stati considerati statisticamente significativamente i valori con un p-value < 0.05. In questa tesi i valori sono espressi come media \pm deviazione standard.

RISULTATI

1) STUDIO DI BIOMARKERS CIRCOLANTI NEL SIERO E NEL PLASMA

I 14 pazienti SLA coinvolti in questo studio, 6 femmine e 8 maschi hanno un'età media di 64 anni. Il sottogruppo di pazienti SLA bulbari (Tabella I) include 4 pazienti (3 femmine e 1 maschio) mentre quello ad esordio spinale include 3 femmine e 7 maschi. Questi pazienti presentano scala (ALS-FRS-R) di disabilità moderata (punteggi tra 26 e 43 punti) e non sono presenti differenze significative tra i due gruppi. In particolare tutti i pazienti sono in grado di camminare durante il periodo dello studio (1-3 anni). Due dei 4 pazienti ad esordio bulbare e uno dei 10 pazienti ad esordio spinale durante lo studio hanno subito una percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) e tracheotomia e un paziente bulbare solo la PEG. Dopo la fine dello studio due pazienti bulbari sono morti all'età di 71 e 78 anni, 4-5 anni dopo l'esordio della malattia.

Phenotype at onset (n. of patients)	Gender	Age at study (years)	Functional rating score at study (ALS-FRS-R)	Clinical features; death
Spinal ALS	F	65	42	–
Spinal ALS	F	58	26	Non invasive ventilator
Spinal ALS	F	77	28	Non invasive ventilator
Spinal ALS	M	73	33	–
Spinal ALS	M	59	30	PEG, tracheostomy
Spinal ALS	M	67	32	–
Spinal ALS	M	56	30	–
Spinal ALS	M	75	26	–
Spinal ALS	M	54	43	–
Spinal ALS	M	52	28	–
Total Spinal ALS (10)		64	32	
Bulbar ALS	F	75	30	PEG, tracheostomy; died 4 years after onset
Bulbar ALS	F	45	28	PEG
Bulbar ALS	F	68	26	–
Bulbar ALS	M	70	28	PEG, tracheostomy; died 5 years after onset
Total Bulbar ALS (4)		64	28	
Total ALS (14)		64	30	

Tabella I: Dati clinici dei pazienti con SLA bulbare e spinale.

ESPRESSIONE DEI MYOMIRNA NEL SIERO

Come mostrato in Figura 6 i livelli di espressione dei myomiRNA risultano incrementati nei pazienti SLA rispetto ai controlli; questa differenza è significativa per miR-206, miR-133b ($p < 0.005$) e per miR-133a ($p < 0,05$). Inoltre quando vengono comparati i due sottogruppi di pazienti si osserva che tutti e quattro myomiRNA hanno un valore medio più alto negli SLA spinali rispetto ai bulbari, questa differenza è significativa per miR-206, miR-133a e miR-133b ($p < 0.005$). Da notare inoltre la grande up-regolazione dei miR-206 e miR-133b tra gli SLA spinali e il gruppo di controllo.

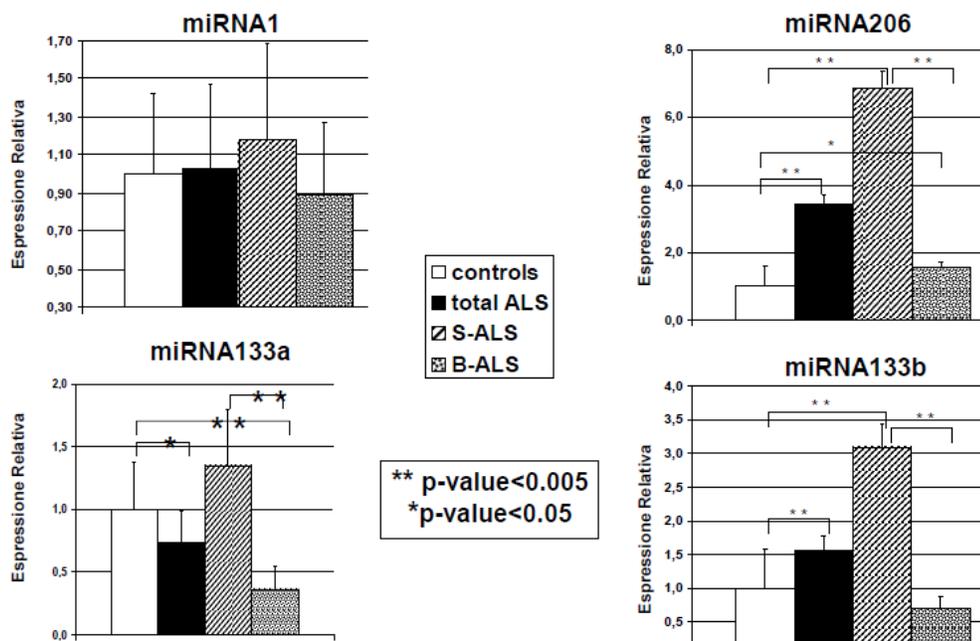


Figura 6: Comparazione di miRNA. Gli istogrammi mostrano i livelli di espressione medi dei miRNA muscolo-specifici nei pazienti SLA (barra nera), SLA spinali (barra con motivo a strisce trasversali), SLA bulbari (ultima barra) e controlli (barra bianca). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. (Tasca et al.; 2016).

ESPRESSIONE NEL SIERO DEI MIRNA INFIAMMATORI E ANGIOGENICI

Per quanto riguarda i microRNA infiammatori abbiamo osservato (Figura 7) un decremento significativo nei livelli di espressione medi dei miR-146a e miR-149* ($p < 0.005$) nei pazienti SLA comparati con i controlli, mentre non abbiamo trovato alcuna differenza significativa per il miR-155 e il miR-221 tra questi due gruppi. L'analisi del nostro sottogruppo di pazienti rivela un forte incremento del miR-155 negli SLA bulbari rispetto ai spinali ($p < 0.005$). Inoltre il miR-155 risulta down-regolato negli SLA spinali rispetto ai controlli ($p < 0.005$).

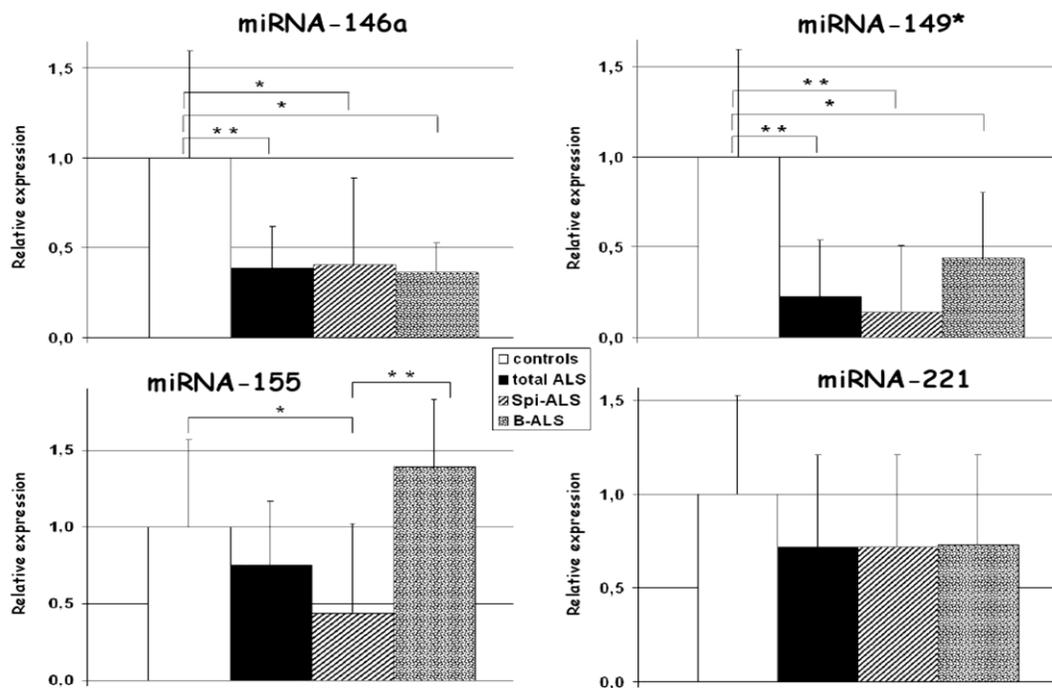


Figura 7: Gli istogrammi mostrano la comparazione tra i livelli di miRNA infiammatori e angiogenici nei pazienti SLA (total ALS), SLA spinali (Spi-ALS), SLA bulbari (B-ALS). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. (Tasca et al.; 2016)

ESPRESSIONE DEL MIR-27A

Il miR-27a, nel siero, risulta significativamente down-regolato nei pazienti SLA rispetto ai controlli ($p < 0.005$), mentre non vi è nessuna differenza significativa tra i due sottogruppi clinici (Figura 8).

ESPRESSIONE QUANTITATIVA NEL PLASMA DELLE PROTEINE MIOSTATINA E FOLLISTATINA

E' stato misurato il rapporto tra la concentrazione di Miostatina e Follistatina che è risultato più alto nei pazienti rispetto ai controlli (Figura 8; pannello di destra). L'analisi tra gruppi rivela un valore più basso negli SLA spinali rispetto ai bulbari ($p < 0.005$), e gli SLA bulbari mostrano un incremento significativo rispetto ai controlli ($p < 0,05$) come mostrato in Figura 8.

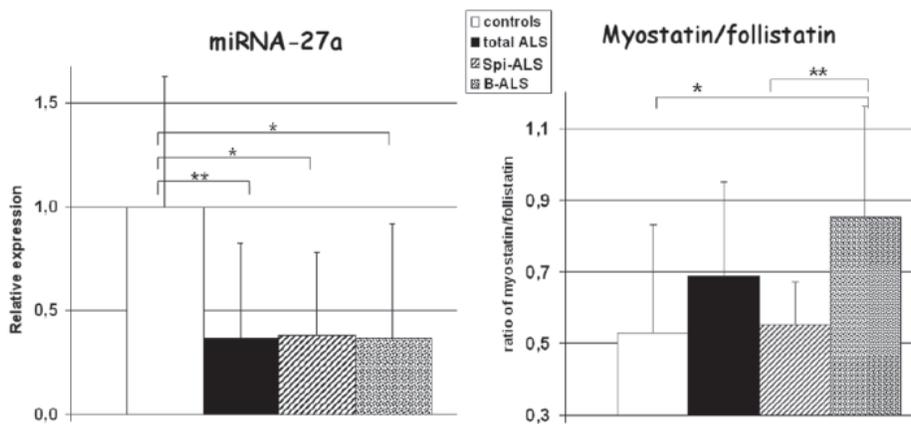


Figura 8: Nel pannello di sinistra sono mostrati i livelli sierici di espressione del miR-27a in pazienti (barra nera), controlli (barra bianca), SLA spinali (barra a linee oblique) e SLA bulbari (ultima barra da sinistra). Il pannello di destra mostra il rapporto plasmatico tra la concentrazione di Miostatina e Follistatina tra i vari sottogruppi di pazienti e controlli. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. (Tasca et al.; 2016)

ANALISI MORFOMETRICA DELLE FIBRE MUSCOLARI

Come mostrato in Fig.9 nei pazienti SLA c'è un incremento significativo del coefficiente di variabilità fibrale e del fattore di atrofia e una riduzione dell'area e del diametro fibrale comparati con i controlli. Tutte le biopsie muscolari mostrano una marcata atrofia delle fibre e questa differenza è maggiore nel sottogruppo di pazienti con esordio bulbare della malattia.

