



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Corso di Dottorato in NEUROSCIENZE

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Ciclo XXVIII

Analisi dei profili di espressione dei microRNA: identificazione di biomarker nel suicidio

Settore scientifico disciplinare di afferenza

SSD BIO/14 Farmacologia

Presentata da:	dott.ssa Paola Niola
Coordinatore Dottorato:	prof. Walter Fratta
Tutor:	prof.ssa Maria Del Zompo

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs playing an important role as post-transcriptional regulators of gene expression. A growing body of evidence has shown that alterations in miRNA expression pattern are associated with several pathological processes.

In particular, post-mortem brain studies support miRNA involvement in the pathophysiology of psychiatric disorders but their role as peripheral biomarkers or targets of pharmacological treatments has been scarcely investigated.

Our purpose was to identify potential biological correlates of suicide and to evaluate their role in the pathogenesis and pharmacotherapy of suicide. We conducted a high-throughput profiling of miRNAs in lymphoblastoid cell lines (LCLs), not-treated or treated with lithium *in vitro*, derived from bipolar suicide completers (S, n=7) and non-suicidal bipolar patients (NS, n=12). Global miRNA expression was measured using nCounter® miRNA expression Assay (NanoString Technologies). In total, 28 miRNAs were differentially expressed or regulated by lithium between the two groups at a *false discovery rate* of 0.1. Two miRNAs were validated with quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR): miR-4286, up-regulated in non-treated LCLs from S versus NS, and miR-186-5p, down-regulated in lithium-treated LCLs from S versus NS. Treatment of human neural progenitor cells with lithium down-regulated both miRNAs. Then, we evaluated the expression of these miRNAs in post-mortem brains from 12 suicidal bipolar subjects (S_{brain}) and 13 healthy controls (C_{brain}), showing an under-expression of miR-4286 in S_{brain} and no differences for miR-186-5p. Finally, we performed a *Gene Ontology* (GO) and *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) pathway analysis to clarify the possible role of the identified miRNAs in biological mechanisms involved in suicide. Results from GO analysis indicated that miR-4286 and miR-186-5p regulate the expression of key genes involved in neuronal processes as neurogenesis and synaptic plasticity. Whereas, KEGG pathway analysis showed that both miRNAs are involved in several biological pathways that could be related to suicide, such as *TGF-beta signaling pathway* and *long-term potentiation pathway*.

In conclusion, our study suggests that miR-4286 and miR-186-5p could constitute potential biomarkers of suicide and be involved in the mechanism of action of lithium.

Keywords: microRNA, suicide, Bipolar Disorder, biomarker

Indice

1 – Introduzione	1
1.1 Il suicidio	1
1.2 Il suicidio nel Disturbo Bipolare	3
1.3 Il litio nella prevenzione del suicidio nei disturbi dell'umore	5
2 – Genetica, epigenetica e neurobiologia del suicidio	8
2.1 Il sistema serotoninergico.....	9
2.2 Altri neurotrasmettitori	10
2.3 I fattori neurotrofici	11
2.4 L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene	11
2.5 Le poliamine	12
2.6 I microRNA.....	14
2.6.1 <i>Biogenesi e meccanismo d'azione</i>	15
2.6.2 <i>Il ruolo dei microRNA nelle malattie psichiatriche</i>	18
2.6.3 <i>Metodi di studio dei microRNA</i>	20
2.6.4 <i>Predizione dei miRNA target</i>	24
3 – Scopo della tesi	26
4 – Materiali e Metodi	28
4.1 Pazienti	28
4.2 Campione di colture cellulari di linfoblasti	29
4.3 Campione di tessuto cerebrale post-mortem	30
4.4 Campione di cellule progenitrici neurali	31
4.5 Estrazione di microRNA	31
4.6 NanoString nCounter miRNA expression	32
4.6.1 <i>Analisi statistica dei dati di NanoString</i>	33
4.7 Valutazione dei livelli di espressione dei miRNA identificati	34
4.7.1 <i>Analisi statistica dei dati di espressione</i>	36

4.8 Analisi di Gene Ontology	36
4.9 Analisi di pathway	37
4 – Risultati	38
5.1 Espressione dei miRNA nel campione di linfoblasti	38
5.2 Espressione dei miRNA nel campione di tessuto cerebrale	41
5.3 Espressione dei miRNA nel campione di NPC	42
5.4 Analisi di Gene Ontology	42
5.5 Analisi di pathway	45
6 – Discussioni	47
7 – Conclusioni	52
8 – Appendice	53
Bibliografia	55

1 - Introduzione

1.1 Il suicidio

Uno degli aspetti più complessi della vita umana è il suicidio; ad oggi non è ancora possibile definire in modo preciso e completo quali siano le caratteristiche di questo gesto estremo.

Nella maggior parte delle nazioni il suicidio è un grave problema sociale e costituisce una delle principali problematiche nell'ambito della salute pubblica. A livello globale, il suicidio rappresenta l'1,4% di tutte le morti, classificandosi quindicesima causa di decessi nel mondo (Organizzazione Mondiale della Sanità, OMS, 2015). È la seconda causa di morte nelle persone di età compresa tra i 15-29 anni e, nel 2012, è stata causa di disabilità per 39 milioni di persone che hanno tentato il suicidio (OMS, 2015). Secondo il rapporto dell'OMS pubblicato nell'agosto 2015, si stima che ogni anno 800.000 persone muoiano a causa di suicidio con una media di un suicidio ogni 40 secondi e un tentato suicidio ogni 3 secondi. Rispetto alla popolazione mondiale, il tasso di mortalità è pari a 11,4 per 100 mila persone per anno (OMS, 2015). Mentre in Italia, secondo il rapporto dell'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) pubblicato nel 2014, le morti per suicidio sono circa 4000 l'anno, corrispondenti a un tasso standardizzato di 7,0 per 100 mila abitanti, con una maggioranza nella popolazione maschile. I dati epidemiologici sulla prevalenza dei tentativi suicidari sono invece meno attendibili di quelli sul suicidio, vista l'assenza di registri nazionali che raccolgano tali informazioni. Tuttavia, si stima che i tentativi di suicidio sarebbero da 10 a 40 volte più frequenti dei suicidi completati (Bertolote et al., 2005).

La percentuale di suicidi è di solito più alta nei soggetti anziani, seppure negli ultimi 50 anni il tasso sia aumentato notevolmente nelle persone giovani, specialmente di sesso maschile (Wasserman et al., 2005). In generale, la prevalenza del suicidio è maggiore negli uomini, con un rapporto di circa 3:1. Mentre si ha l'opposto per i tentativi suicidari, dove le donne tentano il suicidio da 2 a 3 volte più frequentemente rispetto agli uomini (Bertolote et al., 2009).

È stata descritta anche una variabilità nella frequenza del suicidio in base al variare delle stagioni; in particolare, si è osservato un notevole aumento di suicidi nei mesi primaverili e autunnali piuttosto che in quelli invernali (Haghighi et al., 2015).

Nei paesi dell'Europa settentrionale il tasso di suicidi è più elevato rispetto ai paesi dell'Europa meridionale. Ugualmente, in Asia è stato osservato che la frequenza di suicidi è maggiore nelle latitudini settentrionali. Queste evidenze suggeriscono un effetto latitudine sul suicidio, indicando che l'esposizione al sole e la durata del giorno svolgano un ruolo

fondamentale (Terao et al., 2002). Inoltre, esiste una chiara correlazione tra il comportamento suicidario e l'origine etnica: per esempio, in America del Nord la frequenza di suicidi è più bassa nelle popolazioni americane di origine ispanica o africana rispetto agli americani di origine europea che nel 2013 contavano il 70% di tutti i suicidi (American Foundation for Suicide Prevention, 2015). I nativi americani e dell'Alaska presentano invece il secondo tasso suicidario più elevato in America del Nord, forse a causa della loro marginalizzazione socio-culturale e del più alto consumo di alcol (AFSP, 2015).

I metodi scelti per commettere il suicidio variano in base alla nazione e sono legati a fattori culturali; per esempio, nelle nazioni occidentali è predominante il suicidio con arma da fuoco, mentre nelle nazioni asiatiche prevale l'avvelenamento da pesticidi (Wu et al., 2012). In generale, si stima che il 30% dei suicidi a livello globale sia causato dall'ingestione di pesticidi mentre l'impiccagione, che conta il 50% dei suicidi, rappresenta uno dei metodi più comuni (OMS, 2015).

Il suicidio è un problema complesso non ascrivibile a una sola causa, ma a una complessa interazione di fattori biologici, genetici, psicologici, sociali, culturali e ambientali. In generale, il suicidio è strettamente legato agli eventi stressanti e sconvolgenti della vita, fra cui le esperienze traumatiche infantili o discriminatorie, gli abusi, le perdite, la condizione socio-economica, che possono costituire un fattore scatenante per l'insorgenza di un comportamento suicidario. Anche l'abuso di alcol predispone fortemente all'atto suicidario, sia aggravando un disturbo mentale già presente sia attraverso la disinibizione e l'impulsività e l'alterazione della capacità di giudizio (Pompili et al., 2010).

Infatti, nella maggior parte dei casi l'alcol è assunto prima di commettere il suicidio sino a raggiungere uno stato di intossicazione, probabilmente per alleviare il senso di disagio provato durante l'atto (Pompili et al., 2010).

La complessità del suicidio è data proprio dalla molteplicità dei diversi fattori di rischio e spesso è la concomitanza di più fattori a dare luogo a un aumento del rischio suicidario (Bolton et al., 2015). La diagnosi psichiatrica, prima fra tutti, rappresenta un importante fattore di rischio strettamente correlato con il rischio suicidario (Bolton et al., 2015). Infatti, il suicidio è spesso l'espressione di uno specifico disturbo psicopatologico, mostra una forte associazione con i disordini mentali ed è considerato una delle più comuni cause di morte nelle malattie psichiatriche, in particolare nei disturbi dell'umore (Harris et al., 1997).

1.2 Il suicidio nel Disturbo Bipolare

Il suicidio e il comportamento suicidario, come l'ideazione suicidaria e il tentato suicidio, sono molto frequenti nel decorso dei disturbi dell'umore. Si stima che il 90% dei suicidi sia associato alla presenza di un disturbo mentale e il rischio di un gesto estremo è massimo tra le persone con disturbi dell'umore (Harris et al., 1997).

I disturbi dell'umore comprendono una varietà di condizioni psicopatologiche, il cui quadro clinico è caratterizzato da un'alterazione del tono dell'umore, ma anche da sintomi della sfera cognitiva, psicomotoria e neurovegetativa. I due principali sottotipi di disturbi dell'umore sono il disturbo unipolare, quali la depressione, e il disturbo bipolare (Kupfer et al., 2012).

Il Disturbo Bipolare (DB) si distingue da quello unipolare poiché il soggetto presenta non solo la polarità depressiva ma anche quella maniacale.

Il DB è una patologia cronica e severa, ed è una delle più comuni malattie psichiatriche maggiori che colpisce circa il 2% della popolazione generale (Merikangas et al., 2007).

Secondo il *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder V* (DSM-V, American Psychiatric Association, 2014) si distinguono diversi sottotipi diagnostici all'interno del DB, fra cui il DB di tipo 1 (DB1) e DB di tipo 2 (DB2). Il DB1 è caratterizzato dall'alternarsi di episodi di tipo maniacale, in cui si ha un tono dell'umore eccessivamente elevato ed euforico, e di episodi di tipo depressivo maggiore, in cui il tono dell'umore è depresso in modo intenso e persistente. Invece, nel DB2 si alternano episodi di tipo depressivo a episodi di ipomania. In questo caso, nella fase di ipomania si ha un lieve e moderato livello di mania in cui non si riscontrano manifestazioni psicotiche (DSM-V, 2014).

Il DB è considerato una delle principali cause di disabilità al mondo a causa della sua cronicità e del forte impatto sul funzionamento sociale e lavorativo del paziente (Grande et al., 2015). Il DB è una malattia potenzialmente fatale, associata a un alto rischio di mortalità prematura (Tondo et al., 2003; Crump et al., 2013). I pazienti bipolari presentano un elevato tasso di mortalità legata sia a cause naturali, come le comorbidità mediche e psichiatriche, sia a cause non naturali, come il suicidio, gli incidenti o l'uso di sostanze d'abuso (Roshanaei-Moghaddam et al., 2009). Fra le comorbidità mediche, le più diffuse sono le malattie metaboliche e cardiovascolari. Nei pazienti bipolari, il rischio di morte per patologie cardiovascolari è due volte superiore rispetto alla popolazione generale (Weiner et al., 2011). Inoltre, i pazienti bipolari presentano un'elevata incidenza di ipertensione, obesità e diabete (Roshanaei-Moghaddam et al., 2009).

Fra le cause definite non naturali, il suicidio rappresenta una delle principali cause di morte fra i pazienti con DB, per i quali si calcola un rischio di morte venti volte più elevato rispetto alla popolazione generale (Tondo et al., 2003). Si stima inoltre che il 25-50% dei pazienti con diagnosi di DB tenta il suicidio almeno una volta lungo il decorso della malattia, e l'8-19% completa il suicidio (Marangell et al., 2006). Si stima che la mortalità per suicidio nel corso della vita di pazienti bipolari seguiti per un periodo di 40 anni è dell'11%, mentre nei pazienti con diagnosi di depressione unipolare, la mortalità per suicidio varia dal 2,2 al 4% (Angst et al., 2002). Anche gli altri disturbi psichiatrici mostrano un tasso di suicidi maggiore rispetto alla popolazione generale. La mortalità è del 5% nei soggetti con schizofrenia (Hor e Taylor, 2010), mentre varia tra il 5% e il 10% in soggetti con disturbo di personalità borderline (Mann, 2002; Oldham, 2006) ed è del 18% negli alcolisti (Windfuhr e Kapur, 2011).

Nel DB, il suicidio spesso è più frequente agli esordi della malattia, quando ancora la diagnosi non è ben definita, e la terapia farmacologica può essere errata (Tondo et al., 2003). In particolare, si verifica quando i pazienti attraversano la fase di depressione severa o la fase mista della malattia, intesa come la concomitanza di mania e depressione, mentre non è frequente durante la fase maniacale e ancora più raro nella fase di ipomania (Goodwin et al., 1990; Jacobs et al., 2003; Baldessarini et al., 2006A).

È importante evidenziare che gli atti suicidari nel DB sono caratterizzati da un'alta letalità, e questo dato è suggerito dal basso rapporto tra suicidio tentato e completato (3:1) rispetto al rapporto nella popolazione generale (30:1) (Kessler et al., 2005; Baldessarini et al., 2006A). Oltretutto, il rischio di commettere il suicidio aumenta in relazione alla gravità della malattia, indipendentemente dal tipo di DB. Infatti, anche nel DB2 la fase depressiva può essere severa, persistente e debilitante, determinando un rischio suicidario pari a quello del DB1 (Arató et al., 1988; Isometsá et al., 1994).

Più in generale, il suicidio è associato a diversi fattori di rischio clinici e socio-demografici, fra cui l'etnia, l'essere single, l'abuso di alcol o di sostanze illecite, un'età precoce al momento del primo trattamento per disturbo dell'umore, una lunga durata di malattia, una maggiore gravità dei sintomi depressivi o maniacali (Baldessarini et al., 2006B; Bellivier et al., 2011). Un altro fattore di rischio rilevante per il suicidio è la presenza di una storia personale di tentativi suicidari, come mostrato nello studio di Marangell e coautori (2006). Nello specifico è stato dimostrato che i pazienti che hanno tentato in precedenza il suicidio hanno un rischio di tentarlo nuovamente o di completarlo quattro volte più alto rispetto ai pazienti con DB senza storia di suicidio. Ugualmente è importante la storia familiare per comportamento suicidario, come è stato descritto in un recente studio condotto su un

campione di 737 famiglie di pazienti con DB, in cui è stato mostrato che in presenza di familiarità per disturbi dell'umore e per comportamento suicidario si ha un aumento significativo del rischio di commettere il suicidio (Manchia et al., 2013). Infatti, i pazienti bipolari con una storia familiare positiva hanno una probabilità di tentare il suicidio di circa 40-50% superiore rispetto a soggetti senza una storia familiare di suicidio, la cui probabilità è invece del 14% (Roy, 1983).

Nonostante la presenza di un disturbo dell'umore rappresenti un fattore predisponente importante, è il verificarsi di un evento scatenante e la concomitanza di più fattori di rischio ad aumentare significativamente la probabilità del manifestarsi di un comportamento suicidario. Pertanto, lo studio dei fattori di rischio associati al suicidio è di fondamentale importanza per identificare i pazienti bipolari con un alto rischio suicidario, e può essere utile per sviluppare adeguati programmi di prevenzione.

1.3 Il litio nella prevenzione del suicidio nei disturbi dell'umore

Il litio è uno dei farmaci più utilizzati nella prevenzione del suicidio nei disturbi dell'umore. Mentre le evidenze sull'utilizzo di altre terapie farmacologiche nel suicidio, come antidepressivi o antipsicotici, sono inconcludenti e limitate, il litio rappresenta un'importante eccezione (Jacobs et al., 2003). Infatti, nonostante altri stabilizzanti dell'umore siano utilizzati nel trattamento sintomatico del DB, sorprendentemente il litio è l'unico composto sul quale, nel corso degli ultimi 20 anni, si siano accumulate evidenze cliniche sul suo possibile effetto antisuicidario (Müller-Oerlinghausen et al., 2005).