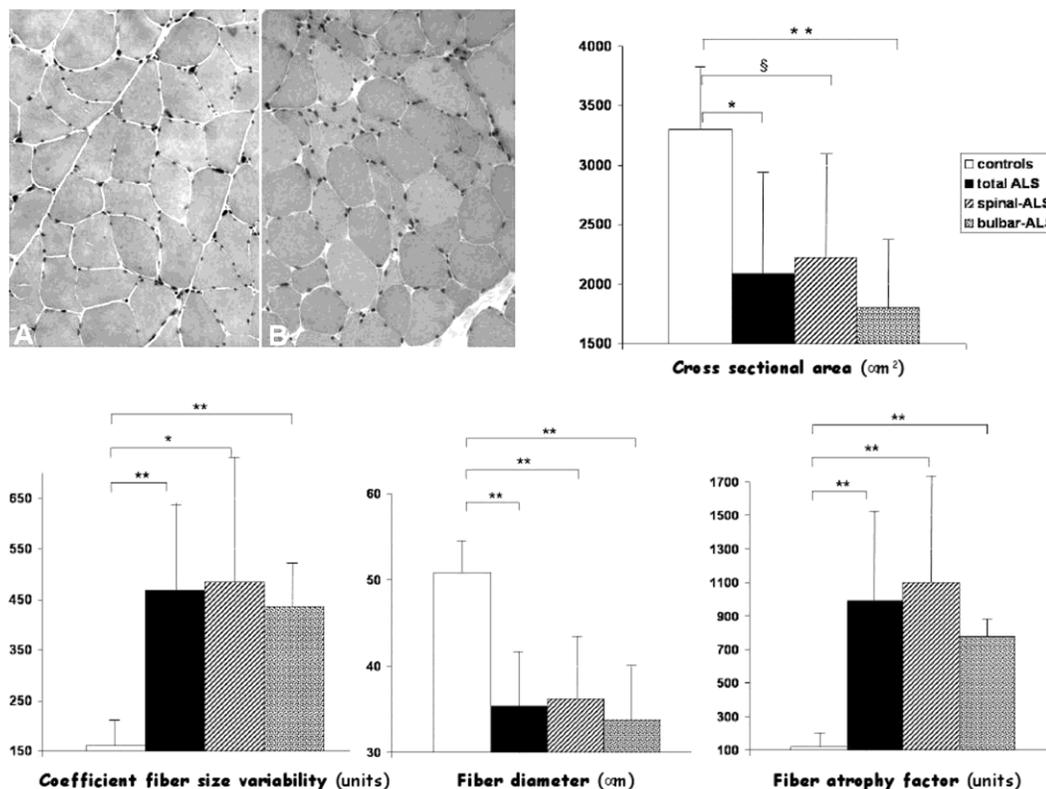


Figura 9: Comparazione morfometrica di fibre muscolari di pazienti SLA spinali (pannello A) e bulbari (pannello B).Colorazione ematossilina-eusina, ingrandimento 200X. Nei pazienti SLA bulbari ci sono più fibre atrofiche rispetto agli spinali.

Gli istogrammi mostrano le differenze dei parametri morfometrici tra pazienti (barra nera), controlli (barra bianca),SLA spinali (terza barra da sinistra) e SLA bulbari (ultima barra da sinistra). * $p < 0.001$; ** $p < 0.005$; § $p < 0.05$. (Tasca et al.; 2016).

2)STUDIO DI BIOMARKERS IN BIOPSIE MUSCOLARI

PAZIENTI SOTTOPOSTI A BIOPSIA MUSCOLARE

I campioni di muscolo (Quadricipite femorale) utilizzati sono stati ottenuti dalla Biobanca Telethon di Padova. Abbiamo compiuto l'analisi dei microRNA in biopsie muscolari, raccolte a scopo diagnostico al momento dell'esordio, di 16 pazienti affetti da SLA sporadica: 9 uomini e 7 donne con un'età media di 56 anni, diagnosticati in accordo con El Escorial Criterial (Brook et al.; 2000), e 5 controlli sani, usati come normali, con età paragonabile (Tabella II)

I pazienti sono stati divisi in sottogruppi: età d'esordio sopra e sotto i 55 anni e in rapporto al genere maschio (M) o femmina (F) e quest'ultimo gruppo è stato a sua volta suddiviso in donne pre e post menopausale.

PAZIENTE	ETA' ESORDIO	ETA' BIOPSIA	SESSO
PZ 1	58	58	M
PZ 2	53	53	M
PZ 3	51,5	53	M
PZ 4	53	53	M
PZ 5	53	53	M
PZ 6	66	69	M
PZ 7	46	46	F
PZ 8	63	63	M
PZ 9	70,5	72	F
PZ 10	71	71,5	F
PZ 11	40	41	F
PZ 12	65,5	68	M
PZ 13	63,3	66	F
PZ 14	53	53	F
PZ 15	45	46,5	M
PZ 16	30	30,5	F
ETA' MEDIA	55±11,6	56±11,7	9M; 7F

Tabella II: *Dati clinici le cui biopsie sono stati studiate per microRNA.*

ANALISI MORFOMETRICA

Anche di queste biopsie (Tabella III) è stata eseguita analisi morfometrica che rivela una maggior atrofia delle fibre dei pazienti rispetto ai controlli in particolare notiamo un diametro fibrile più piccolo (**p<0.001) e un elevato coefficiente di variabilità della fibra (**p<0.001) e fattore di atrofia della fibra (**p<0.001).

	Cross-sectional area (μm^2)	Coefficient fiber size variability (units)	Fiber diameter (μm)	Fiber atrophy factor (units)	Fiber hypertrophy factor (units)
PZ SLA	2087 \pm 811 *	468.4 \pm 177.9 **	35.4 \pm 7.5 **	991.9 \pm 517.1 **	19.5 \pm 39.4
CONTROLLI	3302 \pm 568	161.9 \pm 18.9	50.8 \pm 4.4	119.5 \pm 89.2	0

Tabella III: Parametri morfometrici delle fibre muscolari in pazienti SLA e controlli.

**p<0.001; *p<0.005; pazienti vs.controlli.

ESPRESSIONE DI MICRORNA MUSCOLARI E INFIAMMATORI NEL MUSCOLO

Abbiamo analizzato nelle biopsie muscolari, di 16 pazienti SLA e 5 controlli sani i livelli di espressione di 9 microRNA: 5 myomiRNA (miR-1; miR-206; miR-133a, miR-133b e miR-27a) e 4 miRNA infiammatori (miR-155; miR-146a, miR-221 e miR-149*) (Figura 10)

Nei pazienti SLA si nota un forte incremento dei livelli di espressione di tutti i miRNA rispetto ai controlli con un p value inferiore allo 0,0001, eccetto che per il miR-149* per il quale non è stata trovata alcuna differenza significativa.

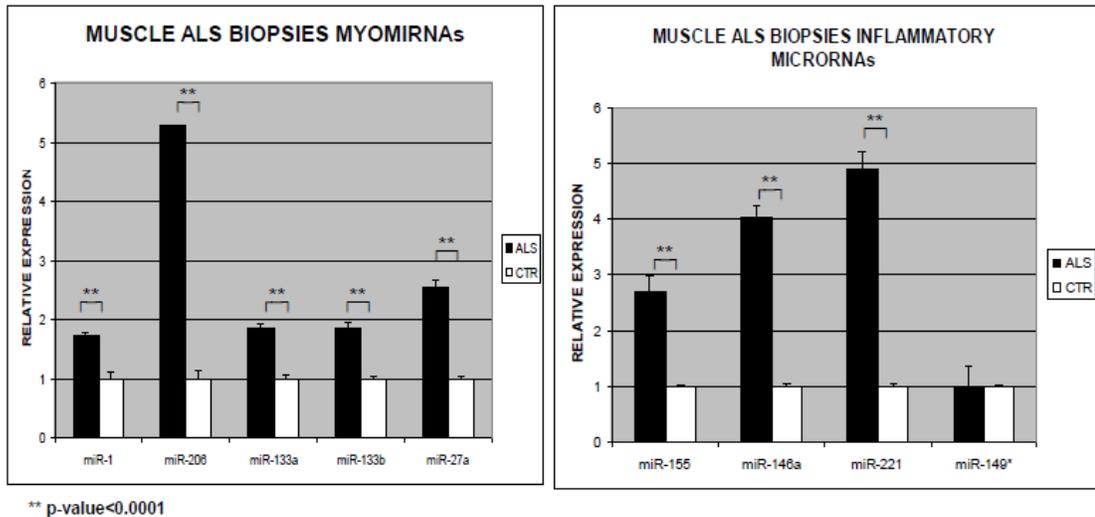


Figura 10: Espressione dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori in biopsie muscolari di pazienti SLA (barra nera) e controlli (barra bianca). Si noti il livello significativamente alto nei pazienti versus i controlli dei microRNA dosati (eccetto miR-149*)** p-value<0.0001.