In generale, il litio rappresenta il farmaco di prima scelta per il trattamento a lungo termine del DB grazie alla sua efficacia nel ridurre di numero, intensità e durata le fasi acute della malattia (Severino et al., 2013). Oltre alla sua provata efficacia nella cura del DB, il litio mostra anche un importante effetto di prevenzione del suicidio e degli atti autolesivi in pazienti affetti da disturbi dell'umore (Cipriani et al., 2005).

Infatti, la terapia di mantenimento a lungo termine con il litio è fortemente associata a notevoli riduzioni del rischio suicidario in pazienti bipolari, e vi sono alcune evidenze che mostrano riduzioni del rischio suicidario anche in pazienti affetti da depressione maggiore ricorrente (Jacobs et al., 2003).

Una recente revisione della letteratura sull'effetto antisuicidario del litio ha messo a confronto più di 339 studi (Lewitzka et al., 2015) evidenziando la capacità del litio nel ridurre

significativamente la mortalità da suicidio nei pazienti trattati. È stato stimato che la terapia cronica con il litio sia associata ad una riduzione del rischio suicidario dell'80-90% e ad una riduzione dei tentativi suicidari del 90% (Jacobs et al., 2003). Anche se il tasso di suicidi nei pazienti bipolari in trattamento cronico è notevolmente maggiore rispetto alla popolazione generale, la terapia di mantenimento con il litio è associata a sostanziali e significative riduzioni del rischio suicidario rispetto a pazienti bipolari non in trattamento. Infatti, si calcola che i pazienti in terapia cronica con il litio hanno un rischio suicidario inferiore di almeno 8-14 volte rispetto ai pazienti non trattati (Müller-Oerlinghausen et al., 2005; Baldessarini et al., 2003). Inoltre, diversi studi mostrano che i pazienti in trattamento con il litio hanno un rischio suicidario ridotto, così come il rischio di mortalità dovuto ad altre cause, quando messi a confronto con pazienti sottoposti a terapia con placebo o con altri farmaci, p. es. valproato o carbamazepina (Lewitzka et al., 2015).

Un altro dato interessante è mostrato da diversi studi che hanno valutato la relazione tra la presenza di litio nell'acqua potabile e il tasso di suicidi nella popolazione generale. In una recente meta-analisi, condotta da Vita e coautori (2015), è stata riscontrata una significativa correlazione inversa tra la concentrazione di sali di litio nell'acqua potabile e il tasso di suicidi. Nonostante la quantità di litio misurata nell'acqua sia molto più bassa rispetto alle dosi terapeutiche (0,01 mg/l versus 0,6–1,0 mmol/l) e vari a seconda del paese di studio, il risultato mostrato è costante e suggerisce che vi sia una reale connessione tra suicidio e litio, anche a basse concentrazioni (Vita et al., 2015). Questo dato indica che anche la presenza di litio nell'acqua corrente potrebbe avere un ruolo nel ridurre il rischio suicidario nella popolazione generale e potrebbe dare un contributo alle eventuali strategie di prevenzione.

È certo, quindi, che il litio sia in grado di contenere il rischio suicidario nei disturbi dell'umore e sembra che questo effetto sia svolto diminuendo il numero di ricadute e la gravità degli stati depressivi ma anche attraverso altri meccanismi, come la diminuzione dell'aggressività e dell'impulsività (Cipriani et al., 2013). Studi condotti su animali e sull'uomo mostrano l'associazione tra l'utilizzo del litio e ridotti livelli di aggressività e impulsività, probabilmente causando in questo modo una riduzione del comportamento suicidario (Comai et al. 2012). Da un punto di vista neurobiologico, si pensa che il litio diminuisca l'aggressività e l'impulsività influenzando i principali sistemi neurotrasmettitoriali, come quello serotoninergico, dopaminergico e noradrenergico, e i meccanismi molecolari di secondi messaggeri, come la via degli inositoli e della glicogeno sintasi chinasi 3 (Lewitzka et al., 2015). Ugualmente, anche l'eccessiva attività dell'ormone di rilascio della corticotropina così come la disfunzione del sistema noradrenergico e serotoninergico potrebbero svolgere un

ruolo nel suicidio (Steiner et al., 2008; Erhardt et al., 2013). Il litio attraverso le sue proprietà potrebbe in qualche modo controbilanciare le disfunzioni dei sistemi biologici implicati nel suicidio (Lewitzka et al., 2015).

E' stato inoltre osservato come l'effetto antisuicidario del litio sia parzialmente disgiunto dalle proprietà di stabilizzazione dell'umore (Ahrens et al., 2001). Infatti, i pazienti in cui il litio ha un effetto antisuicidario non sono necessariamente *responder* all'effetto stabilizzante sull'umore. Questo dato dimostra che, seppure il suicidio sia altamente correlato con i disturbi dell'umore, la base biologica predisponente possa essere in parte differente così come il meccanismo attraverso cui il litio esplica la sua azione antisuicidaria e stabilizzante. Tali evidenze suggeriscono inoltre che, in presenza di elevato rischio suicidario (ad esempio determinato dalla presenza di una storia di pregressi tentativi suicidari), sia necessario valutare con attenzione l'utilizzo del litio anche in assenza di una risposta terapeutica adeguata e un parziale o scarso controllo degli episodi maniaco-depressivi.

La necessità di condurre ulteriori studi è di fondamentale importanza per comprendere meglio il meccanismo d'azione del litio e il suo effetto sulla prevenzione del suicidio.

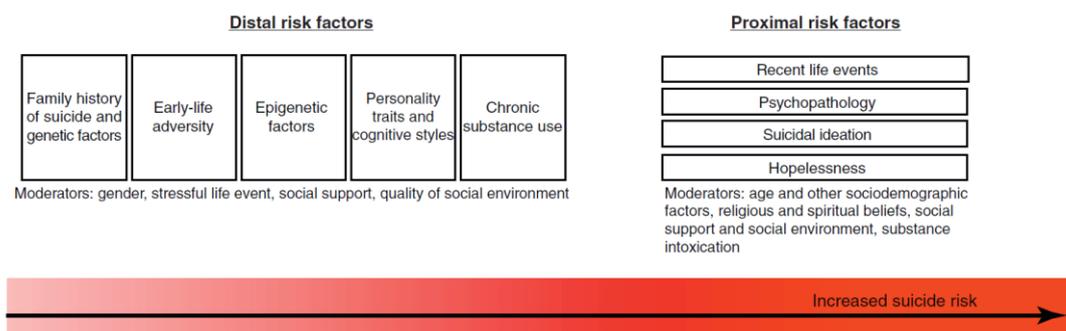
2 - Genetica, epigenetica e neurobiologia del suicidio

Il suicidio è un fenomeno complesso determinato dall'insieme di molteplici fattori che rappresentano l'interazione di più dimensioni dell'esistenza umana, quella spirituale, biologica, psicologica e sociale.

La valutazione del valore predittivo dei fattori di rischio è particolarmente difficile a causa della variabilità che caratterizza la storia di ogni singolo individuo.

I fattori di rischio suicidario possono essere distinti in distali (predisponenti) e prossimali (potenzianti). Fra i fattori di rischio distali troviamo la predisposizione genetica, la storia familiare di comportamento suicidario, e le modificazioni epigenetiche legate agli avvenimenti avversi in età evolutiva (figura 1). In generale, i fattori distali determinano un effetto a lungo termine sulla regolazione e sull'espressione genica, non agiscono direttamente sul suicidio ma sono strettamente legati a un aumento del rischio suicidario attraverso l'azione mediata dai fattori prossimali. Infatti, si può dire che i fattori distali rappresentano la base su cui i fattori prossimali agiscono come fattori precipitanti. I fattori di rischio prossimali sono spesso innescati dagli eventi della vita e comprendono tutte quelle condizioni che agiscono da fattori scatenanti, fra cui la presenza di malattie psichiatriche e/o fisiche, abuso di sostanze, eventi che causano stress acuto (Turecki et al., 2012; Turecki, 2014).

Figura 1 – Rappresentazione schematica dei fattori di rischio (Turecki et al., 2012)



Proprio per la complessità che caratterizza il suicidio, nessun fattore di rischio è in grado di predire con certezza se un individuo commetterà il suicidio, ma studiare e ampliare le conoscenze sui diversi fattori di rischio è di fondamentale importanza per predire il rischio suicidario di un individuo.

Gli studi condotti su famiglie, su coppie di gemelli e studi di adozioni, indicano che vi è una forte componente genetica alla base del suicidio e del comportamento suicidario. Gli studi

post-mortem su vittime di suicidio mostrano inoltre significative alterazioni dei principali sistemi neurobiologici così come importanti modificazioni epigenetiche a carico del genoma umano dovute all'interazione tra gene e ambiente. Per questo motivo c'è un interesse sempre più crescente nell'identificare i potenziali correlati neurobiologici e i marker molecolari associati alla vulnerabilità al suicidio.

2.1 Il sistema serotonergico

In letteratura sono diversi gli studi che suggeriscono il possibile ruolo del sistema serotonergico nel suicidio. L'idea di un suo coinvolgimento nasce dalle numerose alterazioni riportate in varie aree cerebrali di soggetti suicidi, fra cui la corteccia prefrontale, l'ipotalamo e il tronco encefalico (Bondy et al., 2006). Diversi autori hanno evidenziato una riduzione nella trasmissione serotonergica in regioni corticali e sub-corticali di pazienti affetti da disturbi dell'umore e deceduti per suicidio. Arango e coautori (2001) hanno riportato una riduzione nel numero di neuroni che esprimono il trasportatore della serotonina (SERT) nel nucleo dorsale del rafe di soggetti che avevano completato il suicidio confrontati con un gruppo di soggetti deceduti per altre cause. Cheetham e coautori (1990) hanno invece riportato una riduzione nel numero ed affinità dei siti di *binding* dei recettori 5-HT₁ nell'ippocampo e nell'amigdala di pazienti che avevano completato il suicidio. E' stata inoltre riportata un'*upregulation* dei recettori post-sinaptici 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} nella corteccia prefrontale ventrale e in periferia, probabilmente come effetto compensatorio della ridotta attività dei neuroni serotonergici (Stanley et al., 1983).

Inoltre è stata evidenziata una riduzione dei livelli dell'acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA), principale metabolita della serotonina, nel liquido cerebrospinale di suicidi, e questa diminuzione sembra correlare con la letalità del suicidio (Asberg et al., 1976).

Queste evidenze hanno spinto gli studi di genetica molecolare a focalizzare l'attenzione sul sistema serotonergico dal punto di vista genetico e individuare possibili marker molecolari. A riguardo, è stata identificata una correlazione tra suicidio tentato/completato e i polimorfismi dei geni codificanti per la triptofano idrossilasi 1 (TPH1) e la triptofano idrossilasi 2 (TPH2), isoforme dell'enzima *rate-limiting* del metabolismo della serotonina (Galfalvy et al., 2009; Lopez et al., 2007). Inoltre, si pensa che l'allele *short* (S), localizzato nella regione promotrice del gene che codifica per il SERT e responsabile di una riduzione della sua espressione, sia associato al comportamento suicidario e in particolare al suicidio

tentato o completato in modo violento (Gonda et al., 2011). Anche il polimorfismo T102C del gene HTR-2A è associato all'ideazione suicidaria nei pazienti con depressione maggiore e sembra aumentare il rischio di comportamento suicidario (Pandey, 2011), mentre ci sono dati contrastanti per il polimorfismo A1438G dello stesso gene (Bondy et al., 2000). Recentemente, Abdolmaleky e coautori (2011) hanno riportato un'associazione tra la disregolazione di HTR-2A e l'ipermetilazione a carico del promotore del gene, nella corteccia frontale di 105 vittime di suicidio con disturbi psicotici. Questo dato suggerisce che la metilazione genica a carico del promotore di HTR-2A non solo causi una riduzione dell'espressione del gene ma che provochi uno scompenso a catena del sistema serotoninergico e di altri geni candidati del suicidio (Bani-Fatemi et al., 2014).

2.2 Altri neurotrasmettitori

Diversi studi riportano alterazioni del sistema GABAergico in soggetti che hanno commesso il suicidio. Recentemente, è stata riportata una riduzione della densità dei neuroni GABA nell'ippocampo e in diverse regioni neocorticali in soggetti affetti da disturbi dell'umore che avevano completato il suicidio (Bielau et al., 2007). Altri autori hanno inoltre valutato il coinvolgimento dei recettori GABA_A e GABA_B nel suicidio utilizzando tecniche di *binding*. Tuttavia, i risultati finora pubblicati sono contrastanti (Manchon et al., 1987; Stock et al., 1990; Zhu et al., 2006).

Per quanto riguarda il sistema dopaminergico, si è ipotizzato che la trasmissione dopaminergica mesolimbica possa essere ridotta nei soggetti depressi e in oggetti che hanno completato il suicidio (Bowden et al., 1997). Tuttavia, la misurazione delle concentrazioni di dopamina nelle aree corticali e subcorticali di pazienti suicidi e controlli non ha evidenziato differenze significative (Allard and Norlen, 2001).

I sistemi noradrenergico e adrenergico sono stati ampiamente studiati nel suicidio. I neuroni che sintetizzano la noradrenalina sono localizzati nel locus coeruleus (LC) e proiettano in tutte le regioni del cervello. L'idea del coinvolgimento del sistema noradrenergico nel suicidio nasce dalla constatazione della presenza di alterazioni neurochimiche presenti nel LC di soggetti che completano il suicidio (Merali et al., 2006). È stata riportata una riduzione dei livelli di noradrenalina nel tronco encefalico e un corrispettivo aumento del recettore α_2 adrenergico, probabilmente per compensare il deficit noradrenergico (Bondy et al., 2006). Per

quanto riguarda l'adrenalina, Escriba e coautori (2004) hanno riportato un'alterazione nel numero di recettori adrenergici α_2 nel cervello di pazienti depressi deceduti per suicidio.

2.3 I fattori neurotrofici

I fattori neurotrofici appartengono a una famiglia di molecole segnale che promuovono la proliferazione, la sopravvivenza e la plasticità neuronale (Costanza et al., 2014).

Proprio per il loro ruolo a livello cerebrale, si pensa che l'alterazione della plasticità cerebrale riscontrata nei soggetti che hanno completato il suicidio sia strettamente associata ai fattori neurotrofici (Turecki et al., 2012).

Il *Fibroblast Growth Factor* (FGF) è una molecola coinvolta nello sviluppo cellulare e di diversi organi, incluso il cervello. Evans e coautori (2004) hanno riportato una *downregulation* di due recettori per il FGF (FGFR2 e FGFR3) nella corteccia prefrontale dorsolaterale e nella corteccia cingolata anteriore in soggetti affetti da disturbi dell'umore che hanno completato il suicidio in confronto a soggetti deceduti per altre cause.

Diversi studi, condotti sia *post-mortem* sia su modelli animali, suggeriscono che la riduzione dell'attività del sistema costituito dal *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e dal suo recettore *Tyrosine Kinase Receptor* (TRKB) possa essere coinvolta nel suicidio e nella depressione (Nibuya et al., 1995; Dwivedi et al., 2003; Pandey et al., 2008).

Studi di epigenetica hanno evidenziato un'ipermetilazione a livello del promotore del gene BDNF (Keller et al., 2010). Mentre nella corteccia fronto-orbitale di 20 soggetti suicidi, è stata riscontrata una riduzione di espressione del gene *TrkB.T1* associata a un aumento della metilazione a carico del residuo di lisina dell'istone 3 (H3K27; Ernst et al., 2009).

2.4 L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) rappresenta il sistema biologico maggiormente coinvolto nella risposta allo stress. Le interconnessioni fra le strutture coinvolte sono mediate dall'ormone di rilascio della corticotropina (CRH), l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e il cortisolo. L'iperattività o l'inibizione dell'attività di questi ormoni è stata testata in diversi studi condotti su depressione e suicidio.

Il desametasone è un ormone glucocorticoide sintetico esogeno che determina un feedback negativo sull'asse HPA, inibendo il rilascio di ACTH dall'ipotalamo e conseguentemente il

rilascio di cortisolo dalla ghiandola surrenale. E' stato dimostrato che in soggetti con comportamento suicidario la somministrazione di desametasone non determina un'inibizione significativa del rilascio di cortisolo (Currier and Mann, 2008; Westrin, 2000). L'iperattività del cortisolo dopo somministrazione di desametasone in soggetti con comportamento suicidario può essere interpretata come un'eccessiva attività dell'asse HPA che rilascia troppo cortisolo determinando effetti negativi sul sistema nervoso centrale e sulla risposta a eventi stressogeni. Studi *post-mortem* hanno mostrato anche un'iperattività dell'ormone CRH nell'ipotalamo di soggetti depressi e di suicidi e un aumento dei livelli di RNA messaggero (mRNA; Turecki et al., 2012).

Un altro dato interessante è mostrato dagli studi di epigenetica che evidenziano come lo stress in età evolutiva influenza l'espressione dei geni del sistema di risposta allo stress tramite meccanismo epigenetico. Infatti, è stata determinata la metilazione del promotore del gene che codifica per il recettore dei glucocorticoidi (NR3C1) solo nei pazienti suicidi con storia di abusi infantili e non in quelli senza storia di abusi (McGowan et al., 2009). La metilazione del gene NR3C1 causa una riduzione dell'espressione genica, determinando l'iperattività dell'asse HPA che a sua volta non risponde al feedback negativo esercitato dai glucocorticoidi (Costanza et al., 2014).

2.5 Le poliamine

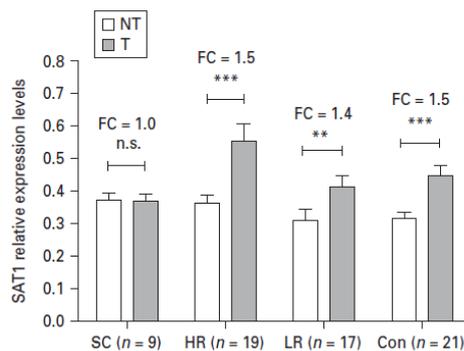
Le poliamine (PA; putrescina, spermina, spermidina e agmatina) sono piccole molecole ubiquitarie, implicate in diversi aspetti delle funzioni cellulari, fra cui la modulazione del ciclo cellulare, la regolazione dell'espressione genica e la neurotrasmissione (Gilad, 2002).

A livello centrale, le PA sono responsabili del meccanismo di risposta cellulare allo stress (*Polyamine Stress Response*, PSR) che media la risposta fisiologica agli stimoli stressanti necessaria per ristabilire l'equilibrio omeostatico dell'organismo (Gilad, 2002). Diverse evidenze hanno riportato che anomalie del sistema delle PA possano svolgere un ruolo nella fisiopatologia dei disturbi psichiatrici e del suicidio (Fiori et al., 2008). Infatti, sono diversi gli studi che mostrano alterazioni dei livelli genici o proteici di alcuni componenti del sistema delle PA nelle regioni corticali e subcorticali di pazienti suicidi (Turecki et al., 2014). In particolare, la spermidina/spermina N1-acetiltransferasi (SAT1), enzima *rate-limiting* del catabolismo delle PA, sembra essere coinvolto nel suicidio. Numerosi studi *post-mortem* hanno evidenziato una riduzione dell'espressione genica di SAT1 in diverse aree cerebrali

(amigdala, ippocampo, corteccia cingolata anteriore e posteriore) di soggetti che hanno completato il suicidio, con e senza diagnosi di depressione (Sequeira et al., 2006; Guipponi et al., 2008; Klempan et al., 2009). Successivi studi, condotti sulle stesse aree cerebrali di pazienti suicidi, hanno riportato un'associazione tra la ridotta espressione di SAT1 e la presenza di mutazioni geniche (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) nella regione promotrice del gene, suggerendo che gli SNP presenti possano influenzarne l'espressione (Fiori et al., 2009).

Inoltre è stato dimostrato che il litio in cronico è in grado di bloccare la risposta allo stress mediata dalle PA attraverso l'inibizione enzimatica di SAT1 (Gilad, 2002). Per testare l'effetto del litio sull'espressione di SAT1, il nostro gruppo ha condotto uno studio di espressione genica usando linfoblasti derivati da pazienti bipolari morti per suicidio, da due gruppi di pazienti bipolari con alto e basso rischio suicidario, e da un gruppo di controlli sani (Squassina et al., 2013). I risultati hanno mostrato che i livelli basali di mRNA erano simili nei quattro gruppi di soggetti; tuttavia, il trattamento con litio non ha avuto effetto nelle linee cellulari dei pazienti deceduti per suicidio, mentre ha determinato un aumento significativo dell'espressione di SAT1 nei gruppi ad alto e basso rischio e nei controlli (figura 2), suggerendo che la trascrizione di SAT1 sia influenzata dal litio e che questo effetto sia alterato in pazienti bipolari deceduti per suicidio.

Figura 2 – Livelli di espressione di SAT1



Squassina et al., 2013 - Livelli di espressione (FC: fold change) di SAT1 in linfoblasti, non trattati (NT) e trattati (T) con litio, di bipolari suddivisi per rischio suicidario (SC: suicidio completato, HR: alto rischio, LR: basso rischio), e dei controlli (Con).

In un altro studio condotto dal nostro gruppo, è stato valutato se il diverso effetto del litio sull'espressione di SAT1 nei diversi gruppi fosse dovuto a mutazioni geniche a carico della regione promotrice del gene, ma i dati non hanno mostrato una correlazione significativa (Niola et al., 2014).

Anche i meccanismi epigenetici sembrano regolare la regolazione del gene SAT1. Infatti, è stato riportato che la metilazione a carico del promotore del gene SAT1 sia negativamente correlata con la ridotta espressione di SAT1 nella corteccia frontale di vittime di suicidio (Fiori et al., 2011).

Uguualmente anche i microRNA (miRNA), che regolano negativamente la trascrizione genica, sembrano influenzare l'espressione di SAT1. Lopez e coautori (2014A) hanno trovato una significativa *upregulation* del miR-34c-5p che correla negativamente con l'espressione di SAT1 nel cervello di soggetti che hanno completato il suicidio.

2.6 *J* **microRNA**

Le modificazioni epigenetiche permettono al genoma umano di rispondere e adattarsi agli stimoli ambientali e rappresentano una conseguenza dell'interazione gene-ambiente.

Tra i meccanismi epigenetici più studiati nel suicidio e nel comportamento suicidario, troviamo le modificazioni a carico del DNA e le modificazioni istoniche che, come mostrato dalla letteratura, sono spesso coinvolte nelle alterazioni dei sistemi neurobiologici implicati nel suicidio. Ultimamente, vi è un interesse sempre più crescente nell'esplorare il ruolo di altri meccanismi epigenetici che possono essere associati al comportamento suicidario e al suicidio, fra cui i microRNA (miRNA).

I miRNA appartengono alla classe dei *non-coding* RNA (ncRNA), piccole molecole di RNA in grado di regolare la produzione di mRNA. I miRNA rappresentano un meccanismo epigenetico poiché regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso l'inibizione della traduzione proteica o attraverso la degradazione di mRNA.

Le prime evidenze sull'esistenza dei miRNA risalgono alla scoperta del ruolo di due geni, *lin-4* e *lin-14*, importanti per la regolazione dello sviluppo larvale del nematode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Inizialmente, Lee e coautori (1993) scoprirono che il gene *lin-4* non codificava per una proteina bensì per un piccolo trascritto di soli 22 nucleotidi. In seguito, notarono che la regolazione del gene *lin-14* era regolata a livello post-trascrizionale e la sua espressione era inversamente proporzionale ai livelli di *lin-4*. Inoltre, la sequenza di *lin-4* era complementare alla regione 3' UTR (*3'-untranslated region*) del gene *lin-14*.

Lin-4 e *lin-14* rappresentano il primo esempio di interazione tra miRNA e mRNA bersaglio (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Successivamente, i miRNA sono stati individuati in numerose specie animali e vegetali, mostrando, in molti casi, una conservazione dei pattern di espressione e riconoscimento di sequenze di mRNA bersaglio attraverso le diverse linee

evolutive, suggerendo la loro importanza per il mantenimento della normale fisiologia (O'Connor et al., 2012).

Solo nel 2001 il termine “miRNA” è stato coniato (Ruvkun et al., 2001) ed è stata stabilita una precisa nomenclatura che contiene un prefisso in lettere e un suffisso numerico: il prefisso indica la specie, p. es. *hsa* sta per *Homo sapiens*, *mmu* sta per *Mus musculus*, e così via; il suffisso numerico indica uno specifico miRNA, p. es. *hsa-miR-142*, talvolta accompagnato da una lettera oppure un numero (Griffiths-Jones, 2004). La lettera è usata per differenziare i miRNA appartenenti alla stessa famiglia che presentano una o due basi diverse nella sequenza matura, p. es. *miR-181a* e *miR-181b*. Mentre il numero supplementare posto dopo il nome completo, come nel caso di *miR-6-1* e *miR-6-2*, indica che i miRNA hanno sequenza matura identica ma originano da loci genomici diversi (Griffiths-Jones, 2004). Infine, il *tag -3p* o *-5p* che talvolta accompagna il nome del miRNA, p. es. *miR-142-3p* e *miR-142-5p*, indica da quale estremità 5' o 3' del trascritto primario il miRNA deriva (Griffiths-Jones, 2004).

Numerosi dati sperimentali dimostrano che i miRNA agiscono in numerosi processi cellulari, fra cui la proliferazione, apoptosi e differenziamento, e in molti processi fisiologici come metabolismo, cardiogenesi, sviluppo e funzione del sistema nervoso e immunitario. Pertanto, una disregolazione del sistema dei miRNA può influire sull'insorgenza di diverse malattie, tra cui i disturbi neuropsichiatrici, le patologie neoplastiche e cardiovascolari (Finnegan e Pasquinelli, 2013).

2.6.1 Biogenesi e meccanismo d'azione

I miRNA maturi sono piccole molecole endogene di ncRNA a singolo filamento della lunghezza di 18-22 nucleotidi. La biogenesi dei miRNA ha inizio nel nucleo cellulare, dove il precursore molecolare del miRNA è trascritto (*primary* miRNA, *pri-miRNA*). Il *pri-miRNA* è codificato da geni localizzati o in regioni intergeniche del genoma o in introni di geni che codificano proteine o in introni/esoni di geni non codificanti. Nella maggior parte dei casi, la trascrizione del *pri-miRNA* è sotto il controllo degli stessi elementi regolatori del gene in cui risiede, condividendo un profilo di espressione simile (O'Connor et al., 2012).

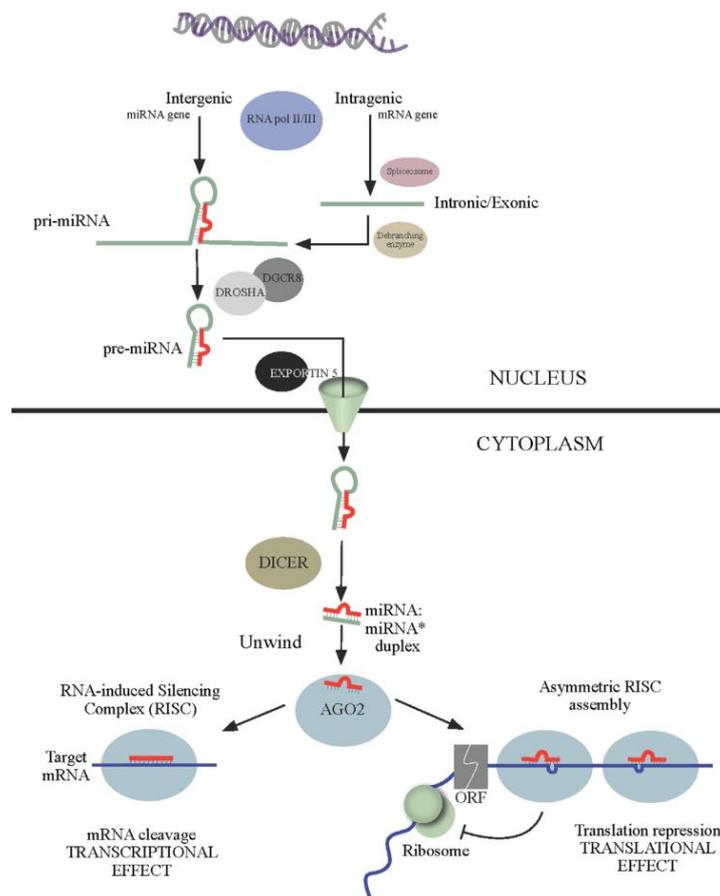
L'RNA polimerasi II è l'enzima che produce il trascritto primario, *pri-miRNA*, il quale si ripiega su se stesso a formare una struttura a forcina grazie alla presenza di sequenze complementari imperfette (figura 3). Il *pri-miRNA* è processato da un complesso enzimatico costituito da Drosha, un'endonucleasi appartenente alla famiglia delle RNAsi di tipo III, e DGCR8, una proteina che lega l'RNA a doppio filamento (Rooij, 2011). Il complesso Drosha-DGCR8 produce una sequenza a forcina della lunghezza di 70-80 nucleotidi, denominata

precursor-miRNA (pre-miRNA). Successivamente, il pre-miRNA viene esportato dal nucleo verso il citoplasma, grazie a un complesso Esportina5-Ran GTP (Yi et al., 2003). La proteina Ran (*ras-related nuclear protein*) è una piccola *GTP binding protein* appartenente alla superfamiglia delle RAS, proteine essenziali per la traslocazione dell'RNA e delle proteine verso il citoplasma attraverso i pori nucleari. Una volta nel citoplasma, l'enzima Dicer, RNasi di tipo III, riconosce e taglia gli estremi della forcina per formare un miRNA a doppio filamento della lunghezza di circa 22 nucleotidi, contenente sia il miRNA maturo che il suo complementare imperfetto (O'Connor et al., 2012). In base al tipo di *splicing* che il pre-miRNA subisce, si possono ottenere diversi tipi di miRNA maturi. Infatti, è noto che da un solo pri-miRNA possono originare tanti differenti miRNA maturi (Rooij, 2011).

Il miRNA a doppio filamento è inizialmente incorporato nel *RNA-induced silencing complex* (RISC), complesso ribonucleoproteico contenente al suo interno la proteina Argonata (Ago). La proteina Ago rappresenta il centro catalitico del complesso RISC, ed è responsabile del riconoscimento del miRNA maturo e ha un'attività endonucleasica diretta verso l'mRNA complementare al frammento di miRNA maturo incorporato nel RISC (Rooij, 2011). Il filamento destinato a diventare il miRNA maturo è selezionato dalla proteina Ago in base alla stabilità del filamento all'estremità 5', ovvero il miRNA con una minore stabilità nelle ultime 2-4 paia di basi in 5' è destinato a diventare il miRNA attivo. Mentre il filamento rimanente, denominato miRNA*, è rapidamente degradato dallo stesso RISC (O'Connor et al., 2010). In seguito all'incorporazione nel complesso RISC, il miRNA è in grado di esercitare il suo ruolo regolatorio attraverso il legame non perfettamente complementare tra la regione 3' UTR di un mRNA bersaglio, definita come *miRNA response elements* (MRE), e la sequenza *seed* in 5' di 2-8 nucleotidi del miRNA. Il grado di complementarità fra miRNA e mRNA determina la via attraverso cui l'mRNA viene inibito: una complementarità perfetta induce la degradazione AGO-mediata dell'mRNA bersaglio, mentre un appaiamento imperfetto determina una repressione reversibile della traduzione dell'mRNA, processo che può consentire l'immagazzinamento dell'mRNA all'interno della cellula al fine di una traduzione in un momento successivo (figura 3). In questo modo, un singolo miRNA può avere effetti diversi su differenti mRNA target a seconda della loro sequenza (O'Connor et al., 2012). Inoltre, il miRNA ha un ruolo nella regolazione del processamento del trascritto primario (pre-mRNA), nella regolazione della struttura dell'mRNA, e nel controllo delle interazioni tra mRNA e proteine. Poiché la funzione dei miRNA può essere regolata a diversi livelli attraverso proteine accessorie per garantire l'omeostasi dei miRNA e poiché lievi variazioni dei livelli di miRNA possono alterare la regolazione di molti geni bersaglio, il controllo della

biogenesi dei miRNA è essenziale per il mantenimento della normale biologia cellulare (Miller e Wahlestedt, 2010). Un'altra importante caratteristica dei miRNA, che potenzia la loro funzione di regolatori della trascrizione, è data dal fatto che un solo sito di legame in 3' UTR di un mRNA bersaglio può essere regolato da molteplici miRNA e allo stesso tempo, un solo miRNA è in grado di legare molteplici siti di legame in 3' UTR di diversi mRNA bersaglio. Infatti, è stato stimato che un miRNA può regolare l'espressione genica di centinaia di mRNA (O'Connor et al., 2012). Questo complesso meccanismo di regolazione genica mediato dai miRNA li rende bersagli farmacologici particolarmente interessanti, in quanto ogni miRNA può influenzare intere reti di geni e questo potrebbe essere efficace specialmente nel trattamento di patologie complesse, multigeniche e multifattoriali, come i disturbi psichiatrici, in cui piccole modifiche ai vari componenti di un particolare sistema possono risultare cruciali (O'Connor et al., 2012).

Figura 3 – Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNA



Moreno-Moya et al., 2014 – Rappresentazione grafica della biogenesi e del meccanismo d'azione dei miRNA. ORF=Open Reading Frame, ossia tratto del mRNA codificante.

2.6.2 Il ruolo dei microRNA nelle malattie psichiatriche

I miRNA sono presenti in tutti i tessuti dell'organismo e molti sono espressi in modo tessuto-specifico, contribuendo al profilo di espressione tipico di una cellula (Maffioletti et al., 2014). Gli studi funzionali mostrano la partecipazione dei miRNA nella regolazione di quasi tutti i processi cellulari, fra cui il loro coinvolgimento nei meccanismi che sono alla base della plasticità e dello sviluppo cerebrale, pertanto non è sorprendente se cambiamenti nella loro funzione o nel loro pattern di espressione siano associati alla patogenesi di diverse patologie psichiatriche, fra cui il DB (Forstner et al., 2015).

Nel corso degli ultimi anni sono sempre più crescenti le evidenze che supportano il ruolo chiave dei miRNA nel sistema nervoso centrale (SNC). È stato riportato che quasi il 50% dei miRNA identificati sia espresso nel cervello umano e che abbia un ruolo nella regolazione della sinaptogenesi e dei processi neuronali (Ziats et al., 2013).