DIFFERENZE DI GENERE DEI MICRORNA IN BIOPSIE DI PAZIENTI SLA

Sono stati analizzati i livelli di espressione dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori suddividendo i pazienti in base al sesso (9 maschi e 7 femmine). E' stato trovato che nel muscolo di pazienti SLA i livelli di espressione di tutti i miRNA risultano up-regolati nei pazienti di sesso maschile rispetto ai pazienti di sesso femminile (p-value<0,0001), ad eccezione del miR-1 e del miR-149* nei quali non si osservano differenze significative (Figura 11)

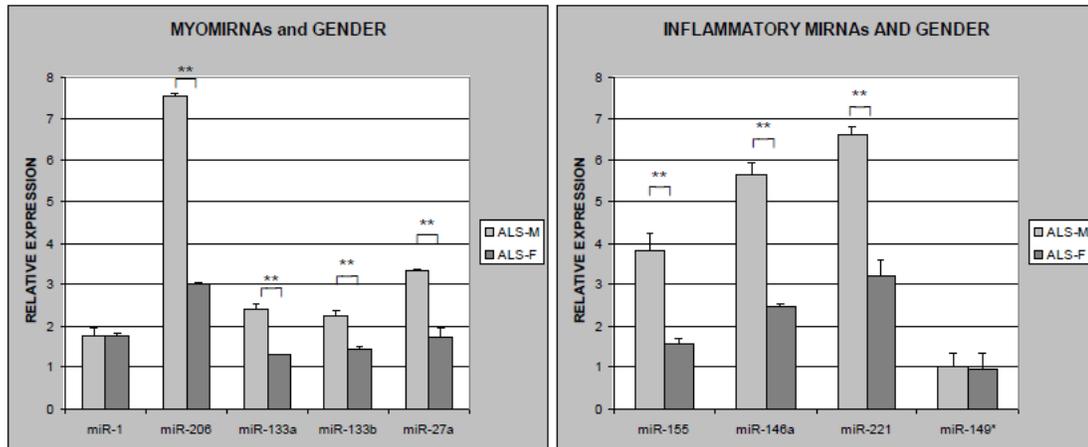


Figura 11: Gli istogrammi comparano i livelli di espressione dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori in pazienti SLA di sesso maschile (barra grigio chiaro) e in pazienti di sesso femminile (barra grigio scuro). ** p-value<0.0001.

SESSO	ETA' MEDIA BIOPSIA (ANNI)
9 MASCHI	57±7,7
7 FEMMINE	54±16

Tabella IV: Pazienti maschi e femmine SLA sottoposti a biopsia muscolare.

SUDDIVISIONE DI MICRORNA IN DONNE CON SLA A SECONDA DELL'ETA'

I campioni biotici delle pazienti femmine sono stati suddivisi ulteriormente in due gruppi: donne pre e post menopausa e sono stati valutati i livelli dei 9 microRNA.

L'analisi dei myomiRNA (Figura 12) mostra un incremento significativo ($p\text{-value} < 0,0001$) del miR-206, del miR-133b e del miR-27a nelle donne fertili mentre, i livelli di espressione dei miRNA infiammatori miR-155 e miR-221 risultano up-regolati nelle donne in menopausa. Per tutti gli altri miRNA non ci sono differenze apprezzabili tra i due gruppi.

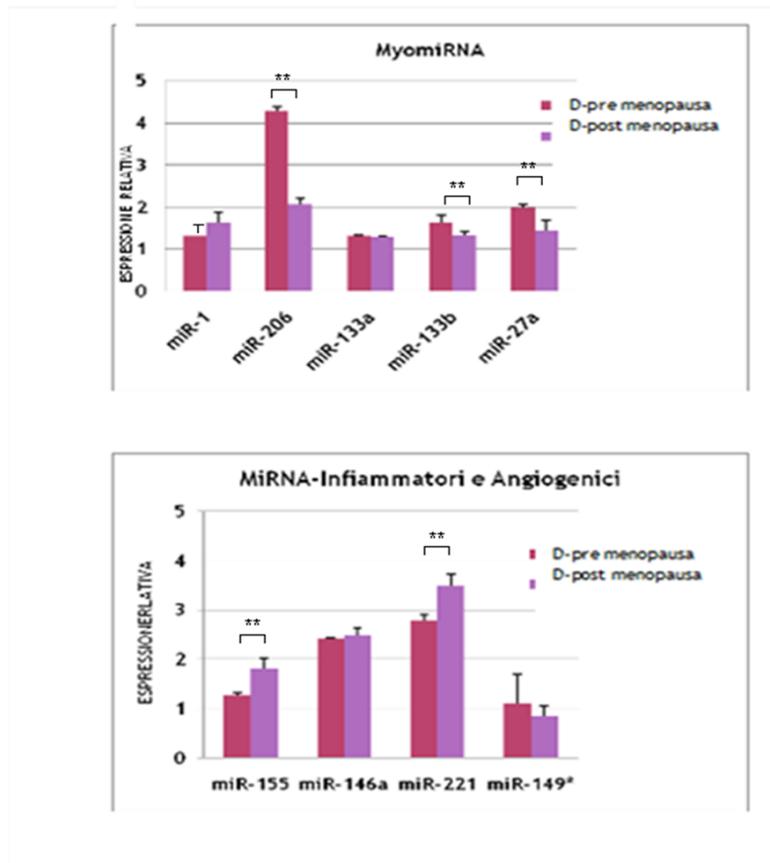


Figura 12: *Suddivisione dei myomiRNA (figura in alto) e dei miRNA infiammatori (figura in basso) in donne in età pre (barra ciclamino) e post (barra viola) menopausale. ** p-value<0.0001.*

SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA E GRUPPI DIVERSI DI ETÀ D'ESORDIO

Sono stati analizzati i livelli di espressione dei 9 miRNA, presi precedentemente in analisi, in pazienti (Tabella V) con età d'esordio della malattia sopra e sotto i 55 anni d'età ("cut-off" preso arbitrariamente)(Fig.13). Si è trovato una down-regolazione significativa del miR-206, miR-133a, miR-27a, miR-155, miR-146a, miR-221 (p-value inferiore allo 0,0001) e del miR-133b (p-value inferiore allo 0,05) nei pazienti con età sopra i 55 anni. Per quanto riguarda il miR-1 e il miR-149* non si è notata alcuna differenza.

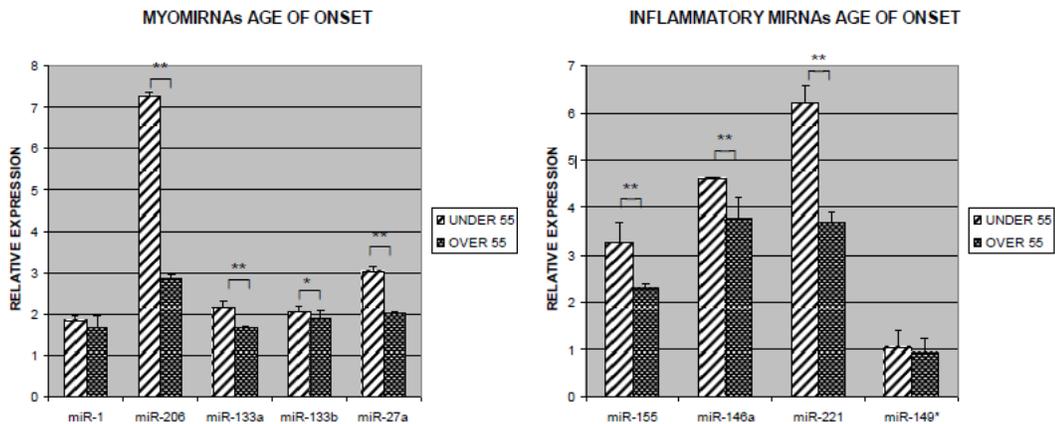


Figura 13: Gli istogrammi mostrano le differenze nei livelli di espressione dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori in pazienti con diversa età d'esordio. ** p-value<0.0001; *p-value<0,05.

AGE OF ONSET	< 55	>55
SESSO	5M; 4F	4M; 3F
ETA' MEDIA BIOPSIA	47,6±7,8	66,8±5

Tabella V: Caratteristiche cliniche pazienti con diversa età d'esordio.

3)STUDIO DI BIOMARCATORI SIERICI NEL CORSO DI RIABILITAZIONE

Dopo riabilitazione fisica i dodici i pazienti SLA (8 maschi e 4 femmine) (Tabella VI) hanno mostrato un aumento della forza globale e una miglior resistenza alla fatica con una diminuzione della rigidità degli arti, una migliore qualità e durata del passo. In nove pazienti e stata calcolata la scala Bathel mostrando un miglioramento medio dopo riabilitazione di 12,78 punti, mentre sei pazienti valutati con la scala FIM presentando un miglioramento medio dopo terapia fisica di 3,65 punti.

Pazienti	Tipo di esordio	di sesso	età	Miglioramento scala Barthel (punti)	Miglioramento scala FIM (punti)	Altre caratteristiche Cliniche
Pz A	spinale	M	79	10	2	/
Pz B	spinale	M	49	10	6	/
Pz C	spinale	M	75	10	3	Diabete mellito di tipo 2
Pz D	bulbare	M	61	/	/	Intolleranza al glutine, ipotiroidismo
Pz E	bulbare	F	45	/	/	PEG
Pz F	spinale	M	73	15	3	/
Pz G	spinale	F	33	20	/	/
Pz H	spinale	F	76	15	/	Terapia insulinica
Pz I	spinale	M	44	5	5	Celiachia
Pz L	spinale	M	71	15	/	Ipercolesterolemia, vasculopatia cerebrale
Pz M	spinale	M	44	/	/	/
Pz L	spinale	F	60	15	3	/
TOT.	10 spinali 2 bulbari	8 maschi 4 femmine	59±15	12,78±4,41	3,65±1,51	/

Tabella VI: *Caratteristiche cliniche dei pazienti SLA sottoposti a riabilitazione fisica.*

L'analisi dei microRNA canonici rivela una diminuzione media di tutti i myomiRNA al T1 con un p-value inferiore allo 0,005 per il miR-206, miR-1 e miR-133b (Figura 14).

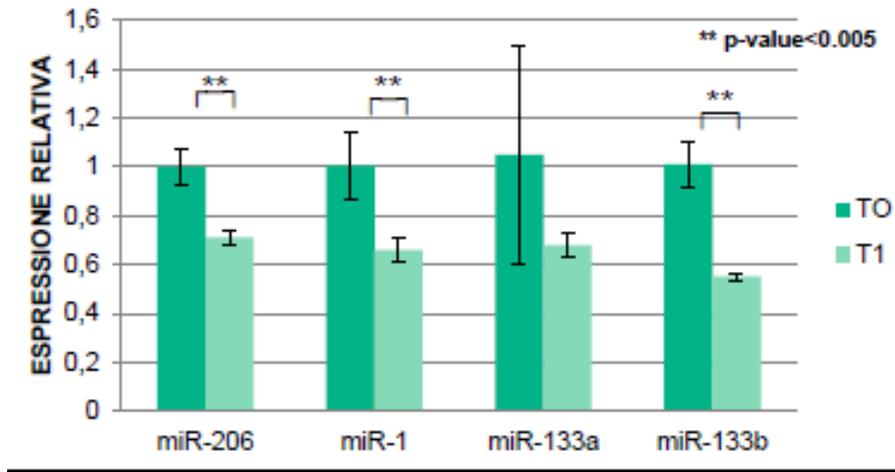


Figura 14: Studio sierico di microRNA in pazienti che hanno eseguito un protocollo riabilitativo. **p-value<0,005.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni sono state fatte numerose scoperte in campo medico e genetico, ma si conosce ancora molto poco sui meccanismi molecolari che portano alla SLA e, non esistono, validi indicatori di patogenesi, età d'insorgenza e progressione di malattia. Nel modello animale di SLA la degenerazione delle giunzioni neuromuscolari, la degradazione e l'atrofia muscolare precedono la degenerazione neuronale (Williams et al.; 2009). Questo supporta l'idea che anche l'atrofia muscolare possa contribuire alla neuro degenerazione. La nostra ipotesi è che i segnali di 'pathways' coinvolti nel mantenimento e nella crescita muscolare siano disregolati nelle SLA e ciò contribuisca alla manifestazione clinica della malattia. E' possibile che il sistema immunitario abbia un ruolo attivo nella patologia della SLA (Murdock et al.; 2015), ma i meccanismi coinvolti non sono ancora chiari. Va ricordato inoltre che le cellule del sistema immunitario sono coinvolte nell'atrofia del muscolo scheletrico. Abbiamo studiato se i microRNA possono essere responsabili della regolazione dell'atrofia nella SLA.