I primi studi condotti su animali hanno dimostrato che l'enzima Dicer, coinvolto nella generazione dei miRNA, è essenziale per un normale sviluppo di numerosi tessuti tra cui quello cerebrale: in particolare, l'iniezione di miR-430 previene le alterazioni cerebrali che si sarebbero verificate in caso di mancata espressione dell'enzima, dimostrando che i miRNA hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo neuronale (Giraldez et al., 2005). Oltre ad essere essenziali per lo sviluppo cerebrale, l'espressione dell'enzima Dicer in neuroni post-mitotici suggerisce che i miRNA siano necessari anche per il fisiologico mantenimento del fenotipo neuronale (Barbato et al., 2007). Infine, la mancata espressione di Dicer porta alla morte cellulare, dimostrando come i miRNA siano costantemente essenziali per la sopravvivenza cellulare (Schaefer et al., 2007). Questi dati sottolineano il ruolo fondamentale dei miRNA nel corso dei processi di differenziazione e sopravvivenza neuronale (O'Connor et al., 2012).

Altri studi hanno invece mostrato l'importanza del ruolo dei miRNA nella plasticità sinaptica. Per esempio, il miR-134 sembra avere un ruolo fondamentale nella regolazione della traduzione proteica a livello delle spine dendritiche (Miller e Wahlestedt, 2010). In condizioni statiche, il miR-134 si lega e inibisce la traduzione di LIMK1, un regolatore della morfogenesi sinaptica; il segnale mediato dal BDNF, coinvolto nella plasticità sinaptica, rapidamente inibisce l'effetto di miR-134, con un'azione positiva sulla traduzione di LIMK1 in proteina (Schratt et al., 2006). Nel complesso, questi studi mostrano che i miRNA hanno un ruolo cruciale per il corretto funzionamento cerebrale non solo durante lo sviluppo ma anche nel corso della vita adulta (p. es. la plasticità cerebrale), suggerendo il loro coinvolgimento nelle malattie psichiatriche come mostrato dall'analisi della letteratura esistente.

Studi *post-mortem* mostrano un aumento dell'espressione dei miRNA e un aumento di espressione dell'enzima Dicer misurati nella corteccia prefrontale dorsolaterale di pazienti schizofrenici (Santarelli et al., 2011). In generale, gli studi condotti su tessuto cerebrale umano mostrano una riduzione complessiva dell'espressione dei miRNA nella corteccia prefrontale sia di pazienti bipolari (Kim et al., 2010; Moreau et al., 2011) sia di pazienti schizofrenici (Perkins et al., 2005; Miller et al., 2012). Ugualmente è stata osservata una riduzione complessiva dei livelli di miRNA misurati nella corteccia prefrontale di pazienti depressi che hanno completato il suicidio confrontati con un gruppo di controlli morti per altre cause (Smalheiser et al., 2012).

Recentemente, uno studio condotto su tessuto cerebrale di pazienti affetti da disturbi dell'umore deceduti per suicidio, ha evidenziato come la regolazione del gene SAT1 sia influenzata dai miRNA (Lopez et al., 2014A). Uno studio condotto dallo stesso gruppo (Lopez et al., 2014B) ha mostrato una riduzione dei livelli di miR-1202 nella corteccia prefrontale di pazienti depressi suicidi. La stessa riduzione di espressione è stata osservata nel sangue, anche se il miR-1202 risulta maggiormente espresso a livello centrale. Inoltre, Lopez e coautori hanno testato i livelli dei mRNA bersaglio di miR-1202, identificando delle alterazioni nei valori di 5 geni. In particolare, i livelli di espressione del gene GRM4, che codifica per il recettore glutammatergico, sono negativamente correlati con la bassa espressione di miR-1202 a livello centrale. Questo dato suggerisce che il miR-1202 è probabilmente coinvolto nella regolazione dei sistemi neurotrasmettitoriali associati alla depressione e al suicidio (Lopez et al., 2014B).

Altre evidenze interessanti sono date dagli studi di associazione *genome-wide* (GWAS) in cui si è mostrato un coinvolgimento delle varianti geniche (SNP) presenti nelle sequenze di miRNA nelle malattie psichiatriche (Maffioletti et al., 2014).

Un dato molto interessante è mostrato da un GWAS condotto su un gruppo di 24025 pazienti bipolari e controlli, dove uno SNP localizzato nella regione intergenica più vicina al gene codificante per il miR-2113 sul cromosoma 6q16.1 è risultato tra i più significativi (Muhleisen et al., 2014). Di recente è stata condotta un'analisi di GWAS su uno dei più grandi *data set* di 9747 bipolari confrontati con 14278 controlli per valutare se le comuni varianti genetiche dei miRNA noti contribuiscono allo sviluppo del DB (Forstner et al., 2015). I risultati hanno mostrato che 96 miRNA su 609 analizzati hanno un p-value nominale significativo e dopo correzione per test multipli, solo 9 miRNA risultano significativamente associati al DB. In particolare tre miRNA, miR-499, miR-708 e miR-1908, sono i più promettenti in termini di miRNA candidati per lo sviluppo del DB. Inoltre, è stata eseguita

un'analisi di *pathway* che ha mostrato un coinvolgimento dei miRNA identificati e i loro target nello sviluppo cerebrale e nella proiezione neuronale (Forstner et al., 2015).

Oltre alla presenza nelle cellule a livello centrale e periferico, i miRNA sono stati identificati anche nei liquidi biologici, fra cui il sangue, il liquido cerebrospinale, saliva, e così via, (Cogswell et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Park et al., 2009; Hanke et al., 2010; Zubakov et al., 2010). La presenza dei miRNA nei liquidi biologici indica che sono resistenti alla digestione da parte delle nucleasi, quindi i miRNA circolanti, oltre ad essere preservati, sono quantificabili e questo supporta il loro potenziale ruolo di marker biologici non invasivi e utili per identificare la presenza di varie patologie (Maffioletti et al., 2014).

Rong e coautori (2011), nell'intento di individuare potenziali biomarker periferici per il DB, hanno valutato i livelli plasmatici di miR-134 in 21 pazienti in episodio maniacale non trattato farmacologicamente. I livelli plasmatici di miR-134 sono risultati significativamente inferiori rispetto ai controlli, e tali livelli sono aumentati a 2 e 4 settimane in seguito all'assunzione di antipsicotici e/o stabilizzanti dell'umore, in maniera direttamente proporzionale con il miglioramento clinico. Chen e coautori (2009) hanno valutato il pattern di espressione di 13 miRNA in 20 linee cellulari linfoblastoidi (LCL) provenienti da pazienti DBI e suddivise in due linee: trattate e non trattate in vitro con litio. Da questo studio è emersa una variazione dell'espressione di diversi miRNA, tra cui miR-34a, miR-152, miR-155 e miR-221, in seguito all'esposizione al litio. Diversi studi hanno invece riportato l'influenza di altri stabilizzanti dell'umore e di farmaci psicoattivi sul sistema dei miRNA inducendo delle importanti modificazioni nella loro espressione (Maffioletti et al., 2014).

Negli ultimi anni, le evidenze scientifiche hanno ampiamente mostrato il ruolo dei miRNA nei molteplici e diversi network biologici, spingendo la ricerca futura ad ampliare le conoscenze sul potenziale coinvolgimento dei miRNA nella patogenesi e nella farmacoterapia dei disordini psichiatrici.

2.6.3 Metodi di studio dei microRNA

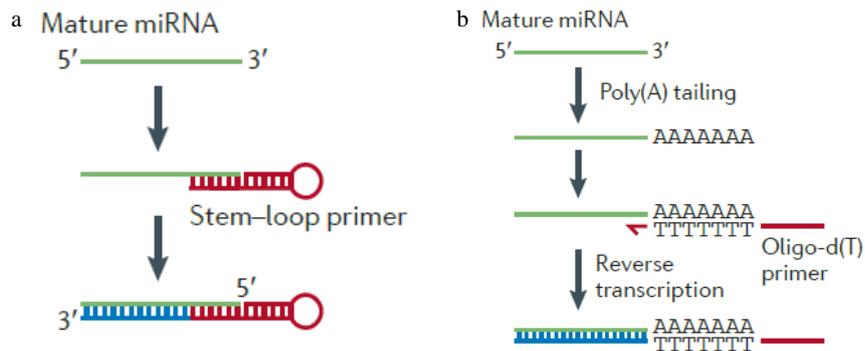
La ricerca degli ultimi anni è stata di fondamentale importanza nel delineare il profilo di espressione dei miRNA, aiutando a comprendere meglio il loro meccanismo d'azione e la loro funzione all'interno di una vasta varietà di processi biologici implicati nelle varie patologie, fra cui il DB e il suicidio.

Le caratteristiche dei miRNA rappresentano una sfida per la maggior parte delle metodiche utilizzate per l'identificazione e quantificazione di queste molecole. Per esempio, i 22 nucleotidi di lunghezza dei miRNA maturi non sono sufficienti per permettere l'appaiamento

con i tradizionali primer disegnati per la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o per la retrotrascrizione. Oppure, la coda di poli(A), tipica dell'mRNA ma mancante nei miRNA, può essere utilizzata come sito di legame selettivo per i primer (Pritchard et al., 2012). Al momento, fra le varie tecniche di studio per identificare e studiare queste molecole troviamo la qRT-PCR (*quantitative Real-Time PCR*), il RNA-sequencing, il microRNA microarrays e il Nanostring nCounter.

La qRT-PCR rappresenta uno dei metodi più accurati e affidabili per la quantificazione dei miRNA. La qRT-PCR richiede uno step di retrotrascrizione del miRNA di interesse in cDNA, riducendo il rischio di rilevare DNA genomico e aumentando l'efficienza e la sensibilità. Per generare il cDNA, nella reazione di retrotrascrizione si utilizza o un primer che forma una struttura a forcina durante il legame con il miRNA specifico, oppure si aggiunge una coda di poli(A) per garantire il legame con il primer (figura 4). La qRT-PCR rappresenta un metodo testato, sensibile e affidabile per la quantificazione di miRNA noti. Infatti, uno dei limiti è l'impossibilità di identificare nuovi miRNA e inoltre è una tecnica di *medium-throughput*, che permette di processare solo pochi campioni al giorno (Pritchard et al., 2012).

Figura 4 – Step di retrotrascrizione



Pritchard et al., 2012 – Primer specifici per la retrotrascrizione di microRNA.

In a: rappresentazione del primer a forcina; in b: aggiunta di coda di poli(A)

L'RNA-sequencing è una tecnica di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che permette di delineare il profilo di espressione dei miRNA noti e di identificarne di nuovi. Lo step iniziale richiede la generazione della libreria degli *small RNA*, in cui per catturare e isolare le molecole di miRNA si utilizzano specifici adattatori che legano l'estremità 5' e 3' del filamento. Segue la reazione di retrotrascrizione che permette la formazione del cDNA. Infine, durante la reazione di sequenziamento, ogni filamento di cDNA viene letto e uno nuovo viene sintetizzato grazie all'utilizzo di nucleotidi marcati con fluorofori che permettono

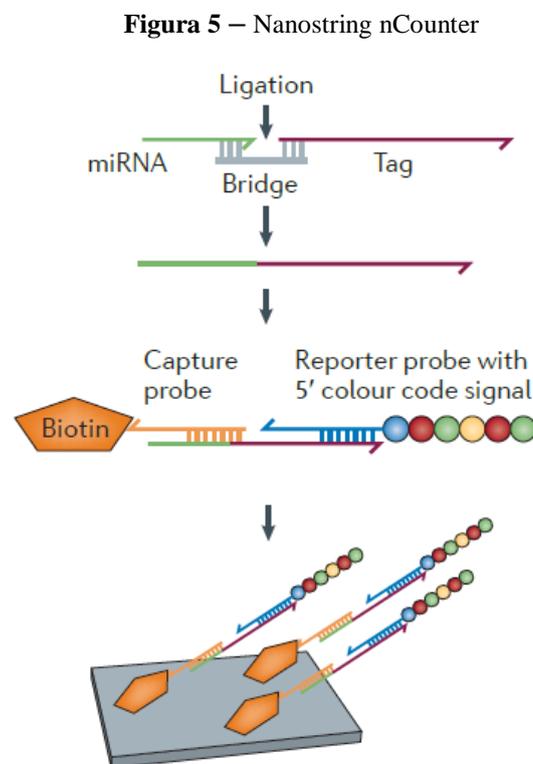
di identificare la corretta sequenza nucleotidica dei miRNA. Il sequenziamento dei miRNA è una tecnica di *high-throughput* che permette di identificare e quantificare i miRNA in poco tempo e con accuratezza ed efficienza (Pritchard et al., 2012).

Il microarray è una delle metodiche più diffuse e utilizzate per l'analisi di un vasto numero di miRNA. La tecnica si basa sul principio di ibridazione di una sonda marcata e specifica per il legame complementare con la sequenza di miRNA; solo nel caso di avvenuta ibridazione, la scansione del chip sarà in grado di rilevare la fluorescenza emessa dal complesso miRNA-sonda (Moreno-Moya et al., 2014). Il microarray ha il vantaggio di essere meno costoso delle altre tecniche presenti in commercio e permette di quantificare un largo numero di miRNA. D'altra parte, questa metodica presenta una minore specificità ed è meno accurata rispetto alla qRT-PCR o il RNA-sequencing (Pritchard et al., 2012).

Un'altra metodica basata sul principio d'ibridazione è il Nanostring nCounter, tecnologia recente che utilizza sequenze di RNA sintetico marcate con differenti fluorofori per creare specifici barcorde (Moreno-Moya et al., 2014). Il NanoString nCounter è in grado di rilevare e quantificare l'espressione di 800 miRNA presenti nel genoma umano in modo veloce ed efficace. La peculiarità di questa tecnica è data dall'assenza degli step di retrotrascrizione e di amplificazione del campione che permette di ridurre al minimo le tempistiche di produzione dei dati (Geiss et al., 2008). Lo step iniziale di questa metodica è la preparazione del campione di miRNA. A causa della loro ridotta lunghezza, i miRNA sono sottoposti alla reazione di *ligation* con una sequenza *tag* specifica per la cattura e il legame dei miRNA. Durante questo step, una sequenza di DNA, chiamata miRTag, è legata a un miRNA maturo attraverso una sequenza complementare all'ibrido miRNA-miRTag garantendo il legame tra le sequenze in modo altamente specifico e preciso (figura 5).

Questa tecnologia si avvale dell'utilizzo di una coppia di sonde, il *capture probe* e il *reporter probe*, complementari alle molecole di miRNA. Il *capture probe* è un frammento di DNA di circa 35-50 nucleotidi di lunghezza, marcato all'estremità 3' con la biotina che garantisce la successiva immobilizzazione e allineamento del complesso sonda-miRNA sul *cartridge* rivestito con streptavidina (Geiss et al., 2008). Il *reporter probe* è una sequenza di DNA, contigua alla *capture probe*, di circa 35-50 nucleotidi ed è caratterizzata dalla presenza di un *tag* di fluorofori all'estremità 5' (Geiss et al., 2008). Ogni *tag* di fluorofori è contraddistinto da un colore che è target specifico e che permette di identificare il miRNA corrispondente, fungendo da barcode molecolare (figura 5). Le sonde sono quindi in grado di legare in maniera diretta e specifica il loro target attraverso uno step di ibridazione overnight che avviene nel *nCounter Analysis System*.

Dopo l'ibridazione, i campioni sono trasferiti nel *nCounter Prep Station*, dove segue la reazione di purificazione e immobilizzazione del campione in cui i target e i *probe* in eccesso vengono eliminati tramite l'utilizzo delle biglie magnetiche, in grado di isolare i complessi di miRNA-*probe*, che si legano alla streptavidina presente sul *nCounter cartridge*, e di rimuovere i *probe* in eccesso e i trascritti di non interesse (figura 5). I complessi miRNA-*probe* sono sottoposti a un campo elettroforetico che permette l'allineamento dei complessi miRNA-*probe* sul *cartridge* (Geiss et al., 2008). Successivamente, il campione è posizionato sullo strumento *nCounter Digital Analyzer* che permette di raccogliere le immagini e di produrre i dati. I livelli di espressione dei miRNA sono misurati tramite l'*imaging* di ogni miRNA identificato grazie a un colore specifico e corrispondono al conteggio del numero di volte che il codice-colore specifico per un miRNA è rilevato (Geiss et al., 2008). Infine, i dati raccolti sono esportati in un file *Reporter Code Count (RCC)* e analizzati tramite il software *nSolver Analysis Software* (Geiss et al., 2008).



Pritchard et al., 2012 – Rappresentazione grafica dello step di formazione dell'ibrido miRNA-Tag; successivo appaiamento dell'ibrido miRNA-Tag con il capture e reporter probe; step di purificazione e di immobilizzazione dei complessi ibridizzati sul cartridge rivestito con streptavidina.

2.6.4 Predizione dei miRNA target

Il genoma umano codifica per più di 1800 miRNA e si stima che più del 50% degli RNA codificanti proteine siano sotto il loro controllo (Afonso-Grunz et al., 2015).

I miRNA svolgono la loro funzione attraverso il legame complementare con l'mRNA, solitamente nella regione 3' UTR, inibendo la traduzione proteica o inducendo la degradazione. L'identificazione dei geni regolati dai miRNA è un punto fondamentale nella comprensione delle complesse reti molecolari alla base della regolazione genica.

A tale scopo, si possono utilizzare gli strumenti di predizione bioinformatica che danno delle prime indicazioni sulla possibile interazione tra miRNA e mRNA bersaglio.

La valutazione dell'effettiva interazione miRNA:mRNA tramite approcci computazionali rappresenta un metodo utile e affidabile per identificare e restringere il numero di potenziali siti target per gli esperimenti di validazione.

I numerosi strumenti di predizione di miRNA target, implementati nel corso degli ultimi anni, si basano su algoritmi matematici che calcolano la probabilità di interazione tra miRNA e mRNA bersaglio e, in alcuni casi, permettono di svolgere analisi di *pathway*.

Fra i software più diffusi troviamo Diana Tools (Paraskevopoulou et al., 2013; Reczko et al., 2012), TargetScan (Lewis et al., 2005), microRNA.org (Betel et al., 2008), MiRDB (Wang, 2008), e così via. Tutti gli strumenti di predizione bioinformatica sono gratuiti e disponibili online, presentano un'interfaccia grafica veloce e *user-friendly*.

Gli algoritmi di predizione elaborati dai differenti software condividono alcune caratteristiche simili, fra cui la complementarità, la conservazione nella specie, l'energia libera e l'accessibilità del sito di legame (Peterson et al., 2014).

La complementarità tra miRNA e mRNA è determinata dalla regione *seed* che è specifica per ogni miRNA. La sequenza *seed* è la regione di 2-8 nucleotidi localizzata più vicino all'estremità 5' del miRNA. Per la maggior parte degli strumenti di predizione, la *seed match* è la complementarità di Watson-Crick (WC) tra un miRNA e il suo target nella sequenza *seed*. La complementarità di WC è data dal comune appaiamento che avviene tra l'adenosina e l'uracile o tra la guanina e la citosina. Una perfetta complementarità *seed* tra miRNA e mRNA si ha quando i nucleotidi dei due filamenti si appaiano senza alcuna interruzione. Secondo il tipo di algoritmo di un determinato strumento di predizione, si hanno diversi gradi di complementarità, per esempio 6mer, rappresenta la complementarità di 6 nucleotidi tra la regione *seed* del miRNA e il suo bersaglio, oppure 7mer/8mer, rappresenta la perfetta complementarità tra 2-8 nucleotidi della regione *seed* del miRNA (Peterson et al., 2014).

La conservazione si riferisce al mantenimento di una sequenza nella specie ed è un indice di rilevanza biologica. L'analisi di conservazione può focalizzarsi o solo sulla sequenza più vicina all'estremità 5' o su quella più vicina all'estremità 3' o sull'intera sequenza del miRNA. Solitamente, la regione con maggior grado di conservazione è la regione *seed* del miRNA (Lewis et al., 2003).

L'energia libera (o di Gibbs) può essere utilizzata come misura della stabilità di un sistema biologico. Quando il legame tra un miRNA e il suo bersaglio è definito stabile, significa che l'interazione miRNA:mRNA ha una maggiore probabilità di essere reale. Data la difficoltà di misurare l'energia libera, si considera come tale la variazione di energia libera ΔG durante una reazione. Una reazione con ΔG negativa è una reazione con minore energia disponibile e per questo è definita stabile. Quindi, l'energia libera può essere un indice di quanto il legame tra miRNA e mRNA è forte (Peterson et al., 2008).

L'accessibilità del sito di legame è invece una misura della facilità con cui un miRNA si posiziona su un mRNA e si appaia ad esso. Solitamente, la struttura secondaria dell'mRNA può interferire con la capacità del miRNA di legarsi sul sito di legame. Infatti, il processo con cui avviene l'ibridazione miRNA:mRNA comprende un primo step in cui il miRNA si lega a una piccola regione accessibile sull'mRNA che successivamente modifica la sua struttura secondaria per permettere al miRNA di completare l'appaiamento (Peterson et al., 2008).

Queste sono solo alcune delle caratteristiche condivise dai differenti algoritmi di predizione dei miRNA target. In generale, ogni algoritmo stima la probabilità di interazione tra un miRNA e i suoi geni bersaglio ed elabora uno score assegnato ad ogni potenziale mRNA target presente nella lista. Alcuni esempi: il miTG score è elaborato dall'algoritmo microT-CDS di Diana Tools e fornisce valori compresi tra 0 e 1, i geni con valori di miTG più vicini a 1 sono quelli con maggiore probabilità di essere reali target di un miRNA (Paraskevopoulou et al., 2013). Mentre, tutti i target predetti da miRDB hanno score compreso tra 50 e 100, e tutti i geni che hanno valori maggiori di 80 sono quelli che hanno più probabilità di essere dei bersagli reali (Wang, 2008).

Il software di predizione Diana Tools offre la possibilità di condurre anche le analisi di *pathway* attraverso l'utilizzo della *suite* mirPath v.3 (Vlachos et al., 2015). MirPath v.3 è un database di annotazione dei miRNA che combina le informazioni ottenute dall'algoritmo di predizione dei miRNA target con i dati relativi alle interazioni miRNA:mRNA, e svolge l'analisi di *pathway* basandosi sul database KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). KEGG è, infatti, una delle più note banche bioinformatiche che racchiude tutte le informazioni riguardanti le diverse e numerose *pathway* metaboliche della cellula.

3 - Scopo della tesi

Nel corso degli ultimi anni, la ricerca scientifica ha permesso di delineare con più precisione il ruolo dei microRNA nelle patologie psichiatriche, fra cui il DB e il suicidio. Numerosi studi hanno chiarito il ruolo biologico dei microRNA e hanno mostrato il loro meccanismo d'azione come regolatori dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Inoltre, hanno dimostrato che le alterazioni a carico del pattern di espressione dei microRNA sono associate a diversi processi e stati patologici sia a livello centrale che periferico. Recentemente, è stato riscontrato che i microRNA possono essere secreti dalle cellule e sono presenti anche nei fluidi biologici, soprattutto plasma e siero (Maffioletti et al., 2014). Questa caratteristica li rende dei promettenti marker biologici, facilmente quantificabili con test non invasivi e in grado di fornire importanti informazioni sullo stato di una determinata patologia.

Sulla base di tali premesse, il presente studio si propone di identificare potenziali correlati biologici del suicidio in pazienti affetti da disturbo bipolare e valutare il loro coinvolgimento nella patogenesi e nella farmacoterapia del suicidio.

Il primo step dello studio è stato quello di condurre un'analisi *high-throughput* per valutare il profilo di espressione dei microRNA in linfoblasti di pazienti bipolari vittime di suicidio confrontati con un gruppo di pazienti bipolari con basso rischio di commettere il suicidio.

Le colture cellulari di linfoblasti sono state costituite dal sangue prelevato dai pazienti in vita al momento del reclutamento per i diversi studi di farmacogenetica condotti nel nostro centro. Pertanto, la caratterizzazione clinica del campione e la diagnosi di disturbo bipolare è avvenuta *ante-mortem*.

Allo stesso tempo, è stato valutato l'effetto del litio al fine di valutare se, in condizioni diverse da quelle standard, le colture cellulari dei due gruppi presentassero un diverso pattern di espressione dei microRNA: specificamente, è stato utilizzato il litio in quanto farmaco notoriamente efficace nella prevenzione del suicidio.

Il secondo step dello studio è stato quello di esplorare a livello centrale l'espressione dei microRNA identificati come differenzialmente espressi a livello periferico nei due gruppi di pazienti. A tale scopo, i microRNA sono stati misurati nell'area di Brodmann 24 della corteccia cingolata anteriore di pazienti bipolari deceduti per suicidio confrontati con un gruppo di soggetti deceduti per cause naturali. Inoltre, è stato testato l'effetto del litio sui microRNA identificati in un differente modello cellulare, le cellule progenitrici neurali (NPC).

Infine, nell'ultimo step dello studio è stata condotta un'analisi *in silico* di predizione dei potenziali target dei microRNA e un'analisi *Gene Ontology* e di *pathway* per identificare i processi biologici in cui i microRNA identificati sono potenzialmente coinvolti.

4 - *Materiali e Metodi*

4.1 *Pazienti*

Il primo step di questo studio è stato condotto su una coorte di pazienti sardi con diagnosi di DB, reclutati presso l'Unità Complessa di Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari per uno studio di farmacogenomica approvato dal Comitato Etico locale. La diagnosi di malattia è stata posta in accordo con il Research Diagnostic Criteria (RDC; Spitzer et al., 1978) e il DSM-IV attraverso l'intervista diretta del paziente e standardizzata seguendo la *Schedule for Affective Disorder and Schizophrenia-Lifetime Version* (SADS-L; Endicott e Spitzer, 1978). I familiari di primo e secondo grado sono stati intervistati direttamente, ogniqualvolta possibile, utilizzando la medesima intervista strutturata in modo da formulare diagnosi di disturbo dell'umore secondo i RDC. Qualora i familiari non fossero disponibili per l'intervista, la diagnosi è stata posta attraverso i *Family History-Research Diagnostic Criteria* (Andreasen et al., 1977) utilizzando le notizie fornite da almeno due familiari e l'eventuale documentazione clinica disponibile. Tutti i valutatori sono stati specificamente formati per la conduzione delle interviste cliniche.

Il campione comprende 7 pazienti bipolari che hanno commesso il suicidio (S) e 12 pazienti bipolari con basso rischio di commettere il suicidio (BR).

La valutazione del rischio suicidario è stata effettuata secondo i criteri descritti nei lavori di Cavazzoni et al. (2007) e Manchia et al. (2013). Sono definiti a basso rischio (BR) i pazienti affetti da DB che non hanno mai manifestato alcun comportamento suicidario e che hanno almeno un parente di 1°/2° grado affetto da un disturbo dell'umore senza comportamento suicidario.

Per lo step di validazione dei miRNA, è stato incluso un campione di controllo (C) di soggetti sani (n=12), caratterizzati per non avere storia personale e familiare di disturbi psichiatrici e di comportamento suicidario. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di 20 ml di sangue che è stato inviato al Laboratorio di Farmacogenomica, Sezione di Neuroscienze e Farmacologia Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari. Al momento del prelievo di sangue, nessuno dei soggetti di controllo assumeva sostanze psicotrope, mentre parte del campione di pazienti bipolari erano in cura con litio (tabella 1). Tutti i soggetti hanno firmato il consenso informato per partecipare al presente studio.

Tabella 1 – Variabili cliniche e demografiche del campione di LCL

Variabile	S (n=7)	BR (n=12)	C (n=12)
Diagnosi	5 BDI, 2 SAM	5 BDI, 3 BDII, 4 SAM	-
Genere (M/F)	4 M / 3 F	5 M / 7 F	3 M / 9 F
Età al prelievo (media ± SEM)	40,6 ± 6,2	44 ± 4,3	37,5 ± 2,2
Litio al momento del prelievo	4 si/ 1 no/ 2 n.d.	12 si	-

S, pazienti bipolari che hanno commesso il suicidio; BR, bipolari con basso rischio di commettere il suicidio; C, controlli. BDI, Disturbo Bipolare di tipo 1; BDII, Disturbo Bipolare di tipo 2; SAM, disordine schizoaffettivo. M, maschi; F, femmine. SEM, errore standard della media. N.D., non disponibile.

4.2 Campione di colture cellulari di linfoblasti

Le colture cellulari sono state costituite subito dopo il prelievo ematico di ciascun paziente (7 S; 12 BR; 12 C) secondo procedure standard (Neitzel, 1986): le cellule linfocitarie, estratte da sangue periferico, sono state trasformate in cellule linfoblastoidi (LCL) mediante l'utilizzo dell'Epstein-Barr virus. Il processo che permette la trasformazione dei linfociti in linfoblasti è chiamato immortalizzazione, ovvero la capacità del virus di provocare in vitro la proliferazione indefinita dei linfociti. Le cellule linfocitarie immortalizzate sono state messe in crescita a 37°C in un incubatore a CO₂ nel medium RPMI-1640, contenente 15% di siero fetale bovino, 1% di L-glutamina (200mM), 1% di sodio piruvato (100mM), 1% di penicillina/streptomina (Sigma–Aldrich). Al raggiungimento della confluenza (6–9×10⁶ cellule per fiasca), ciascuna linea cellulare è stata congelata in azoto liquido ed è stata poi scongelata e rimessa in crescita al momento dell'esperimento. Una volta che le LCL in coltura hanno raggiunto la conta cellulare necessaria (6–9×10⁶), le cellule sono state sottoposte a trattamento con il litio: due aliquote identiche di linfoblasti sono state trasferite in due fiasche separate, una contenente medium con Cloruro di Litio (LiCl) a una concentrazione 1mM, e l'altra contenente medium drug-free. Dopo 7 giorni di trattamento con litio, ciascuna linea è stata raccolta per l'estrazione dei miRNA. L'RNA totale, compresa la frazione di miRNA, è stata isolata utilizzando il kit miRNeasy Mini (Qiagen, Canada) seguendo le procedure standard.

4.3 Campione di tessuto cerebrale post-mortem

L'area di Brodmann 24 (BA24) fa parte della corteccia cingolata anteriore (ACC) ed è situata nella regione superiore della superficie mediale dei lobi frontali, sopra il corpo calloso. L'ACC, che funge da ponte tra le strutture limbiche e il lobo frontale, svolge un ruolo nei processi di selezione, di *decision making* e di controllo volontario del comportamento, integrando l'attività cognitiva con quella delle emozioni e dell'affettività (Hercher et al., 2008). Numerosi studi mostrano il coinvolgimento di diverse aree cerebrali nella patogenesi del DB, in particolare è fortemente supportato il ruolo dell'ACC nella regolazione delle funzioni ideo-affettive e del tono dell'umore, e quindi nella neurobiologia del DB (Cerullo et al., 2009; Lim et al., 2013). Inoltre, si pensa che modificazioni nella morfologia di quest'area possano essere implicate nel suicidio (Torres-Platas et al., 2011). A questo proposito, i miRNA precedentemente identificati attraverso l'approccio *high-throughput* nel campione di LCL, sono stati misurati anche nel campione di tessuto cerebrale *post-mortem*, ovvero nell'area BA24 della corteccia cingolata anteriore. Il tessuto cerebrale è stato gentilmente fornito dalla Douglas-Bell Canada Brain Bank (www.douglasbrainbank.ca). Il campione di tessuto cerebrale *post-mortem* è costituito da un gruppo di 12 pazienti bipolari che hanno commesso il suicidio (S_{brain}) e un gruppo di controllo di 13 individui deceduti per cause naturali (C_{brain}), caratterizzati per assenza di storia personale e familiare di disturbi psichiatrici e di comportamento suicidario (tabella 2). L'autopsia psicologica è stata eseguita *post-mortem* su entrambi i gruppi di studio da psichiatri che hanno assegnato la diagnosi secondo il DSM-IV.

Tabella 2 – Variabili cliniche e demografiche del campione di ACC

Variabile	S_{brain} (n=12)	C_{brain} (n=13)
Diagnosi	12 BD	-
Genere (M/F)	8M / 4F	11M / 2F
Età (media \pm SEM)	44,5 \pm 4,4	41,6 \pm 6,4
pH cervello (media \pm SEM)	6,6 \pm 0,07	6,6 \pm 0,05
RD (media \pm SEM)	32 \pm 6,6	22,7 \pm 5,4

BD, Disturbo Bipolare; RD, refrigeration delay= la differenza della stima dell'ora di morte e l'ora al quale il tessuto cerebrale è stato congelato a -80°C. SEM, errore standard della media.

4.4 Campione di cellule progenitrici neurali

Le cellule progenitrici neurali (NPC) derivano direttamente dalle cellule staminali neurali e hanno la capacità di differenziarsi in uno specifico tipo cellulare che può essere un neurone progenitore o un motoneurone progenitore. A differenza delle cellule staminali che possono replicarsi in maniera indefinita, le NPC possono replicare solo un numero finito di volte. Le NPC umane, utilizzate per questo studio, sono state ottenute da cellule pluripotenti indotte (iPCS) della linea 8330-8, ottenute a loro volta da fibroblasti di soggetti sani. Le NPC sono state messe in coltura in piastre ricoperte con 200 µg/mL di poly-l-ornithine hydrobromide (Sigma-Aldrich) e 5 mg/mL di laminin (Sigma-Aldrich). Le NPC sono state fatte crescere in un medium al 70% di DMEM (Invitrogen) e al 30% di Hams F12 (Mediatech) contenente penicillina-streptomina (Invitrogen), supplemento B-27 (Invitrogen), e 20 ng/mL di epidermal growth factor (EGF) umano (Sigma-Aldrich) e di Fibroblast Growth Factor (FGF, R&D Systems). Le NPC sono state messe in crescita a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO₂. Una volta che le cellule hanno raggiunto circa il 90% di confluenza, i fattori di crescita EGF e FGF sono stati rimossi dal medium cellulare per consentire la differenziazione in neuroni. Una volta avvenuta la differenziazione neuronale, un gruppo di NPC è stato fatto crescere con medium contenente 1mM di LiCl per 7 giorni, mentre per il gruppo di controllo è stato utilizzato un medium drug-free. Le NPC utilizzate nel presente studio sono state gentilmente fornite da Carl Ernst della McGill University.