L'analisi dei microRNA, qui riportato, mostra che essi sono potenziali biomarkers nello studio della malattia. Si è analizzato il livello di espressione di 5 myomiRNA (miR-1, miR-206, miR-133a, miR-133b, miR-27a), coinvolti nei processi di proliferazione, rigenerazione, atrofia e riparazione del muscolo scheletrico e di 4 miRNA coinvolti nei processi infiammatori e angiogenici (miR-155, miR-146a, miR-221 e miR-149*) sia in siero che in biopsie muscolari.

1) Studio di biomarkers circolanti in siero e plasma: Nella prima parte dello studio mi sono occupata di microRNA circolanti nel siero in 14 pazienti affetti da SLA sporadica e in persone sane. I dati mostrano che nei pazienti SLA i livelli sierici del miR-206 sono più alti rispetto ai controlli, confermando quanto già visto in letteratura (Toivonen et al.; 2014). Nel modello topo knockout per il miR-206 si è visto che tale miRNA è il maggior responsabile

della regolazione e della riparazione delle giunzioni neuromuscolari. Un dato interessante emerso da questo studio è l' up-regolazione del miR-133a, miR-133b e del miR-206 in pazienti con esordio spinale della malattia rispetto a quelli con esordio bulbare. Questa differenza sembra rispecchiare il diverso decorso di malattia nelle due forme: il decorso è lento nella forma spinale e più veloce in quella bulbare. Il miR-206 potrebbe ritardare la progressione di malattia promuovendo la rigenerazione delle giunzioni neuromuscolari (Toivonen et al.; 2014, Brown; 2009). Nel modello animale di topo SLA si è notato che l'inattivazione del miR-206 accorcia l'aspettativa di vita (Brown; 2009) mentre nei pazienti con lunga sopravvivenza questo miRNA risulta più alto che nei pazienti con rapida progressione di malattia (Bruneteau et al.; 2013). I nostri dati suggeriscono che anche il miR-133b possa avere una funzione protettiva nelle sinapsi SLA. Ho studiato anche i livelli di espressione sierici dei miRNA infiammatori e angiogenici: miR-155, miR-146a, miR-221 e miR-149*. Nella serie di pazienti analizzati i livelli di espressione dei miR-155 e del miR-221 non differiscono dai controlli, ma vi è una differenza significativa del miR-155 nei pazienti ad esordio bulbare, che risulta più elevato rispetto a quelli ad esordio spinale. Questo risultato suggerisce che anche il miR-155 possa avere un ruolo nei pazienti bulbari. I miR-146a e miR-149* risultano down-regolati nella coorte di pazienti rispetto ai controlli mentre non si nota differenza tra pazienti bulbari e spinali. I dati ottenuti sono apparentemente in contrasto con studi precedenti svolti sul miR-146a probabilmente spiegabile perché condotti su materiale biologico differente: fluido cerebrospinale (Butovsky et al.; 2012) e midollo spinale (Campos-Melo et al.; 2013).

Inoltre sono stati indagati nel plasma i livelli di espressione della Miostatina, un inibitore critico della miogenesi e della ipertrofia del muscolo scheletrico e, del fattore proteico antagonista la Follistatina e, ne è stato calcolato il rapporto che risulta essere più elevato nei pazienti SLA rispetto ai controlli. In particolare tale incremento è imputabile al sottogruppo di pazienti bulbari.

Tale risultato potrebbe suggerire che i pazienti bulbari possano soffrire più facilmente di atrofia muscolare rispetto ai bulbari. Questi dati sono in accordo con la nozione che la Miostatina possa essere utilizzata come markers di atrofia muscolare e concordano con i nostri dati morfometrici. Abbiamo investigato anche i livelli di espressione del miR-27a che è coinvolto nella crescita muscolare, promuove la proliferazione dei mioblasti e riducendo l'espressione della Miostatina (Huang et al.; 2012). Nei pazienti SLA abbiamo trovato una down-regolazione del miR-27a rispetto ai controlli che correla in modo negativo con i livelli di Miostatina. I nostri dati confermano quanto già visto nel modello animale (Yang et al.; 2014) e correlano con l'atrofia caratteristica del muscolo SLA.

2) Studio di biomarkers nel tessuto muscolare di SLA: Nella seconda parte dello studio ho focalizzato la mia attenzione sullo studio dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori in biopsie muscolari di pazienti SLA.

Tale studio mostra che nel muscolo di pazienti SLA, ai primi stadi della malattia, i 9 microRNA presi in esame, sono up-regolati rispetto ai controlli sani. Gli elevati livelli del miR-206 nei pazienti SLA confermano quanto già visto in altri studi (Toivonen et al.; 2014). L'over espressione del miR-1, miR-133a e miR-206 nel muscolo SLA atrofico avvalorava il ruolo di questi miRNA nella regolazione della plasticità muscolare. Inoltre si è riscontrata una forte up-regolazione del miR-155, coinvolto nella regolazione sia del sistema immunitario innato che adattativo (Rodriguez et al; 2007, O' Connell et al.; 2007). L'over-espressione del miR-146a e del miR-155 nel muscolo dei nostri pazienti SLA è in accordo con quanto già visto in letteratura nel midollo spinale di topi e in un piccolo gruppo di pazienti (Koval et al.; 2013). Il miR-146a è un miRNA pro-infiammatorio, coinvolto nell'immunità innata e regolato dal fattore trascrizionale NF-kB. E' noto che NF-kB ha un ruolo nel muscolo scheletrico portando ad atrofia attraverso il pathway classico o, promuovendo l'omeostasi del muscolo scheletrico, tramite la via alternativa (Li et al.; 2008).

Il miR-146a potrebbe avere un ruolo chiave nella comprensione dei meccanismi che portano alla SLA essendo un buon link tra atrofia muscolare e infiammazione. Questi dati confermano un coinvolgimento muscolare, avvalorato anche dall'analisi morfometrica, che mostra un alto grado di atrofia delle fibre nei pazienti SLA, e una possibile implicazione dei processi immunitari/infiammatori nel caso della malattia.

Recentemente diversi studi si sono concentrati sulle differenze di genere nei pazienti SLA (Pamela et al.; 2010). Il sesso influenza alcune caratteristiche della malattia tra cui l'età e il sito d'esordio e alcuni aspetti clinici (Abhinav et al.; 2007). Nell'uomo la malattia ha inizio prevalentemente nei distretti spinali mentre nella donna nei distretti bulbari con un esordio in età più avanzata (Pamela et al., 2010, Blasco et al.; 2012). E' possibile che i microRNA possano essere coinvolti nei meccanismi che portano ad una diversa severità di malattia legata al genere. A tal scopo abbiamo analizzato l'espressione dei microRNA in biopsie muscolari suddividendo il nostro gruppo di pazienti in base al sesso. Interessante è notare che nelle femmine il valore di espressione medio dei microRNA presi in esame, è circa la metà di quello degli uomini, implicando un diverso controllo ormonale nella regolazione dei miRNA e di conseguenza nella patogenesi della malattia, eccetto che per il miR-1 e miR-149* per i quali non si vedono differenze. Nielsen e collaboratori (Nielsen et al.; 2014) hanno studiato i livelli di espressione dei myomiRNA in biopsie di persone sane trovando un aumento del livello di miR-133a e del miR-133b nelle donne rispetto agli uomini, dato opposto rispetto a quanto trovato nei pazienti SLA presi in esame in questo studio, e nessuna differenza per quanto riguarda il miR-1 e miR-206. Nella SLA il miR-206 potrebbero avere un effetto protettivo negli uomini, che presentano un decorso più lento di malattia, promuovendo la formazione di nuove sinapsi, mentre il miR-133a e il miR-133b potrebbero ritardare l'esordio della SLA nelle donne. Questi dati suggeriscono un possibile coinvolgimento dei

myomiRNA e dei miRNA infiammatori e agiogenici nei processi chiave che definiscono un diverso decorso di malattia tra uomini e donne.

I dati relativi alle nostre pazienti femmine sono stati divisi ulteriormente in due gruppi di donne in età pre e post menopausale e correlati tra loro. Per quanto riguarda i myomiRNA abbiamo osservato un'up-regolazione significativa, nelle donne fertili rispetto a quelle in menopausa, del miR-133b, del miR-27a e del miR-206, per il quale tale differenza risulta addirittura doppia. L'analisi dei miRNA infiammatori rivela una down-regolazione del miR-155 e del miR-221 nelle donne pre-menopausa rispetto alle altre. I dati su myomiRNA probabilmente sono dovuti al fatto che la massa muscolare è regolata dal testosterone. Bassi livelli di testosterone nel maschio di ratto castrato portano ad una down-regolazione della massa muscolare e dei myomiRNA (Nielsen et al.; 2014), supportando l'ipotesi di una correlazione diretta tra testosterone e myomiRNA (Dubois et al. 2012).

In seguito abbiamo suddiviso i nostri pazienti SLA in base all'età d'esordio della malattia ('cut-off' posto arbitrariamente a 55 anni) ed indagato le differenze nei livelli di espressione dei 9 microRNA presi precedentemente in esame. Una recente indagine mostra differenze nel trascrittoma del muscolo vecchio in persone sane per quanto riguarda l'attivazione immunitaria, il rimodellamento della matrice extracellulare e l'accumulo di lipidi (Liu et al.; 2013). Interessante è notare che i nostri risultati mostrano un'up-regolazione significativa del miR-206, miR-133a, miR-27a, miR-155, miR-146a e miR-221 (p value < 0,0001) e del miR-133b (p value < 0,05) nei pazienti (5 maschi e 4 femmine) con un'età d'esordio prima dei 55 anni avvalorando la tesi di un coinvolgimento ormonale nella regolazione dei miRNA.