4.5 Estrazione di miRNA

Per svolgere il seguente studio sono stati utilizzati tre differenti tessuti (LCL, NPC e ACC-BA24) da cui sono stati estratti i miRNA. L'isolamento dei miRNA è avvenuto tramite l'utilizzo dei kit miRNeasy Mini e RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Canada), che permettono di estrarre e preservare la maggior parte delle popolazioni di miRNA presenti nel nostro genoma. Infatti, il kit miRNeasy Mini è in grado di purificare l'RNA totale includendo le piccole frazioni di RNA, come i miRNA (~18 nucleotidi), a partire da una piccola quantità di tessuto (massimo 1×10^7 cellule; 40mg di tessuto cerebrale). Il kit RNeasy MinElute Cleanup è invece utile per la diretta purificazione di miRNA e altre piccole molecole di RNA ed è stato utilizzato per l'estrazione dei miRNA dal tessuto cerebrale. Entrambi i kit garantiscono una veloce purificazione di RNA e di alta qualità grazie all'utilizzo di colonnine costituite da una membrana in silice in grado di legare fino a 100 µg di RNA. Inoltre durante

il processo di estrazione, è possibile trattare l'RNA con l'enzima DNasi I che permette di eliminare la presenza di eventuali tracce di DNA genomico dal campione.

L'RNA è stato quantificato tramite analisi spettrofotometrica con NanoDrop-1000 (Thermo Scientific) e sottoposto alla verifica di qualità su apparecchiatura Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

4.6 NanoString nCounter miRNA expression

Per valutare l'espressione globale dei miRNA nel campione complessivo di 36 LCL è stata utilizzata una nuova tecnologia, il NanoString nCounter miRNA expression. Il NanoString è un metodo innovativo per l'analisi dell'espressione genica che sta prendendo sempre più piede sia nella ricerca sia in campo diagnostico. Questa metodica permette di tracciare il profilo di espressione dei miRNA con una specificità e sensibilità elevata e costi e tempistiche minori rispetto alla tecnologia del microarray. Il Nanostring, infatti, sfrutta una nuova tecnologia digitale basata sulla quantificazione diretta di molecole individuali in una singola reazione che non richiede lo step di retrotrascrizione e amplificazione del campione. La precisione e l'accuratezza nella quantificazione dei miRNA sono garantite dall'utilizzo di una coppia di sonde, che costituiscono un barcode molecolare fluorescente specifico per ogni miRNA: il *capture probe*, caratterizzato dal legame in 3' con la biotina che garantisce la successiva immobilizzazione sul *cartridge* rivestito con streptavidina; il *reporter probe*, caratterizzato dal legame in 5' con diverse combinazioni di fluorofori che rendono la sonda specifica per ogni miRNA (Geiss et al., 2008). La quantificazione dei miRNA avviene tramite la conta diretta dei complessi miRNA-sonda grazie all'acquisizione per immagini del segnale fluorescente corrispondente a ogni barcode molecolare miRNA-specifico.

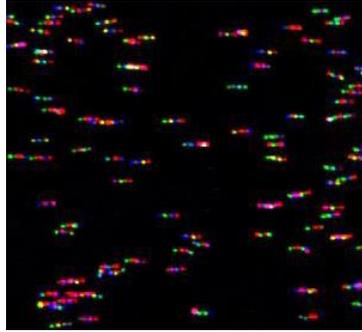
Per questo studio è stato utilizzato il kit *Human v2 miRNA Assay*, che richiede una quantità iniziale di 100 ng di RNA ed è in grado di identificare e quantificare sino a 800 miRNA espressi nel genoma umano e presenti nel database miRBase v.18 (miRBase.org). Le 800 paia di sonde specifiche per un set di miRNA sono combinate con una serie di controlli interni (sei controlli positivi, sei controlli negativi e cinque controlli di mRNA endogeno) che costituiscono il *Human v2 miRNA CodeSet*.

Brevemente, il Nanostring consiste di tre step: 1- lo step di ibridazione, in cui i miRNA si appaiano in maniera specifica ai *capture* e *reporter probe*; 2- lo step di purificazione e immobilizzazione, in cui le sonde in eccesso vengono eliminate mentre i complessi miRNA-

sonde sono immobilizzati e allineati sul *cartridge*; 3- lo step di *imaging*, in cui il *cartridge* è posizionato sul *Digital Analyzer* per la raccolta dei dati per immagini (figura 6).

Al termine dell'*imaging*, i dati grezzi sono stati esportati nel file *Reporter Code Count (RCC)* e in seguito analizzati con il software nSolver v.2.5 (nanosttring.com).

Figura 6 – Rappresentazione dei complessi miRNA-sonde



Tratta da NanoString.com – Step di imaging in cui si ha la raccolta dei dati di espressione tramite la conta di ogni barcode molecolare miRNA-specifico.

4.6.1 Analisi statistica dei dati di NanoString

Per il controllo qualità e la normalizzazione dei dati è stato utilizzato il software nSolver. Prima dell'analisi statistica dei dati ottenuti da uno studio di espressione, è necessario eseguire il controllo di qualità (QC) che permette di ottenere dei parametri al fine di valutare la buona riuscita dell'esperimento.

Il QC è stato eseguito attraverso due step: il primo consiste nell'utilizzare i controlli positivi interni, utili per controllare la variabilità di ogni singolo assay. Se due assay sono identici in tutti gli aspetti, allora anche i valori dei controlli positivi dovrebbero essere identici. Pertanto, normalizzare i dati utilizzando i controlli positivi permette di correggere le eventuali variabilità indipendenti al campione e dovute a errori avvenuti durante la preparazione del campione oppure durante la purificazione, l'*imaging* e così via. Nel QC è calcolato il fattore di correlazione dei controlli positivi, o *scaling factor*, utile per stimare l'efficienza complessiva della reazione e per standardizzare i valori di espressione dei miRNA e i valori dei controlli negativi.

Il secondo step del QC consiste nell'utilizzare i controlli di mRNA endogeno, utili per correggere le eventuali variabilità nella quantità iniziale di RNA, dovute per esempio a errori di pipettamento, o di concentrazione iniziale di RNA o problemi di degradazione del campione. Quindi, affinché la reazione possa essere giudicata buona, i livelli di espressione dei mRNA endogeni dovrebbero essere simili in tutti i campioni.

Dopo il QC, i valori di espressione dei miRNA sono stati normalizzati. La normalizzazione dei dati è stata eseguita calcolando la media geometrica dei 100 miRNA più espressi della lista (top-100) per ogni campione. In questo modo, per ogni campione è stato calcolato un fattore di correlazione (*Top-100 miRNA normalization factor*), compreso tra 0,8 e 1,5 e simile per ogni campione. Questo fattore di normalizzazione è un buon indice per valutare se complessivamente il profilo di espressione dei miRNA è simile all'interno di un campione. Infine, per una corretta interpretazione di uno studio di espressione è necessario stimare il valore di background dell'esperimento. A tale proposito, è stato calcolato il valore medio dei controlli negativi che ha permesso di determinare un valore soglia oltre il quale i valori di miRNA più bassi sono stati scartati. La media dei controlli negativi del *data set* era pari a 40 *count*, di conseguenza, per ogni gruppo di studio, i valori di miRNA minori di 40 *count* sono stati eliminati e 169 miRNA su 800 avevano livelli di espressione superiore al valore soglia stabilito.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software MultiExperiment Viewer v.4.9 (MeV; <http://www.tm4.org/mev.html>).

Le differenze nell'espressione dei miRNA e l'effetto del litio nei due gruppi sono stati valutati attraverso il test *t* Student. La soglia di significatività statistica è stata scelta sulla base di un *false discovery rate (FDR)* con *q-value* < 0,05.

4.7 Valutazione dei livelli di espressione dei miRNA identificati

La qRT-PCR è stata utilizzata per misurare i livelli di espressione dei miRNA identificati attraverso la tecnologia Nanostring, in tre differenti tessuti:

- 1) Nel campione di LCL di 7 S, 12 BR e 12 C. Quest'ultimo gruppo di controlli è stato aggiunto a questo punto dello studio per verificare se e quanto i miRNA identificati fossero specifici del suicidio o correlati al DB;
- 2) Nell'area di Brodmann 24 (BA24) della corteccia cingolata anteriore (ACC) del campione di 12 S_{brain} e 13 C_{brain}, per valutare a livello centrale l'espressione dei miRNA identificati in precedenza nelle LCL;
- 3) Nel campione di cellule progenitrici neurali (NPC) trattate con il litio e non trattate, per testare l'effetto del litio sull'espressione dei miRNA su un differente modello cellulare.

Per i tre step descritti è stato impiegato lo stesso protocollo di qRT-PCR: è stata utilizzata la tecnica TaqMan e lo strumento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems).

La qRT-PCR utilizzata per la quantificazione dei miRNA è caratterizzata da uno step iniziale di retrotrascrizione in cui un primer a forcina si lega all'estremità 3' del miRNA e si appaia a esso. Questa tipologia di primer è utilizzata per rendere la sequenza del miRNA più lunga e per garantire una maggiore specificità e affidabilità della reazione (figura 4). Segue la reazione di retrotrascrizione vera e propria, in cui i miRNA sono retrotrascritti in cDNA.

La qRT-PCR, che sfrutta la chimica TaqMan, si basa sull'utilizzo di sonde a ibridazione (sonde TaqMan), specifiche per il frammento d'interesse e marcate con molecole fluorescenti: all'estremità 5' si trova il *reporter* che emette la fluorescenza, e all'estremità 3' il *quencher* che spegne la fluorescenza. La tecnica utilizza un primer e la sonda TaqMan a sequenza specifica per il cDNA del miRNA di interesse.

Durante la PCR la sonda ibridizza a valle del primer. L'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi taglia la sonda, rilasciandola nella soluzione: in questo modo il *quencher* è separato dalla sonda, mentre il *reporter*, sollecitato da un raggio di luce laser, emette la fluorescenza che è rilevata dallo strumento.

La fluorescenza emessa durante la reazione è registrata a ogni ciclo di PCR dal sensore dello strumento e riportata in un sistema di assi cartesiani in cui è rappresentato in ascisse il numero di cicli (Ct: Cycle threshold) e in ordinate una scala logaritmica dell'emissione di fluorescenza associata a ogni ciclo (espressa come ΔR_n). Al termine della reazione è possibile visualizzare, tramite il *Sequence Detector Software* (SDS) il numero di cicli di PCR dopo i quali il campione oltrepassa la linea di riferimento (*threshold*), che è automaticamente impostata dallo strumento in un punto intermedio alla curva di crescita esponenziale della PCR, in quell'area cioè definita "geometrica". Minore è il numero di cicli necessari a superare il *threshold* e maggiore è la quantità di cDNA (e quindi di miRNA) di partenza. Una differenza di un Ct tra un campione e un altro costituisce una differenza di 2 volte nella quantità del materiale di partenza.

La qRT-PCR è stata eseguita secondo il protocollo standard effettuando un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, 40 cicli a 95°C per 15 sec e 60°C per 1 min. La reazione è stata condotta in triplicato per ogni campione utilizzando una sonda e i primer specifici sia per i miRNA da misurare sia per il RNU6B e il RNU24, *small nucleolar RNA* (snoRNA) endogeni. Gli snoRNA sono piccoli RNA nucleolari coinvolti nel processamento dei precursori dell'RNA ribosomiale e sono utilizzati nella qRT-PCR come geni endogeni (o *housekeeping*) perché i loro livelli di espressione non variano al variare del tessuto di origine

o dello stato di malattia e di conseguenza i loro livelli di espressione vengono utilizzati come normalizzatori.

Per calcolare i livelli di espressione assoluta dei miRNA è stata utilizzata la tecnica della curva di diluizione standard (*Absolute Quantification*, AQ). Oltre ai campioni con livelli di espressione da determinare, infatti, è stato inserito nella stessa piastra e per ogni piastra, un campione a concentrazione nota del quale sono stati preparati 6 gradi di diluizione con fattore 5. La curva di diluizione è stata preparata sia per i miRNA sia per gli endogeni, e ogni grado di diluizione è stato ripetuto in triplicato per poi calcolare un valore medio. I valori medi di Ct della curva di diluizione sono stati utilizzati per generare una retta di regressione in cui sono riportati in ascisse i valori di Ct e in ordinate il logaritmo naturale dei fattori di diluizione. Il valore così ottenuto, definito come *quantity mean*, è direttamente normalizzato rispetto al valore di *quantity mean* dell'endogeno.

4.7.1 Analisi statistica dei dati di espressione

Per testare le differenze statistiche dei livelli di espressione dei miRNA testati nei tre gruppi di LCL di S, BR e C, è stata condotta l'Analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA; $p\text{-value} < 0,05$) con l'analisi *post hoc* (test di Tukey HSD).

Le differenze nei livelli di espressione dei miRNA misurati sia nel tessuto cerebrale di S_{brain} e C_{brain} sia nelle colture di NPC trattate e non trattate con il litio, sono state calcolate con il test *t* di Student ($p\text{-value} < 0,05$).

Tutti i test statistici sono stati eseguiti utilizzando il programma GraphPad Prism v5 (GraphPad Software Inc., USA).

4.8 Analisi di Gene Ontology

L'identificazione dei target molecolari dei miRNA differenzialmente espressi nei gruppi di studio, è stata eseguita tramite l'utilizzo di Diana Tools (Paraskevopoulou et al., 2013). Brevemente, questo strumento di predizione utilizza l'algoritmo micro-T CDS v.5, disegnato per identificare i miRNA target sulla base di diversi principi: la complementarità del miRNA con la regione 3' UTR e con la regione codificante (CDS) dell'mRNA, la conservazione nella specie, l'energia libera e l'accessibilità del sito di legame (Peterson et al., 2014).

Le liste di geni target ottenute per entrambi i miRNA sono state utilizzate per l'analisi di Gene Ontology (GO) eseguita con il database WebGestalt (Web-based Gene Set Analysis Toolkit; www.bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/).

La Gene Ontology è un'ontologia genomica-molecolare che descrive la funzione dei geni e dei loro prodotti all'interno di tutte le specie. La GO è un progetto bioinformatico (www.geneontology.org) con l'obiettivo di unificare e annotare tutti i termini biologici esistenti attraverso lo sviluppo di tre vocabolari, distinti in “processi biologici”, “funzioni molecolari” e “componenti cellulari”. L'output che si ottiene dall'analisi di GO è il Grafico Diretto e Aciclico (DAG) ed è una rappresentazione grafica di come tutti i termini ottenuti dalla propria analisi sono ordinati e collegati tra loro, mostrando le relazioni esistenti tra le categorie di GO arricchite. Il DAG ha una struttura gerarchica in cui i termini più generici si trovano in cima mentre quelli più specifici sono rappresentati alla base del grafico.

L'analisi di GO è di fondamentale importanza per l'interpretazione dei dati ottenuti poiché fornisce le informazioni necessarie per comprendere il loro significato biologico, mostrando le funzioni e le relazioni tra geni sulla base del loro processo biologico, della funzione molecolare e della componente cellulare di cui fanno parte.

L'analisi di GO è stata eseguita utilizzando il test statistico ipergeometrico che fornisce un p-value, corretto per FDR (metodo di Benjamini-Hochberg, BH), per ogni categoria GO arricchita in cui i geni sono over-rappresentati.

4.9 Analisi di pathway

L'analisi di *pathway* (o di *enrichment*) per i miRNA differenzialmente espressi è stata condotta con il software Diana mirPath v.3 (Vlachos et al., 2015), che fornisce le informazioni relative al coinvolgimento dei miRNA nei diversi processi biologici basandosi sul database KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Infatti, l'analisi di *pathway* è utile per chiarire i dati osservati in un esperimento e fornisce informazioni aggiuntive sul possibile ruolo dei miRNA in specifiche *pathway* biologiche suggerendo, inoltre, la formulazione di nuove ipotesi. L'output grafico di Diana mirPath fornisce una visuale delle *pathway* modulate dai miRNA selezionati, facilitando l'interpretazione dei dati e la rappresentazione dei risultati dell'analisi effettuata.

Inoltre, mirPath fornisce i valori di significatività per ogni *pathway*, identificati applicando il test esatto di Fisher (Vlachos et al., 2015).

5 - Risultati

5.1 Espressione dei miRNA nel campione di linfoblasti

L'analisi dei dati di Nanostring ha mostrato una significativa differenza di espressione dei miRNA misurati nelle LCL non trattate tra i pazienti bipolari che hanno commesso il suicidio (S) e i pazienti bipolari con basso rischio di commettere il suicidio (BR). Il test *t* di Student con p-value corretto per FDR, ha evidenziato una significativa up-regolazione del mi-4286 (q-value=0,0018) e una significativa down-regolazione del miR-337-3p (q-value=0,029) nel gruppo dei S (tabella 3).

Tabella 3 - Differenza di espressione dei miRNA nei BR e nei S

miRNA	BR (media \pm SD)	SC (media \pm SD)	FC	p-value	FDR
miR-4286	7,37 \pm 0,44	8,55 \pm 0,29	1,16	1,10E-05	0,001856
miR-337-3p	10,75 \pm 0,15	10,27 \pm 0,30	0,96	3,45E-04	0,029154
miR-1253	4,55 \pm 2,25	0,77 \pm 1,44	0,17	0,001189	0,067000
miR-720	12,86 \pm 0,93	14,12 \pm 0,49	1,10	0,004712	0,099547
miR-4448	4,4 \pm 0,17	5,15 \pm 0,72	0,72	0,004252	0,102661
miR-570-3p	7,30 \pm 0,38	6,64 \pm 0,43	0,43	0,004074	0,114744
miR-486-3p	4,23 \pm 0,73	5,40 \pm 0,62	0,62	0,002827	0,119442
miR-302d-3p	7,87 \pm 0,45	7,12 \pm 0,47	0,47	0,003607	0,121931
miR-1246	8,46 \pm 1,01	6,81 \pm 1,23	1,23	0,006768	0,12709
miR-423-5p	7,33 \pm 0,37	6,82 \pm 0,32	0,32	0,008207	0,138695

MeV Analysis: Differenze di espressione dei miRNA misurati con la tecnica Nanostring nelle LCL non trattate nei due gruppi di pazienti bipolari: BR, basso rischio; S, suicidi.

SD, deviazione standard; FC, Fold Change, inteso come la misura della differenza di espressione di un miRNA tra due diverse condizioni sperimentali; FDR, false discovery rate. Solo i miRNA in grassetto mostrano un q-value significativo <0,05.

L'analisi dei profili di espressione dei miRNA misurati, attraverso tecnologia Nanostring, nelle LCL trattate con il litio ha mostrato 4 miRNA differentemente espressi nei gruppi di pazienti S e BR (p-value corretto per FDR <0,05; tabella 4). In particolare, il litio riduce l'espressione di tre miRNA che risultano down-regolati nel gruppo dei S rispetto ai BR: miR-4516 (q-value=0,0365), miR-186-5p (q-value=0,0453) e miR-423-5p (q-value=0,0472).

L'espressione del miR-4286 non sembra essere influenzata dal litio in quanto, anche se significativamente up-regolato nel gruppo dei S (q-value=0,0013), le differenze mostrano stesso *effect size* e direzione di quelle misurate nelle LCL non trattate con il litio.

Tabella 4 - Differenze di espressione dei miRNA nelle LCL trattate con il litio

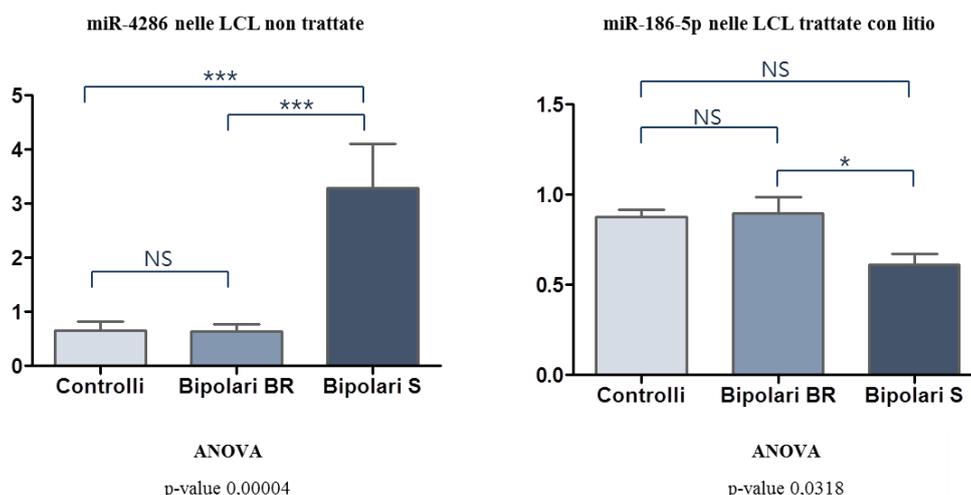
miRNA	BR (media ± DS)	SC (media ± DS)	FC	p-value	FDR
miR-4286	7,31 ± 0,46	8,59 ± 0,31	1,17	7,83E-06	0,0013
miR-4516	6,54 ± 0,32	5,85 ± 0,32	0,90	4,32E-04	0,0365
miR-186-5p	8,27 ± 0,21	7,91 ± 0,19	0,96	1,61E-03	0,0453
miR-423-5p	7,42 ± 0,26	6,91 ± 0,30	0,93	0,0014	0,0472
miR-2116-5p	6,29 ± 0,56	5,42 ± 0,36	0,86	0,0022	0,0522
let-7f-5p	9,94 ± 0,26	9,41 ± 0,32	0,95	0,0013	0,0538
miR-1246	8,96 ± 0,88	6,95 ± 1,26	0,78	0,0010	0,0561
miR-720	12,77 ± 0,79	13,85 ± 0,33	1,09	0,0033	0,0565
miR-302d-3p	7,34 ± 0,56	6,95 ± 0,30	0,90	0,0037	0,0571
miR-378a-3p + miR-378i	8,86 ± 0,21	9,23 ± 0,24	1,04	0,0032	0,0606
miR-188-5p	6,78 ± 0,20	7,11 ± 0,22	1,05	0,0047	0,0664
miR-378e	8,03 ± 0,47	7,35 ± 0,24	0,92	0,0032	0,0681
miR-93-5p	10,69 ± 0,17	0,17 ± 10,95	1,02	0,0054	0,0705
miR-320e	8,05 ± 0,37	7,42 ± 0,53	0,92	0,0063	0,0764
miR-26b-5p	8,57 ± 0,24	8,25 ± 0,18	0,96	0,0091	0,0960
miR-630	7,89 ± 0,50	7,28 ± 0,29	0,92	0,0114	0,0967
miR-106a-5p + miR-17-5p	10,84 ± 0,21	10,49 ± 0,29	0,97	0,0087	0,0983
miR-29a-3p	11,37 ± 0,24	11,73 ± 0,27	1,03	0,0105	0,0989
miR-652-3p	6,14 ± 0,16	5,84 ± 0,30	0,95	0,0148	0,1003
miR-1253	4,23 ± 2,44	0,99 ± 2,18	0,24	0,0114	0,1013
miR-548ai	5,55 ± 0,35	5,15 ± 0,20	0,93	0,0144	0,1014
miR-4284	7,41 ± 0,38	6,94 ± 0,27	0,94	0,0139	0,1018
miR-4488	5,56 ± 0,47	4,99 ± 0,33	0,90	0,0135	0,1033
miR-486-3p	4,32 ± 0,79	5,36 ± 0,64	1,24	0,0105	0,1039

MeV Analysis: Differenze di espressione dei miRNA misurati con la tecnica Nanostring nelle LCL trattate con il litio nei due gruppi di pazienti bipolari: BR, basso rischio; S, suicidi. SD, deviazione standard; FC, Fold Change, inteso come la misura della differenza di espressione di un miRNA tra due diverse condizioni sperimentali; FDR, false discovery rate. Solo i miRNA in grassetto mostrano un q-value significativo <0,05.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi statistiche svolte sui dati del Nanostring, tre miRNA sono stati scelti per la validazione tecnica. L'espressione dei miRNA è stata misurata con la tecnica della qRT-PCR: il miR-4286 e il miR-337-3p, poiché identificati nelle LCL al basale, sono stati misurati nelle LCL non trattate; mentre il miR-186-5p, identificato dopo esposizione al litio, è stato misurato nelle LCL trattate con il litio. A questo punto dello studio, i miRNA differentemente espressi sono stati misurati anche in un campione di 12 controlli. Non è stato possibile determinare i livelli di espressione del miR-337-3p con la qRT-PCR, pertanto solo i miRNA, miR-4286 e miR-186-5p, sono stati validati.

Il risultato del test dell'ANOVA (figura 7) ha mostrato una differenza di espressione del miR-4286 tra i tre gruppi di S, BR e C (p-value=0,00004). In particolare, l'espressione del miRNA è risultata sovra-espressa nel gruppo dei pazienti bipolari S confermando il risultato ottenuto dal Nanostring. La comparazione per test multipli (test di Tukey) ha permesso di evidenziare una significativa differenza di espressione nel confronto tra S e BR, e tra S e C. Invece, non ha messo in evidenza alcuna differenza di espressione tra il gruppo dei BR e il gruppo dei C. L'analisi dell'ANOVA, condotta sul campione complessivo di LCL trattate con il litio (S, BR e C), ha mostrato una differenza nei livelli di espressione del miR-186-5p (p-value=0,0318). Nello specifico, il miRNA è risultato sotto-espresso nel gruppo dei S rispetto ai BR e rispetto a C, seppure in quest'ultimo confronto la differenza non risulta statisticamente significativa (figura 7). Mentre, il confronto tra BR e C non ha mostrato alcuna differenza di espressione del miR-186-5p.

Figura 7 - Espressione dei livelli di miR-4286 e miR-186-5p misurati con la qRT-PCR

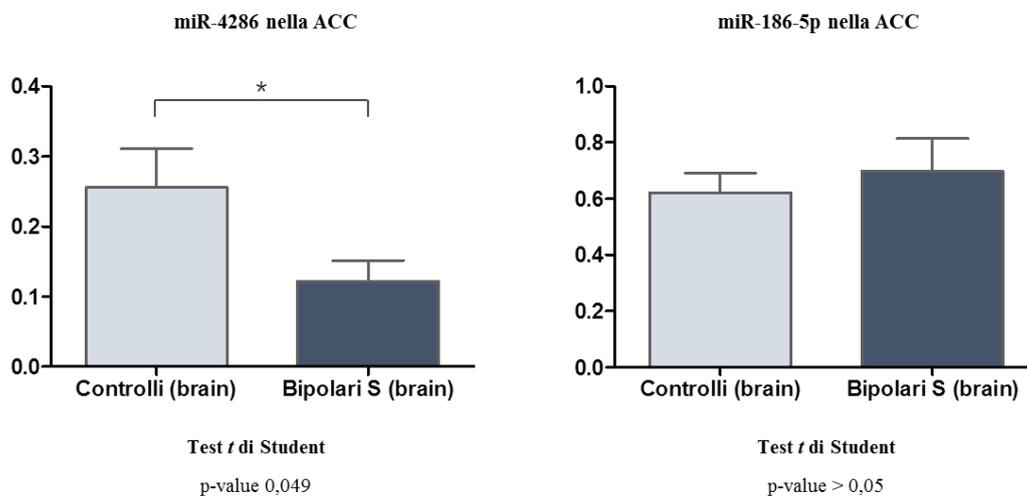


5.2 Espressione dei miRNA nel campione di tessuto cerebrale

L'analisi statistica dei livelli di espressione del miR-4286, misurati su tessuto cerebrale *post-mortem*, ha messo in evidenza una significativa differenza di espressione nel gruppo dei S_{brain} confrontati con il gruppo dei C_{brain}. In particolare, il miR-4286 risulta sotto-espresso nel campione dei suicidi, anche se il valore di p è al limite della significatività (figura 8).

Mentre non si ha alcuna differenza significativa nei livelli di miR-186-5p misurati nell'ACC di S_{brain} confrontati con i C_{brain}.

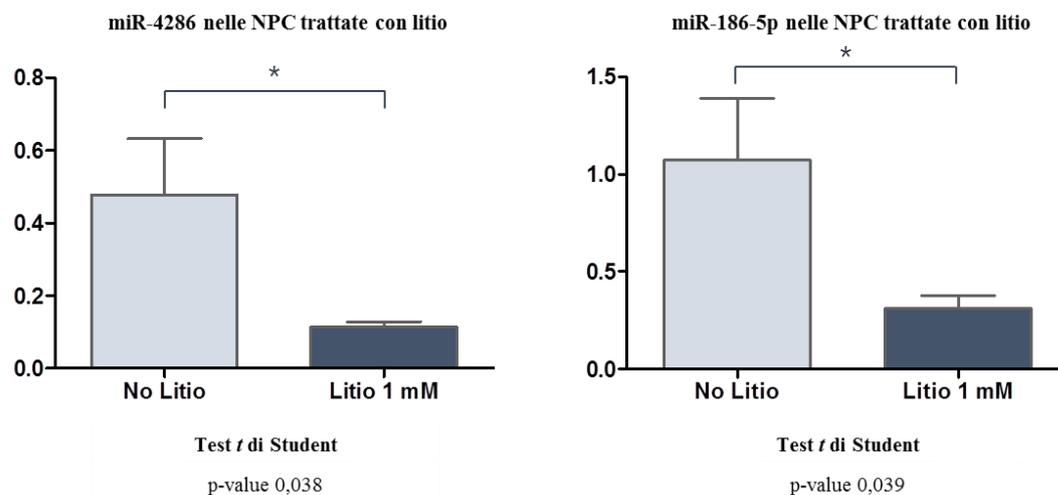
Figura 8 - Espressione dei livelli di miR-4286 e miR-186-5p misurati nella corteccia cingolata anteriore



5.3 Espressione dei miRNA nel campione di NPC

Il trattamento cronico con il litio 1mM nelle colture di cellule progenitrici neurali (NPC) ha indotto una riduzione dei livelli di entrambi i miR-4286 (FC=0,23) e miR-186-5p (FC=0,29). La differenza di espressione è mostrata nella figura 9, in cui si può osservare una riduzione dei miRNA nelle NPC trattate messe a confronto con le NPC non trattate. In particolare, è importante notare che, almeno per quanto riguarda il miRNA 186-5p, questo dato è concorde con il risultato ottenuto nelle LCL in cui il litio induce una riduzione di questo miRNA.

Figura 9 - Espressione dei livelli di miR-4286 e miR-186-5p nelle NPC



5.4 Analisi di Gene Ontology

L'analisi di predizione dei miRNA target, eseguita con Diana Tools microT-CDS, ha permesso di identificare i geni potenzialmente regolati da entrambi i miRNA, 354 geni per il miR-4286 e 2718 geni per il miR-186-5p. Le liste di predizione dei mRNA bersaglio di entrambi i miRNA sono state utilizzate per condurre l'analisi di Gene Ontology (GO) che ha fornito informazioni utili sulle funzioni e sulle relazioni tra i geni target sulla base del loro processo biologico, della funzione molecolare e della componente cellulare di cui fanno parte. L'analisi di GO condotta per il miR-4286 ha permesso di identificare 30 categorie significativamente arricchite per i bersagli molecolari di questo miRNA. Le categorie di GO sono rappresentate in tabella 5, distinte nei tre vocabolari di processi biologici, funzioni molecolari, componenti cellulari. Ugualmente per i geni target del miR-186-5p sono state

identificate 30 categorie significativamente arricchite, mostrate in tabella 6. Mentre nelle figure 10 e 11, in appendice, è rappresentato l'output grafico dell'analisi di GO dei rispettivi miRNA, miR-4286 e miR-186-5p.

Tabella 5 - Categorie di GO arricchite per i geni target del miR-4286

Biological Process	Adjusted p-value
Positive Regulation Of Neuron Differentiation	0,0494
Positive Regulation Of Biosynthetic Process	0,0494
Generation Of Neurons	0,0494
Dichotomous Subdivision Of Terminal Units Involved In Ureteric Bud Branching	0,0494
Positive Regulation Of Macromolecule Biosynthetic Process	0,0494
Positive Regulation Of Cellular Biosynthetic Process	0,0494
Positive Regulation Of Biological Process	0,0494
Neuron Differentiation	0,0494
Positive Regulation Of Cellular Process	0,0494
Iridophore Differentiation	0,0494
Molecular Function	
Chromatin Binding	0,0147
ADP-Ribosylation Factor Binding	0,0147
JUN Kinase Kinase Activity	0,0294
Transcription Factor Binding	0,0294
Mannosyl-Oligosaccharide Mannosidase Activity	0,0392
RNA Polymerase II Distal Enhancer Sequence-Specific DNA Binding Transcription Factor Activity	0,0392
Sequence-Specific DNA Binding Transcription Factor Activity	0,0490
Nucleic Acid Binding Transcription Factor Activity	0,0490
Sequence-Specific DNA Binding	0,0490
Sequence-Specific DNA Binding RNA Polymerase II Transcription Factor Activity	0,0500
Cellular Component	
Nuclear Part	0,0063
Organelle Part	0,0116
Intracellular Organelle Part	0,0116
Nuclear Lumen	0,0116
Nucleoplasm Part	0,0139
Membrane-Enclosed Lumen	0,0145
Synapse	0,0145
Organelle Lumen	0,0145
Intracellular Organelle Lumen	0,0155
Cell Junction	0,0162

Analisi di GO condotta con il database WebGestalt – Risultato del test ipergeometrico: adjusted p-value = p-value corretto per test multipli.