3)Studio di biomarkers sierici dopo riabilitazione: Nel progetto ho, anche, considerato lo studio dei myomiRNA circolanti nel siero prima (T0) e dopo la riabilitazione (T1). Tale analisi è stata eseguita in 12 pazienti SLA (8 maschi e 4 femmine) che hanno seguito un piano di esercizio aerobico e di rinforzo muscolare nel corso di 8 settimane. In questi pazienti, dopo la riabilitazione,

ho osservato una tendenza significativa alla diminuzione dei myomiRNA che puo' essere in rapporto ad un aumento della funzionalità muscolare, convalidata dalle scale Barthel e FIM. La diversa funzione muscolare puo' essere un indice di proliferazione sia di cellule satelliti muscolari che di aumento delle giunzioni neuromuscolari.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano che i myomiRNA possono essere utilizzati come biomarcatori circolanti non invasivi nella SLA, in accordo con i processi di denervazione e di reinnervazione, nei differenti sottotipi clinici di malattia.

Nelle biopsie muscolari la deregolazione dei myomiRNA e dei miRNA infiammatori, supporta la tesi di un coinvolgimento muscolare e infiammatorio nei primi stadi di malattia.

Le differenze osservate nei livelli di espressione dei miRNA tra pazienti maschi e femmine e, tra pazienti sopra e sotto i 55 anni d'età, potrebbero implicare un'interessante regolazione ormonale.

L'aumento dei myomiRNA corrisponde ad un aumento di atrofia muscolare che è inversamente correlato con il grado di atrofia.

Si è visto che i livelli di espressione del miR-1, nel muscolo, sono deregolati solo tra pazienti e controlli e non cambiano con l'età o con il sesso.

Le differenze osservate nei sottogruppi di pazienti SLA potrebbero suggerire un possibile ruolo dei microRNA negli eventi patogenetici.

I cambiamenti dei myomiRNA nel siero dopo esercizio fisico riabilitativo indicano una risposta funzionale alla riabilitazione.

Questo studio apre promettenti strade nella comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti in questa malattia anche se ulteriori ricerche sono necessarie.

BIBLIOGRAFIA

-*Aitkens SG, McCrory MA, Kilmer DD, Bernauer EM.* Moderate resistance exercise program: its effect in slowly progressive neuro-muscular disease. Arch Phys Med Rehabil. 1993; 14:1253-6.

-*Alexandrov PN, Dua P, Lukiw WJ.* Up-regulation of miRNA-146a in progressive, age-related inflammatory neurodegenerative disorders of the human CNS. Frontiers in Neurology. 2014; 5:181. eCollection 2014.

-*Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T.* A uniform system for micro-RNA annotation. RNA. 2003; 9:277-279.

-*Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K.* Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. Develop Biol. 2004; 270:19–30.

-*Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:5003-8.

-*Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY.* Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. J Physiol. 2011; 589:3983–3994.

-*Baldwin KM and Haddad F*. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; 81:S40-S51.

-*Bassel-Duby R, Olson EN*. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75:19-37.

-*Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Millul A, Mitchell D, Swingler R, Traynor BJ*. Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: Results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010; 11:289–292.

-*Bell ML, Buvoli M, Leinwand LA*. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol cell biol*. 2010; 30:1937-1945.

-*Bello-Haas VD, Florence JM, Kloos AD, Scheirbecker J, Lopate G, Hayes SM, Piro EP, Mitsumoto H*. A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS. *Neurology*. 2007; 68:2003–07.

-*Bhaskaran M and Mohan M*. MicroRNAs: history, Biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. 2014; 51:759-774.

-*Blasco H, Guennoc AM, Veyrat-Durebex C, Gordon PH, Andres CR, Camu W, Corcia P*. Amyotrophic lateral sclerosis: a hormonal condition? *Amyotroph Lateral Scler*. 2012; 13:585–8.

-*Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW*. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006; 312:1389-1392.

-Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. PloS Biol 2005; 3:e85.

-Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000; 1:293–9

-Brown RH. Medicine. A reinnervating microRNA. Science. 2009; 326:1494-1495.

-Bruneteau G, Simonet T, Bauché S, Mandjee N, Malfatti E, Girard E, Tanguy ML, Behin A, Khiami F, Sariali E, Hell-Remy C, Salachas F, Pradat PF, Fournier E, Lacomblez L, Koenig J, Romero NB, Fontaine B, Meininger V, Schaeffer L et al. Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. Brain. 2013; 136:2359-2368.

-Buratti E, De Conti L, Stuani C, Romano M, Baralle M, Baralle F. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. FEBS J. 2010; 277:2268-2281.

-Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, Doykan CE, Wu PM, Gali RR, Iyer LK, Lawson R, Berry J, Krichevsky AM, Cudkowicz Me, Weiner HL. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. J Clin Invest. 2012; 122:3063-3087.

-Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ.

MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119:2772–2786.

-Campos-Melo D, Dropplemann CA, He Z, Volkening K, Strong MJ. Altered microRNA expression profile in amyotrophic lateral sclerosis: a role in the regulation of NFL mRNA levels. *Mol Brain*. 2013; 6:26.

-Cardinali B, Castellani L, Fasanaro P, Basso A, Alema S, Martelli F, Falcone G. MicroRNA-221 and MicroRNA-222 Modulate Differentiation and Maturation of Skeletal Muscle Cells. 2009;10:e7607.

-Charcot JM, Joffroy A. Two cases of progressive muscular atrophy with lesions in the gray matter and in the anterolateral bundles of the spinal cord. *Arch Physiol Neurol Pathol*. 1869; 2:744-754.

-Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; 38:228-233.

-Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008; 18:997-1006.

-Chen X, Huang Z, Chen D, Yang T, Liu G. Role of microRNA-27 in myoblast differentiation. 2014; 38:266-271.

-Chio A, Calvo A, Dossena M, Ghiglione P, Mutani R, Mora G. ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009; 10:205-209.

-Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 2006; 38:813–818.

-Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012; 8:467–477.

-Cozzolino M, Ferri A, Valle C, Carri MT. Mitochondria and ALS: implications from novel genes and pathways. *Mol Cell Neurosci* 2013; 55:44-9.

-Dai R and Ahmed SA. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Therap and Clin R Manag.* 2014; 10:151-163

-Di Carlo V, Grossi E, Laneve P, Morlando M, Dini Modigliani S, Ballarino M, Bozzoni I, Caffarelli E. TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Mol Neurobiol.* 2013; 48:952-63.

-Droppelmann CA, Campos-Melo D, Ishtiaq M, Volkening K, Strong MJ. RNA metabolism in ALS: when normal processes become pathological. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2014; 15:321-336.

-Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD. The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2001; 191:133–137.

-*Drummond MJ, Glynn EL, Fry CS, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB.* Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle. *Journal Nutr.* 2009; 139:2279–2284.

-*Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J et al.* MiR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell.* 2010; 140:652-665.

-*Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K.* Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011; 717:85-90.

-*Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.* Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008; 9:102-14.

-*Freischmidt A, Muller K, Ludolph AC, Weishaupt JH.* Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2013; 1:42.

-*Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L.* The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6:208.

-*Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D, Head SR, Yates JR 3rd, Salomon DR.* MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2011; 187:2233-2243.

-Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*. 1997; 17:71–74.

-Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hale ED. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1996; 39:147-57.

-Huang Z, Chen X, Yu B, He J, Chen D. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 423:265-269.

-Hawkins P and Morris KV. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle*. 2008. 7:602-607.

-Jeng SF, Rau CS, Liliang PC, Wu CJ, Lu TH, Chen YC, Lin CJ, Hsieh CH. Profiling muscle-specific microRNA expression after peripheral denervation and reinnervation in a rat model. *J Neurotrauma*. 2009; 26:2345-2353.

-Johnson BS, Snead D, Lee JJ, McCaffery JM, Shorter J, Gitler AD. TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *J. Biol. Chem*. 2009; 284:20329-20339.

-Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative disease and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2012; 133:142-150.

-Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*. 1997; 7:910–16.

-Kawahara Y1 and Mieda-Sato Y. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes .*PNAS*. 2012; 109:3347–3352.

-King I, Yartseva V, Salas D, Kumar A, Heidersbach A, Ando DM, Stallings NR, Elliott JL, Srivastava D, Ivey KN. The RNA binding protein TDP-43 selectively disrupts microRNA-1/206 incorporation into the RNA-Induced Silencing Complex. *J Biol Chem* 2014; 289:14263-71.

-Krause Neto W, Polican Ciena A, Anaruma CA, de Souza RR, Gama EF. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. *Res Notes*. 2015; 8:713.

-Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003; 9:175-179.

-Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem*. 2007; 277:49831–49840.

-Lee RC, Feinbaum, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75:843-854.

-Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20:61-86.

-Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA target. *Cell*. 2005; 120:15-20.

-Lin RJ, LinYC, Yu AL. MiR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog*. 2010;49:719-727.

-Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3'UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:9667-9672.

-Lu C, Huang X, Zhang X, Raensch K, Cao Q, Nakayama KI, Blazar BR, Zeng Y, Zhou X. MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood*. 2011; 117:4293-4303.

-Ma G, Wang Y, Li Y, Cui L, Zhao Y, Zhao B, Li K. MiR-206, a key modulator of skeletal muscle development and disease. *Int. J. Biol. Sci*. 2015; 11:345-352.

-Marcuzzo S, Kapetis D, Mantegazza R, Baggi F, Bonanno S, Barzago C, Cavalcante P, Kerlero de Rosbo N, Bernasconi P. Altered miRNA expression is associated with neuronal fate in G93A-SOD1 ependymal stem progenitor cells. *Exp Neurol*. 2014; 253:91-101.

-Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*; 1995; 374:360-363.

-*McCarthy JJ, Esser KA*. MicroRNA-1 and microRNA-133^a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2007; 102:306-313.

-*McCombe PA, Henderson RD*. Effects of Gender in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gender Medicine*. 2010; 7:557-570.

-*McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZ, Lau HY, Lokireddy S, Xiaojia G, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R*. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Cell Physiol*. 2011;301:C195–C203.

-*McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R*. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006; 209:501–514.

-*McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, Lokireddy S, Ge X, Bonala S, Manickam R, Kambadur R, Sharma M*. Negative Auto-Regulation of Myostatin Expression is Mediated by Smad3 and MicroRNA-27. *PloS ONE*. 2014; 9:e87687.

-*McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ*. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 1997; 387:83-90.

-*Mitchelson KR, Qin WY*. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem*. 2015; 6:162-208.

-Morlando M, Dini Modigliani S, Torrelli G, Rosa A, Di Carlo V, Caffarelli E, Bozzoni I. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. EMBO J. 2012; 31:4502-4510.

-Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs . PLoS Genetics. 2007; 3:e79.

-Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of Immunology. 2011; 187:2213-2221.

-O' Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nat Rev Immunol. 2010; 10:111-122.

-O' Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:1604-1609.

-Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002; 99:910-914.

-Paez-Colasante X, Figueroa-Romano C, Sakowski SA, Goutman SA, Feldman EL. Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. Nat.Rev. Neurol. 2015; 11:266-279.

-Pinto AC, Alves M, Nogueira A, Evangelista T, Carvalho J, Coelho A, de Carvalho M, Sales-Luís ML. Can amyotrophic lateral sclerosis patients with respiratory insufficiency exercise?. *J Neurol Sci.* 1999; 169:69-75.

-Potthoff MJ, Olson EN, Bassel-Duby R. Skeletal muscle remodeling. *Curr Opin Rheumatol.* 2007; 19: 542-549.

-Pratt AJ, Getzoff ED, Perry JJP. Amyotrophic lateral sclerosis: update and new developments. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2012; 2:1-14.

-Rachagani S, Cheng Y, Reecy JM. Myostatin genotype regulates muscle-specific miRNA expression in mouse pectoralis muscle. *BMC Res Notes* 2010; 3:297.

-Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:8721-8726.

-Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403:901–6.

-Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011; 72:257-268.

-Robberecht W and Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14:248-264.

-Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve.* 2009; 39:283-296.

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

-Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007; 316:608-611.

-Rosen AD. Amyotrophic lateral sclerosis. Clinical features and prognosis. *Arch Neurol.* 1978; 35:638–42.

-Rujuan D and Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res.* 2011; 157: 163-179.

-Russell AP, Wada S, Vergani L, Hock MB, Lamon S, Léger B, Ushida T, Cartoni R, Wadley GD, Hespel P, Kralli A, Sorarù G, Angelini C, Akimoto T. Distruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2012; 49C:107-17.

-Sawada S, Kon M, Wada S, Ushida T, Suzuki K, Akimoto T. Profiling of Circulating MicroRNAs after a Bout of Acute Resistance Exercise in Humans. *PloS ONE*. 2013; 8:e70823.

-Scaramozza A, Marchese V, Papa V, Salaroli R, Sorarù G, Angelini C, Cenacchi G. Skeletal muscle satellite cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 2014; 38:295-302

-Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N E J Med*. 1997; 350:2682–2688.

-Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115:199-208.

-Serria MS, Ikeda H, Omoteyama K, Hirokawa J, Nishi S, Sakai M. Regulation and differential expression of the c-maf gene in differentiating cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310:318-26.

-Sharma KR, Kent-Brown JA, Majumdar S, Huang Y, Mynhier M, Weiner MW, Miller RG. Physiology of fatigue in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1995; 45:733-40.

-Snijders T, Nederveen JP, McKay BR, Joanise S, Verdijk LB, van Loon LJ, Parise G. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol*. 2015; 6:283.

-Sokol NS. The role of microRNAs in muscle development. *Curr Top Dev Biol*. 2012; 99:59-78.

-Su W, Aloisi MS, Gardena GA. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain Behav Immun.* 2015; Epub.

-Su XW, Broach JR, Connor JR, Gerhard GS, Simmons Z. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve.* 2014; 49:786-803.

-Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146a, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:12481-12486.

-Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, Kull FC Jr, Gonzalez-Cadavid N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:E221–E228.

-Tasca E, Pegoraro V, Merico A, Angelini C. Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS. *Clin Neuropathol.* 2016; 35:22-30

-Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:569–579.

-Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AD, Shakey QA, Walfman NM. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors.* 2001; 18:251-259.

-Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 2000; 275:40235–40243.

-Toivonen JM, Manzano R, Olivan S, Zaragoza P, Garcia-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* .2014; 9:e89065.

-Townley-Tilson WHD, Callis TE, Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J of Bioch e Cell Biol*. 2010; 42:1252-1255.

-Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K. Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum. Mol. Genet*. 2010; 19:815-824.

-Valdez G, Heyer MP, Feng G, Sanes JR. The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. *PLoS One*. 2014; 9:e93140.

-Vasulevan S. Post-transcriptional upregulation by MicroRNAs. *WIREs RNA*. 2012; 3:311-330.

-Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13:423-33.

-Voigt A, Herholz D, Fiesel FC, Kaur K , Muller D , Karsten P, Weber SS, Kahle PJ, Marquardt T, Schulz JB. TDP-43-mediated neuron loss in vivo requires RNA-binding activity. *PLoS ONE*. 2010; 5:e12247.

-Volontè C, Apolloni S, Parisi C. MicroRNAs: Newcomers into the ALS Picture. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2015; 14:24-32.

-Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:7248-59.

-Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldam GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochemical and Biophysical Communication*. 2003; 300:965-971.

-Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, Bassel-Duby R, Sanes JR, Olson EN. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science*. 2009; 326:1549-1554.

-Winbanks CE, Beyer C, Hagg A, Qian H, Sepulveda PV, Gregorevic P. miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. *PLoS One*. 2013; 8:e73589-Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:4034-4039.

-Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(26):15842-6.

-Wu RH, Wang P, Yang L, Li Y, Liu Y, Liu M. A potential indicator of denervated muscle atrophy: the ratio of myostatin to follistatin in peripheral blood. *Genet Mol Res.* 2011;10:3914-3923.

-www.uniprot.org.

-Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, Shang X, Zhang ZG, Chopp M. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells.* 2012; 30:1556-1564.

-Yamazaki T, Chen S, Yu Y, Yan B, Haertlein TC, Carrasco MA, Tapia JC, Zhai B, Das R, Lalancette-Hebert M, Sharma A, Chandran S, Sullivan G5, Nishimura AL, Shaw CE, Gygi SP, Shneider NA, Maniatis T, Reed R. FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell Rep.* 2012; 2:799-806.

-Yan B, Zhu CD, Guo JT, Zhao JL. MiR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression. *J Exp Biol.* 2013; 216:1265-269.

-Yang T, Chen XL, Huang ZQ, Wen WX, Xu M, Chen DW, Yu B, He J, Luo JQ, Yu J, Mao XB, Zheng P. MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression. *Animal.* 2014; 8:1867-1872.

-Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct.* 2008; 33:163-169.

-Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 2005; 24:138-148.

-Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009; 2:ra81.

-Zhou F, Guan Y, Chen Y, Zhang C, Yu L, Gao H, Du H, Liu B, Wang X. MiRNA-9 expression is upregulated in the spinal cord of G93A-SOD1 transgenic mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6:1826-1838.

-Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011; 1:138-149.

APPENDICE

Resoconto attività di ricerca svolta nel triennio

Nel gennaio 2013 ho iniziato il Dottorato di ricerca svolgendo il mio progetto presso il laboratorio di biologia molecolare IRCCS San Camillo (Venezia) afferente alla linea di ricerca 1 'Presupposti neurobiologici del recupero funzionale', responsabile Prof. Corrado Angelini durante il quale mi sono occupata di ricerca transazionale, di metodologie di carattere biomolecolare e di biomarkers in malattie Neuromuscolari. Inoltre mi sono occupata dello studio di espressione di microRNA in pazienti omozigoti ed eterozigoti per il gene PNPLA2.

Ho partecipato alla studio farmacologico BIA sulla malattia di Parkinson (marzo 2013-novembre 2014) in qualità di Biotecnologa. Mi sono occupata dell'allestimento di colture cellulari primarie di fibroblasti umani derivanti da biopsie di cute. Ho partecipato alla gestione della biobanca BBMRNR presente all'IRCCS San Camillo e facente parte del nodo europeo BBMRI-ERIC. Nella mia tesi di Dottorato mi sono occupata di 'MicroRNA e Molecole Proteiche come Biomarcatori dei sottotipi clinici di SLA':

Introduzione:

La SLA, Sclerosi Laterale Amiotrofica, è una malattia rara, progressiva, neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni del midollo spinale, del tronco, della corteccia motoria. La perdita dei motoneuroni porta ad atrofia muscolare, debolezza muscolare, fascicolazioni e spasticità. Circa due terzi dei pazienti con SLA presentano una forma spinale della malattia che comincia dagli arti superiori od inferiori e sintomi associati a stanchezza con atrofia muscolare. La spasticità progredisce dagli arti inferiori causando (nella variante denominata di Patrikios) un graduale indebolimento e atrofia degli arti, con effetti clinici, nelle forme con coinvolgimento del primo motoneurone, sia sulle abilità manuali che nella marcia. I pazienti che presentano un esordio bulbare della malattia manifestano inizialmente disartria e disfagia per solidi e liquidi. La Paralisi progressiva bulbare causa la morte per insufficienza respiratoria dopo una media di 2-3 anni, nei casi ad esordio bulbare, mentre la SLA spinale porta a decesso dopo 3-5 anni, nei casi ad esordio spinale. La nostra ipotesi è che i segnali di 'pathways' coinvolti nella crescita muscolare e nel mantenimento siano disregolati nelle SLA e ciò contribuisca alla manifestazione clinica della malattia. Gli effetti dell'esercizio fisico e della riabilitazione in pazienti affetti da SLA sono ancora dibattuti: se un paziente è inattivo, la perdita di allenamento e il disuso portano all'atrofia muscolare, che si va a sommare alla debolezza e all'atrofia muscolare causata dalla denervazione e dalla degenerazione dei motoneuroni. Ipotizziamo che la reversione dell'atrofia muscolare dovuta all'esercizio fisico può aumentare la funzione trofica muscolare e fornire un migliore stimolo per la formazione di nuove sinapsi.

Di fondamentale importanza è l'identificazione di nuovi biomarcatori che diano indicazioni sia sull'esordio che sulla progressione di malattia e possano essere usati come indicatori della risposta terapeutica in trials clinici/riabilitativi. Si sono quindi analizzati una nuova classe di molecole di RNA regolatori: i microRNA (miRNAs) che sono piccole molecole di RNA non codificante, altamente conservate, che regolano l'espressione di una rete di geni a livello post trascrizionale e sono alterati in varie malattie. Studi hanno dimostrato che molti geni codificanti proteine umane sono regolati dai miRNAs, indicando che i miRNAs sono "master regulators" di molti importanti processi biologici. L'up-regolazione di uno specifico microRNA determina un decremento dell'espressione del prodotto proteico corrispondente. Abbiamo

studiato microRNA presenti nel siero e in biopsie muscolari in pazienti affetti da SLA e in controlli sani. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione su microRNA muscolo-specifici, i MyomiRNA (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 e 27a), coinvolti in molti processi della fisiologia muscolare e un pannello di microRNA coinvolti nei processi infiammatori e angiogenici (miR-155, miR-146a, miR-221 e miR-149*).

Obiettivi:

Lo scopo della mia tesi è l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari e biochimici che facilitino lo studio dei vari sottotipi di SLA, che diano informazioni sulla progressione della malattia e che possano essere utilizzati come indicatori di risposta in trials clinico-riabilitativi.

Attività svolta:

I pazienti e i controlli sani reclutati per lo studio sono stati sottoposti a due prelievi ematici, prima e dopo trattamento riabilitativo chiamati rispettivamente tempo zero (T0) e tempo uno (T1). Mi sono occupata del processamento, dello stoccaggio e della conservazione del materiale biologico (siero e plasma) dei pazienti. Inoltre i dati anagrafici, clinici e riabilitativi sono stati raccolti in uno specifico database.

Il lavoro è stato suddiviso in tre parti:

- a) **Studio di biomarkers circolanti in siero e plasma:** valutazione dei livelli di espressione dei microRNA muscolo specifici (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-27a) e di un pannello di microRNA infiammatori e angiogenici (miR-155, miR-146a, miR-221, miR-149*) circolanti nel siero di pazienti affetti da SLA e in controlli sani. I pazienti affetti da SLA sono stati divisi in esordio bulbare e spinale e comparati con i controlli. Abbiamo analizzato i livelli plasmatici di Miostatina e Follistatina tramite saggi ELISA in pazienti affetti da SLA e in controlli sani. Abbiamo calcolato il rapporto tra Miostatina e Follistatina e correlato tale rapporto con i livelli di espressione del microRNA-27a.
- b) **Studio di biomarkers nel tessuto muscolare di SLA:** valutazione dei livelli di espressione dei microRNA muscolo specifici (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-27a) e di un pannello di microRNA infiammatori e angiogenici (miR-155, miR-146a, miR-221, miR-149*) in 16 biopsie muscolari di pazienti affetti da SLA e in controlli (persone non affette da malattie muscolari). Campioni dati dalla biobanca Telethon di Padova 'The Neuromuscular Bank of Tissues and DNA samples' diretta dalla Prof.ssa Elena Pegoraro. E' stata eseguita analisi morfometrica delle biopsie muscolari ottenute al momento della diagnosi. Sono stati, inoltre, valutati i livelli di espressione di questi microRNA nei pazienti suddivisi per sesso e per età d'esordio.
- c) **Studio di biomarkers sierici nel corso di riabilitazione:** valutazione di microRNA in pazienti affetti da SLA sottoposti a diverso trattamento riabilitativo nel siero a T0 e T1.

Risultati:

1. **Studio di biomarkers circolanti:** nella prima parte del progetto sono stati analizzati i livelli di espressione dei miRNAs circolanti muscolo-specifici (miR-206, miR-1, miR-133a, miR-133b) e implicati nell'infiammazione (miR-155, miR-146a, miR-221 e miR-149*) nel siero di 14 pazienti affetti da SLA (6 femmine e 8 maschi): 4 con esordio bulbare, 10 con esordio spinale e in controlli sani. Si è osservato un incremento dei livelli di espressione del miR-206 e del miR-133b nei pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli. Si è notato una up-regolazione significativa dei miR-206, miR-133a, miR-133b nei pazienti con esordio spinale rispetto ai pazienti con esordio bulbare. I

microRNAs 146a e 149* circolanti risultano significativamente ridotti nei pazienti SLA rispetto ai controlli, mentre il miRNA-221 e miRNA-155 non differiscono tra pazienti e controlli. Il miRNA-155 risulta significativamente down-regolato nei pazienti con esordio bulbare rispetto ai pazienti con esordio spinale. E' stata valutata, inoltre, l'espressione del miRNA-27a che risulta significativamente down-regolato nei pazienti rispetto ai controlli. Abbiamo trovato una correlazione inversa tra i livelli di espressione del miR-27a e il rapporto tra i livelli plasmatici di Miostatina e Follistatina. E' stata condotta analisi morfometrica, tutte le fibre muscolari dei pazienti mostrano atrofia, in particolare i pazienti affetti da SLA ad esordio bulbare presentano un atrofia più severa sia come "cross sectional area" che "fiber diameter".

2. **Studio di biomarkers nel tessuto muscolare di SLA:** Sono stati valutati i livelli di espressione di 9 microRNA in biopsie muscolari di 16 pazienti affetti da SLA (9 maschi e 7 femmine) e in controlli. I livelli di espressione di miR-1, miR-206, miR-133a, miR-133b, miR27a, miR-155, miR-146a, miR-221 sono risultati significativamente up-regolati nei pazienti rispetto ai controlli. Abbiamo suddiviso il nostro campione di pazienti in due sottogruppi in base a sesso ed età d'esordio ("cut-off" posto arbitrariamente a 55 anni). Nel muscolo di SLA i livelli di espressione di tutti i miRNA risultano up-regolati nei pazienti di sesso maschile rispetto ai pazienti di sesso femminile, implicando un controllo ormonale, ad eccezione del miR-1 e del miR-149* nei quali non si osservano differenze. Sono stati analizzati i livelli di espressione di questi miRNA in pazienti con età d'esordio della malattia sopra e sotto i 55 anni d'età e si è trovato una down-regolazione significativa di questi miRNA nei pazienti con età sopra i 55 anni, con eccezione del miR-1 e del miR-149
3. **Studio di biomarkers sierici dopo esercizio fisico:** nella terza parte del progetto ho focalizzato l'attenzione sullo studio dei microRNA circolanti nel siero al T0 e al T1 riscontrando alterazione nei livelli di espressione dei microRNA dopo terapia fisica. Sono stati confrontati i livelli di espressione di questi microRNA, dopo riabilitazione, in 15 pazienti che avevano seguito un piano riabilitativo osservando una tendenza significativa alla diminuzione dei myo-miRNAs indice di proliferazione sia di cellule satelliti muscolari che di aumento delle giunzioni neuromuscolari.

Publicazioni:

- Tasca E, **Pegoraro V**, Merico A, Angelini C. **Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS.** Clin Neuropathol. 2016; 35:22-30. IF 1.53
- Vallelunga A., **Pegoraro V.**, Pilleri M., Biundo R., De Iulius A., Marchetti M., Facchini S., et Al. **The MTHFR C677T polymorphism modifies age at onset in Parkinson's disease.** Neurol Sci DOI 10.1007/s10072-013-1545-z. 2013 Sep. IF 1.43

Comunicazioni orali:

- Angelini C, Tasca E, **Pegoraro V.** **'Investigation of regulatory factors in lipid storage myopathies (LSM) with triglyceride accumulation.** XXII World Congress of Neurology (WCN) 2015, Santiago.

Posters:

- Angelini C, **Pegoraro V**, Tasca E **The rare disease Biobank for Neurorehabilitation: a useful tool for patients and researchers.** Hands on Biobanks Milano July 29-31; 2015
- Tasca E, **Pegoraro V**, Merico A, Angelini C **Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy.** AIM Napoli, May 20-23; 2015

Partecipazione a convegni anno 2015 in qualità di relatore:

- **Spring School Bressanone**, 29-30 maggio 2015
- Convegno **'Nuovi approcci e nuove tecnologie nel percorso assistenziale della SLA'** supportato da AISLA, con accreditamento crediti ECM con presentazione dal titolo **'MyomiRNA circolanti come biomarcatori nella SLA'**, 27-02-2015, IRCCS San Camillo.

Attività seminariale seguita anno 2015:

- 1) 3 febbraio 'Trapianto di cellule staminali nella sclerosi multipla' Prof. A. Uccelli, Clinica Neurologica (PD).
- 2) 27 febbraio 'Nuovi approcci e nuove tecnologie nel percorso assistenziale della SLA' IRCCS San Camillo (Ve)
- 3) 19 marzo Regain study investigator meeting "ECU-MG-301 a randomized, double-blind, placebo controlled, multi-center study to evaluate the safety and efficacy of Eculizumab in subjects with refractory generalized Myasthenia gravis" , Prague, Czech Republic.
- 4) 30 aprile/3 dicembre SEMINARI SCIENTIFICI DEL GIOVEDÌ', IRCCS San Camillo (Ve):
 1. 30 aprile Meccanismi del recupero post-ictus. Dott. Paolo Tonin
 2. 7 maggio A network-based cognitive rehabilitation in patients with multiple sclerosis and mild cognitive impairment: effects on functional connectivity. Dott.ssa Micaela Mitolo
 3. 14 maggio Efficacia clinica dell'applicazione di un esoscheletro per la riabilitazione dell'arto superiore. Dott.ssa Liliana Paredes
 4. 28 maggio Realtà virtuale nel Progetto riabilitativo del paziente con disabilità neurologica. Dott.ssa Andrea Turolla
 5. 25 giugno Indici RMN nei parkinsonismi. Dott. Luca Weis

6. 9 luglio Nuovo approccio al deficit motorio nella SLA: elettrostimolazione funzionale Dott. Alfonc Baba
 7. 16 luglio Strategie riabilitative nella malattia di Parkinson. Dott. Andrea Marcante
 8. 9 settembre (mercoledì) Real Haptics for Development of Super-Mature Society. Kouhei Ohnishi
 9. 10 settembre Functional mapping, MEG and language. Dott.ssa Elisabeth Pang
 10. 17 settembre Assisted, Individualised Muscle Strengthening for Health and Independence (AIMS-HI). Prof. Ugo Carraro
 11. 1 ottobre Abilità finanziarie in pazienti con Mild Cognitive Impairment. Dott.ssa Francesca Burgio
 12. 8 ottobre Trattamento dell'arto inferiore con Realtà Virtuale. Dott. Salvatore Pernice
 13. 12 novembre Avanzamento delle conoscenze sulle Sinergie Muscolari e ricadute cliniche. Dott. Andrea Turolla
 14. 26 novembre Basi biologiche dell'efficienza cognitiva nell'invecchiamento normale e patologico: neuroplasticità, processi compensatori e maladattativi. Prof. Annalena Venneri
 15. 3 dicembre Trattamento motorio di mano e dita con il sistema robotico Amadeo. Dott. Alfonc Baba.
- 24 settembre 1° Infoday Horizon 2020: 'How to write a successful proposal in Horizon 2020'agenzia APRE, IRCCS San Camillo
 - 8-9 ottobre BRAIN DM1 DAYS 2015 III edizione 'Progressi nella Diagnosi e nel Trattamento della Distrofia Miotonica di tipo 1 e della Malattia da Accumulo di Lipidi'.

Attività seminariale seguita anno 2014:

- 3 marzo, 'Proactive control of response inhibition', Prof. Philippe Boulinguez, clinica Neurologica (Pd).
- 27 marzo, 'Corso di formazione Bibliosan: BP e BMJ, WoS, Refworks', IRCCS San Camillo (Ve).
- 3 aprile, 'Training event of stroke rehabilitation', IRCCS San Camillo (Ve),
- 4-5 aprile, 'International workshop on muscle synergies', Venice,
- 22 maggio, 'Coenzyme Q biosynthesis from yeast to humans', clinica Neurologica (Pd)
- 3-6 giugno, 'Corso di Science Publishing and communication', Prof John Funder, Biblioteca anatomia patologica (Pd).
- dal 29-5 al 31-7 e dal 30-10 al 18-12-2014, 'Seminari scientifici del giovedì', IRCCS San Camillo (Ve).
- 10 settembre, 'Brain DM1 Days II edition', Clinica neurologica (Pd) e IRCCS San Camillo (Ve)
- 15-17 ottobre, 'LGMD DAYS', IRCCS San Camillo (Ve).
- 20 ottobre, 'Convegno di presentazione attività di ricerca dei dottorandi del XXVIII ciclo', Aula Magna Palazzo Bo (Pd).
- 6 novembre, 'San Camillo Science day', IRCCS San Camillo (Ve).

Attività seminariale seguita anno 2013:

- 19-20 giugno, 'Brain DM1 days', IRCCS San Camillo (Ve).
- 5-6 settembre, 'Patologie del Motoneurone: aggiornamenti, SLA dalla diagnosi all'assistenza', IRCCS San Camillo (Ve).
- 8 ottobre, 'BBMRI Kick off meeting', Verona Palazzo della Gran Guardia.

FORMATO EUROPEO
PER IL CURRICULUM
VITAE



INFORMAZIONI PERSONALI

Nome **VALENTINA PEGORARO**
Indirizzo **VIA FRANCESCO MARCOLINI N.11, 30126 VENEZIA-LIDO**
Telefono **+39041770425** Cellulare: **+393403799214**
mail **valentina.pegoraro86@gmail.com**
Data di nascita **13/04/86**

ESPERIENZA LAVORATIVA

- Date (da – a) 1 Gennaio 2013 al 31 dicembre 2015
- Nome e indirizzo del datore di lavoro IRCCS Fondazione Ospedale San Camillo
Via Alberoni 70, 30126 Venezia-Lido
- Tipo di azienda o settore Centro Studi Malattie Neuromuscolari: Laboratorio di ricerca in Neurobiologia Molecolare
- Tipo di impiego **Dottoranda**
- Principali mansioni e responsabilità Attività di ricerca traslazionale in Neurobiologia. Studio di microRNA in siero e biopsie muscolari per lo studio di nuovi biomarcatori in varie patologie Neuromuscolari: SLA, DM1, paraparesi. Valutazione di markers molecolari e biochimici in pazienti sottoposti a trattamento riabilitativo.
Partecipazione alla studio farmacologico BIA sulla malattia di Parkinson (marzo 2013-novembre 2014) . Responsabile per il nostro centro Dott. Angelo Antonini.
Allestimento di colture cellulari primarie di fibroblasti umani derivanti da biopsie di cute.
Partecipazione alla gestione della Biobanca BBMRNR presente nell' IRCCS e facente parte del nodo italiano BBMRI-IT, in tutte le sue fasi: reclutamento dei pazienti, organizzazione dei prelievi, stoccaggio, conservazione, manipolazione di materiale biologico (DNA, siero, plasma, saliva, linee cellulari), gestione del database e delle richieste interne ed esterne dei campioni.
- Date (da – a) 15 Febbraio 2012 a 31 Dicembre 2012
- Nome e indirizzo del datore di lavoro IRCCS Fondazione Ospedale San Camillo
Via Alberoni 70, 30126 Venezia-Lido
- Tipo di azienda o settore Laboratori di ricerca biologica
- Tipo di impiego **Contratto di collaborazione a progetto (cocopro)** al fine di svolgere attività di ricerca presso i laboratori di Neurobiologia Molecolera, biologia cellulare e neurochimica.
- Principali mansioni e responsabilità Attività di ricerca traslazionale in neurobiologia, studio di vari polimorfismi genetici con metodi classici e saggi HRM ,colture cellulari neuronali, gestione biobanca BBMRNR
- Date (da – a) Settembre 2011-Dicembre 2011
- Nome e indirizzo del datore di lavoro IRCCS Fondazione Ospedale San Camillo
Via Alberoni 70, 30126 Venezia-Lido
- Tipo di azienda o settore Laboratori di ricerca biologica
- Tipo di impiego **Frequentante Volontaria**
- Principali mansioni e responsabilità Attività di ricerca in biologia cellulare, allestimento di colture cellulari neuronali.

ISTRUZIONE E FORMAZIONE

Date (da -a)	01/01/2013 al 31 dicembre 2015
<ul style="list-style-type: none">• Corso di studi	Dottoranda in Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali, indirizzo: Neuroscienze
<ul style="list-style-type: none">• Responsabile	Università degli Studi di Padova Prof. Corrado Angelini
Borsa/ finanziamento	Vincitrice di borsa di studio finanziata da IRCCS Fondazione San Camillo
<ul style="list-style-type: none">• Date (da – a)	Ottobre 2008 – Dicembre 2010
<ul style="list-style-type: none">• Titolo della qualifica rilasciata	Laurea Specialistica in Biotecnologie Industriali
<ul style="list-style-type: none">• Titolo elaborato di laurea	Curriculum: Genomica e Proteomica funzionale
<ul style="list-style-type: none">• Responsabile	Votazione finale: 100/110 Regolazione reciproca di Ankrd2 e Nf-Kb nel differenziamento muscolare
<ul style="list-style-type: none">• Nome e tipo d'organizzazione erogatrice dell'istruzione	Prof. Gerolamo Lanfranchi, Direttore del Dipartimento di Biologia Università degli studi di Padova
<ul style="list-style-type: none">• Date (da – a)	Ottobre 2005 – Settembre 2008
<ul style="list-style-type: none">• Titolo della qualifica rilasciata	Laurea Triennale in Biotecnologie
<ul style="list-style-type: none">• Titolo elaborato di laurea	Clonaggio, Espressione, Purificazione e prove di cristallizzazione della proteina HP1286 di Helicobacter Pylori
<ul style="list-style-type: none">• Responsabile	Prof. Giuseppe Zanotti
<ul style="list-style-type: none">• Nome e tipo d'organizzazione erogatrice dell'istruzione e formazione	Università degli studi di Padova
<ul style="list-style-type: none">• Date (da – a)	Giugno 2005
<ul style="list-style-type: none">• Titolo della qualifica rilasciata	Diploma di maturità scientifica
<ul style="list-style-type: none">• Presso	Liceo Scientifico G. B. Benedetti di Venezia
MADRELINGUA	Italiano
ALTRE LINGUA	Inglese
<ul style="list-style-type: none">• Capacità di lettura	buono
<ul style="list-style-type: none">• Capacità di scrittura	buono
<ul style="list-style-type: none">• Capacità di espressione orale	buona
<ul style="list-style-type: none">• Livello	Francese discreto
CAPACITÀ E COMPETENZE ORGANIZZATIVE	Buona esperienza nella gestione organizzativa di un laboratorio e nella pianificazione ed esecuzione autonoma degli esperimenti.
CAPACITÀ E COMPETENZE RELAZIONALI	Capacità di lavorare in gruppo maturata in molteplici situazioni in cui era fondamentale la collaborazione tra diverse persone e l'utilizzo di spazi e attrezzature comuni. Esperienza di interazione con personale tecnico specifico di vario livello.
CAPACITÀ E COMPETENZE INFORMATICHE	Buona conoscenza dell'utilizzo del pacchetto Microsoft Office (word, excel e access) Ottima capacità di utilizzo dei motori di ricerca quali PubMed e Biblioson.

CAPACITÀ E COMPETENZE

TECNICHE

Con computer, attrezzature specifiche, macchinari, ecc.

Biologia Molecolare: tecniche di estrazione di DNA, RNA tramite Kit e metodo Trizol da sangue, siero, plasma, cellule e biopsie muscolari. Elettroforesi su gel, PCR, real-time PCR relativa e assoluta, HRM assay, isolamento microRNA da siero e plasma e biopsie muscolari, retrotrascrizione e saggi con sonde TAQMAN. Allestimento di colture batteriche, clonaggi estrazione e purificazione di DNA plasmidico.

Bioinformatica: Conoscenza e utilizzo delle principali banche dati per la costruzione di primer e allineamento di sequenze (Primer3, Blast.), e dei principali siti di predizione e interazione di micro-RNA e gene target (miRecords, miRanda, TargetScan...).

Culture cellulari: preparazione di campioni e soluzioni in sterilità, capacità di lavoro sotto cappa a flusso laminare, esperienza nell'allestimento e crescita di cellule primarie umane (fibroblasti di cute, intero processo da biopsia), colture di linee cellulari neurali tra cui PC12 e SHSY5Y, esperienza nella coltura, differenziamento e trasfezione stabile e transiente delle cellule muscolari murine C2C12.

Preparazione di campioni: esperienza quadriennale nella manipolazione di campioni di sangue umano, separazione siero, plasma, saliva e stoccaggio degli stessi. Preparazione di vetrini e strisci di sangue.

Tecniche biochimiche: dosaggi proteici in matrici quali plasma, siero e surnatante cellulare tramite MAGPIX e tecniche ELISA.

PUBBLICAZIONI

- 1) Tasca E, Pegoraro V, Merico A, Angelini C. **Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS.** Clin Neuropathol. 2016; 35:22-30.
- 2) Vallelunga A., Pegoraro V., Pilleri M., Biundo R., De Iulius A., Marchetti M., Facchini S., et Al. **The MTHFR C677T polymorphism modifies age at onset in Parkinson's disease.** Neurol Sci 2014; 35:73-77.

POSTER

- a) Angelini C, Pegoraro V, Tasca E **The rare disease Biobank for Neurorehabilitation: a useful tool for patients and researchers.** HandsOn:Biobanks Milano July 29-31; 2015
- b) Tasca E, Pegoraro V, Merico A, Angelini C **Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy.** AIM Napoli, May 20-23; 2015

COMUNICAZIONI ORALI

- i) C. Angelini, E. Tasca, V. Pegoraro. **Investigation of regulatory factors in lipid storage myopathies (LSM) with Triglycerides accumulation'** WCN 2015.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

- Convegno **'Nuovi approcci e nuove tecnologie nel percorso assistenziale della SLA'** in qualità di **relatore** con presentazione dal titolo **'Myomir circolanti come biomarcatori nella SLA'**, IRCCS San Camillo (Ve), 27-02-2015.
- **Convegno di presentazione attività di ricerca dei dottorandi del XXVIII ciclo**, Aula Magna Palazzo Bo (Pd), 20-10-2014 .

TRAINING E CORSI DI FORMAZIONE

- **Spring School Bressanone**, 29-30 maggio 2015
- **Training e certificazione IATA**, Transporting Dangerous Goods, Mayo Medical Laboratories, 3050 Superior Drive NW, Rochester, MN 55901, 16-12-2014.
- **Corso di Science Publishing and communication**, Prof John Funder, Biblioteca anatomia patologica (Pd), 3-6 giugno 2014.
- **Training e certificazione Good Clinical Practice (GCP), 2013.**

Dati personali

Autorizzo il trattamento dei miei dati personali ai sensi del Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n. 196 "Codice in materia di protezione dei dati personali".