Tabella 6 - Categorie di GO arricchite per i geni target del miR-186-5p

Biological Process	Adjusted p-value
Regulation Of Cellular Process	1,30e-15
Regulation Of Biological Process	9,27e-14
Regulation Of Cellular Macromolecule Biosynthetic Process	1,28e-13
Regulation Of Gene Expression	3,21e-13
Regulation Of Macromolecule Metabolic Process	3,95e-13
Regulation Of Macromolecule Biosynthetic Process	3,95e-13
Regulation Of Nucleobase-Containing Compound Metabolic Process	1,14e-12
Biological Regulation	1,27e-12
Regulation Of Cellular Metabolic Process	1,27e-12
Regulation Of Nitrogen Compound Metabolic Process	1,75e-12
Molecular Function	
Nucleic Acid Binding	3,43e-08
Heterocyclic Compound Binding	3,43e-08
Binding	3,57e-08
Organic Cyclic Compound Binding	4,03e-08
Ion Binding	6,21e-08
Zinc Ion Binding	2,41e-07
DNA Binding	5,51e-07
Protein Binding	9,12e-07
SMAD Binding	9,12e-07
Transition Metal Ion Binding	6,16e-06
Cellular Component	
Intracellular	9,01e-16
Nucleus	5,95e-15
Intracellular Part	6,18e-14
Intracellular Membrane-Bounded Organelle	7,40e-11
Membrane-Bounded Organelle	7,40e-11
Organelle	1,03e-10
Intracellular Organelle	1,23e-10
Cell Part	9,36e-10
Cell	9,36e-10
Nuclear Part	1,00e-08

*Analisi di GO condotta con il database WebGestalt – Risultato del test ipergeometrico:
adjusted p-value = p-value corretto per test multipli.*

5.4 *Analisi di pathway*

Il principale intento di questa analisi era quello di identificare le *pathway* in cui ci potesse essere un coinvolgimento dei miRNA identificati come differenzialmente espressi nei pazienti bipolari vittime di suicidio. A tale scopo, per entrambi i miRNA, miR-4286 e miR-186-5p, è stata condotta un'analisi di *pathway* utilizzando l'algoritmo miRPath v.3 di Diana Tools. L'analisi di *enrichment* (o di arricchimento) dei miRNA differenzialmente espressi ha rilevato 36 KEGG *pathway* significativamente arricchite ($p\text{-value} < 0,05$ corretto per FDR), fra cui le più significative sono la *Amphetamine addiction*, *TGF-beta signaling pathway*, *Signaling pathway regulating pluripotency of stem cell*, *Long-term potentiation*, *Glutamatergic synapse* e *ErbB signaling pathway*. L'analisi è stata eseguita inserendo nel software entrambi i miRNA ed è stata utilizzata l'opzione *gene union* che mostra solo le *pathway* in cui più geni sono regolati da almeno uno o entrambi i miRNA selezionati (Vlachos et al., 2015). Come mostrato nella tabella 7, l'analisi di *pathway* ha permesso di evidenziare il coinvolgimento dei miRNA in importanti processi biologici sia a livello centrale che periferico. Fra le *pathway* più significative, troviamo la *TGF-beta signaling pathway* coinvolta in molteplici processi cellulari, fra cui la proliferazione e il differenziamento cellulare. Questa *pathway* risulta associata alla funzione di entrambi i miRNA con un $p\text{-value}$ corretto per FDR di $1,07e-05$. Nello specifico, sembra che il miR-4286 regoli il gene ACVR2A (*activin A receptor type IIA*) che codifica per un recettore che media la funzione delle “attivine”, proteine della superfamiglia TGF-beta. Mentre il miR-186-5p sembra essere coinvolto nella regolazione di 20 geni appartenenti a questa *pathway*, fra cui SMAD (*SMAD family member*), CREBBP (*CREB binding protein*), ACVR1 (*activin A receptor type I*) e così via.

Un'altra *pathway* importante in cui entrambi i miRNA sono potenzialmente coinvolti nella regolazione di 22 geni target (21 regolati dal miR-186-5p e uno regolato dal miR-4286), è la *long-term potentiation*, o potenziamento a lungo termine (LTP), che rappresenta una forma di plasticità sinaptica che sta alla base di diversi processi neurobiologici come l'apprendimento e la memoria.

I risultati ottenuti da questa analisi hanno fornito diverse informazioni sul possibile ruolo dei miRNA come regolatori dell'espressione genica, e rivela la loro importanza fondamentale nella comprensione dei meccanismi alla base dei processi fisio-patologici.

Tabella 7 – Analisi di *pathway* dei miR-4286 e miR-186-5p

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Amphetamine addiction	1,11E-07	21	2
TGF-beta signaling pathway	1,07E-05	21	2
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	1,07E-05	33	2
Glioma	3,61E-05	17	1 (miR-186-5p)
Long-term potentiation	5,04E-05	22	2
Glutamatergic synapse	5,04E-05	25	2
ErbB signaling pathway	0,000251	23	2
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0,000772	29	1 (miR-186-5p)
Hippo signaling pathway	0,001122	27	2
Dopaminergic synapse	0,001188	32	2
Gap junction	0,001661	16	1 (miR-186-5p)
Oocyte meiosis	0,001671	28	1 (miR-186-5p)
Axon guidance	0,001671	24	2
Estrogen signaling pathway	0,001987	18	1 (miR-186-5p)
Long-term depression	0,002811	14	1 (miR-186-5p)
cAMP signaling pathway	0,003840	39	2
Melanogenesis	0,004483	21	1 (miR-186-5p)
Oxytocin signaling pathway	0,004589	34	2
AMPK signaling pathway	0,005551	26	2
Cocaine addiction	0,006776	11	2
Wnt signaling pathway	0,006807	26	1 (miR-186-5p)
Insulin secretion	0,006807	18	1 (miR-186-5p)
FoxO signaling pathway	0,006807	25	2
Proteoglycans in cancer	0,006807	37	2
cGMP-PKG signaling pathway	0,008578	31	1 (miR-186-5p)
mTOR signaling pathway	0,021005	15	1 (miR-186-5p)
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0,021010	11	1 (miR-186-5p)
Tight junction	0,022410	24	2
Cholinergic synapse	0,023085	21	1 (miR-186-5p)
Thyroid hormone signaling pathway	0,023085	21	2
Gastric acid secretion	0,029488	17	1 (miR-186-5p)
Viral carcinogenesis	0,029488	23	2
Prostate cancer	0,032610	17	2
Focal adhesion	0,040750	35	2
Amoebiasis	0,047290	20	2
Calcium signaling pathway	0,048511	30	2

Diana Tools - output dell'analisi di *pathway* condotta per i miR-4286 e miR-186-5p.

KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; p-value < 0,05 corretto per FDR;

#genes, numero di geni all'interno della *pathway* regolati dal miRNA; #miRNAs, numero di miRNA (miR-4286 e miR-186-5p) coinvolti nella *pathway*.

6 - *Discussione*

In questo studio ho condotto un'analisi dei profili di espressione dei miRNA in pazienti affetti da disturbo bipolare con l'intento di identificare potenziali correlati biologici del suicidio e valutare il loro coinvolgimento nella patogenesi e nella farmacoterapia del suicidio.

A tale scopo ho svolto uno studio *high-throughput* per misurare l'espressione globale dei miRNA partendo da linfoblasti (LCL) derivati da pazienti bipolari vittime di suicidio (S) e da pazienti bipolari con basso rischio di commettere il suicidio (BR).

Le LCL sono state trattate cronicamente con il litio per valutare se l'espressione globale dei miRNA fosse influenzata da questo farmaco, considerato il trattamento di prima scelta per il DB e il farmaco più efficace nel ridurre il rischio suicidario. Infatti, uno degli obiettivi di questo studio era quello di identificare delle differenze nell'espressione dei miRNA nei due gruppi di pazienti S e BR e di esplorare le differenze nei meccanismi molecolari del litio in base al comportamento suicidario.

L'analisi *genome-wide* dei dati ottenuti con il Nanostring ha portato all'identificazione di due miRNA: il miR-4286, risultato sovra-espresso nelle LCL non trattate del campione dei S rispetto al campione dei BR, e il miR-186-5p, risultato sotto-espresso nelle LCL trattate con il litio nei S rispetto ai BR.

Al fine di verificare se i miRNA identificati fossero specifici del suicidio o correlati allo stato di malattia, un gruppo di controlli sani (C) è stato aggiunto nello step di validazione. I risultati ottenuti con la qRT-PCR hanno confermato l'up-regolazione del miR-4286 nel gruppo di LCL non trattate dei S a confronto sia con i BR sia con i C. Mentre non è risultata alcuna differenza nei livelli di espressione tra BR e C.

Per quanto riguarda il miR-186-5p, l'analisi dell'ANOVA ha confermato che il trattamento con litio induce una differenza nella sua espressione, che è risultata ridotta nel gruppo dei S confrontati con il gruppo dei BR e dei C, seppure in quest'ultimo confronto la differenza non risulta statisticamente significativa. Mentre il confronto tra i BR e i C non ha mostrato alcuna differenza nei livelli di espressione di questo miRNA.

Nel complesso, l'analisi dei profili di espressione dei miRNA nelle LCL non trattate e trattate con il litio ha evidenziato una differente espressione dei miRNA miR-4286 e miR-186-5p nel gruppo dei S messi a confronto con il gruppo dei BR e dei C, mentre i livelli di espressione del campione dei BR sono risultati simili a quelli dei C. Questo risultato va interpretato alla luce delle evidenze secondo le quali il suicidio, seppure altamente correlato ai disturbi

dell'umore, rappresenta un fenotipo indipendente con una base biologica e genetica che potrebbe essere differente e quindi non completamente sovrapposta a quella del DB.

Come è stato descritto in precedenza, l'analisi esplorativa dei profili di espressione dei miRNA è stata condotta su colture cellulari di linfoblasti. Le LCL, seppure derivate da un tessuto periferico, presentano diversi vantaggi per lo studio di patologie psichiatriche: possono essere utilizzate per svolgere test farmacologici *in vitro*, sono facilmente accessibili e, soprattutto, sono disponibili *ante-mortem*. Infatti, le LCL del nostro campione sono state costituite dal sangue prelevato dai pazienti in vita, prima che commettessero il suicidio. Pertanto, la diagnosi di DB è stata effettuata *ante-mortem* e, nel corso del periodo di osservazione presso la nostra clinica, è stato possibile collezionare dettagliate informazioni cliniche che hanno consentito una precisa caratterizzazione del campione. Invece, negli studi *post-mortem* la diagnosi della malattia, così come le informazioni cliniche, sono raccolte solo dopo la morte del soggetto tramite "autopsia psicologica" che permette di risalire al profilo dell'individuo solo grazie alle informazioni ricavate da colloqui con i parenti della vittima. Inoltre, in questo tipo di studi non è possibile svolgere test farmacologici *in vitro* poiché il tessuto è collezionato solo dopo la morte del paziente.

Anche se l'utilizzo delle LCL da un lato potrebbe rappresentare un limite, poiché i risultati ottenuti potrebbero non riflettere esattamente quanto accade a livello centrale, d'altro lato può consentire di identificare biomarker periferici che potrebbero essere utili in ambito diagnostico e nella scelta della migliore strategia terapeutica per ciascun paziente.

Un secondo obiettivo dello studio è stato quello di esaminare il ruolo dei miRNA a livello centrale. L'espressione di miR-4286 e miR-186-5p è stata infatti misurata nell'area BA24 della corteccia cingolata anteriore (ACC) derivata da un gruppo di pazienti bipolari vittime di suicidio (S_{brain}) e da un gruppo di individui sani deceduti per cause naturali (C_{brain}). I risultati hanno mostrato una riduzione dei livelli del miR-4286 nel gruppo dei S_{brain} confrontati con il gruppo dei C_{brain} . Anche se il p-value ottenuto dal t-test è al limite della significatività, i livelli di espressione del miR-4286 mostrano una tendenza opposta a quella identificata nelle LCL, in cui l'espressione di questo miRNA è risultata up-regolata nel campione dei S.

Nonostante questo risultato sia discordante da quello ottenuto a livello periferico, l'espressione del miR-4286 è, in ogni caso, alterata in entrambi i tessuti di pazienti bipolari deceduti per suicidio. Questo dato suggerisce che il miR-4286, probabilmente, svolge un ruolo nei processi biologici e genetici che stanno alla base del fenotipo del suicidio. Inoltre, i meccanismi che regolano l'espressione dei miRNA, e nel caso specifico del miR-4286, potrebbero variare in base al tipo di tessuto. Infatti, è noto che l'espressione dei miRNA è

tessuto-specifica ed è regolata durante lo sviluppo (Maffioletti et al., 2014). Di conseguenza, un'altra considerazione importante è che l'espressione del miR-4286 potrebbe cambiare anche in base all'area cerebrale, pertanto esplorare la sua espressione in altre aree del sistema nervoso centrale, potrebbe rappresentare uno step per gli studi futuri. Oltre alla corteccia cingolata anteriore, coinvolta nella neurobiologia del DB e del suicidio, altre aree cerebrali sembrano svolgere un ruolo importante nella predisposizione del suicidio, in particolare diverse regioni della corteccia prefrontale (Turecki, 2014). Alla luce di queste evidenze e al fine di chiarire i risultati ottenuti, sarebbe utile misurare il miR-4286 nell'ACC di un campione indipendente ed esplorare l'espressione di questo miRNA in altre aree cerebrali.

Per quanto riguarda i livelli di espressione del miR-186-5p, misurati nell'ACC del campione dei S_{brain} confrontati con il campione dei C_{brain} , non è risultata alcuna differenza di espressione tra i due gruppi di studio. Questo dato spiega che l'espressione del miR-186-5p è alterata solo in presenza del trattamento farmacologico con il litio, ed è confermato dal fatto che i pazienti bipolari del campione dei S_{brain} non erano in terapia con il litio.

Un'altra evidenza che avvalorata la nostra ipotesi è data dai risultati ottenuti dalle colture di cellule progenitrici neurali (NPC). Al fine di verificare in un differente modello cellulare l'effetto del litio sull'espressione dei miRNA identificati, i livelli di entrambi i miRNA sono stati misurati sulle NPC trattate con il litio e sulle NPC di controllo non trattate. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'espressione del miR-186-5p nelle NPC trattate con il litio. Anche l'espressione del miR-4286 è risultata ridotta nelle NPC trattate con il litio. Questi dati forniscono delle informazioni aggiuntive sulla possibile interazione del litio con la regolazione dell'espressione dei miRNA identificati, indipendentemente dal fenotipo malattia e dal fenotipo suicidio.

L'analisi di predizione dei geni target condotta su Diana Tools ha permesso di identificare i geni potenzialmente regolati da entrambi i miRNA, 354 geni per il miR-4286 e 2718 geni per il miR-186-5p. Le liste dei target molecolari predetti per entrambi i miRNA sono state utilizzate per condurre l'analisi di Gene Ontology (GO) che ha fornito informazioni utili al fine di individuare i processi biologici e le funzioni molecolari in cui entrambi i miRNA sono coinvolti. In particolare, sono interessanti alcuni dei risultati ottenuti dall'analisi di GO per il miR-4286 in cui è stato rivelato che diversi gruppi di geni target sono significativamente associati ai processi biologici legati alla generazione neuronale (*GO:0048699*) e alla regolazione del differenziamento dei neuroni (*GO:0045666*). Questo dato suggerisce che probabilmente il miR-4286 potrebbe svolgere un ruolo a livello centrale attraverso la regolazione dell'espressione di geni coinvolti in importanti processi neuronali. Inoltre, questo

risultato mostra l'importanza e i vantaggi dell'utilizzo del tessuto periferico, poiché l'identificazione di questo miRNA è avvenuta inizialmente nei linfoblasti. Infatti, anche se le alterazioni nel tessuto periferico non sempre corrispondono esattamente a quanto avviene nel cervello, l'utilizzo dei linfoblasti ha permesso di individuare un miRNA che è correlato con la funzione neuronale e che probabilmente svolge un ruolo a livello centrale.

L'analisi di GO per il miR-186-5p mostra il coinvolgimento dei geni target in diversi processi cellulari, come la regolazione dell'espressione genica, la regolazione dei processi biologici e metabolici. Poiché l'espressione del miR-186-5p è risultata differente tra i gruppi in seguito all'esposizione al litio, è possibile che ci sia una relazione tra i meccanismi molecolari in cui sia il miRNA sia il litio sono coinvolti. Infatti, sebbene il meccanismo d'azione del litio sia ancora in gran parte sconosciuto, numerose evidenze suggeriscono che il litio possa esercitare degli effetti sui meccanismi molecolari di secondi messaggeri o di altre proteine intracellulari coinvolte nella trasduzione del segnale e nella regolazione di trascrizione genica, neurogenesi, sopravvivenza cellulare e plasticità neuronale (Can et al., 2014).

Un altro risultato interessante è quello mostrato dall'analisi di KEGG *pathway* che ha permesso di individuare gruppi di geni potenzialmente regolati dai miRNA e di caratterizzare il loro ruolo biologico come regolatori dell'espressione genica.

In particolare, l'analisi di *pathway* mostra il coinvolgimento di entrambi i miRNA in molti processi neuronali. Fra le *pathway* più significative, una degna di nota è la *TGF-beta signaling pathway*. Le proteine facenti parte della famiglia del fattore di crescita trasformante beta (TGF-beta) sono proteine strutturalmente correlate alle citochine, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema immunitario, nella rigenerazione tissutale e nella differenziazione cellulare. Un numero sempre più crescente di evidenze supporta l'ipotesi della neuro-infiammazione nella depressione e nel suicidio (Brundin et al., 2015; Devorak et al., 2015; Omrani et al., 2012). In generale, le citochine, come mediatori della risposta pro- e anti-infiammatoria, regolano i processi biologici alla base dell'interazione tra sistema immunitario e nervoso (Omrani et al., 2012). Numerosi studi hanno riportato un'associazione tra il suicidio e le alterazioni nell'espressione genica del TGF-beta (Devorak et al., 2015), così come l'interazione del sistema del TGF-beta e dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sembra essere associata al comportamento suicidario (Pandey e Dwivedi, 2010). Pertanto, queste evidenze suggeriscono il possibile ruolo dei miRNA mir-4286 e mir-186-5p nella regolazione del sistema del TGF-beta e il loro coinvolgimento nel suicidio. Un altro risultato interessante è mostrato dallo studio di Liang et al. (2008) in cui gli autori suggeriscono che il ruolo neuro-protettivo del litio possa essere correlato alla sua interazione con il sistema di segnale delle

TGF-beta. Poiché il mir-186-5p è coinvolto nella *pathway TGF-beta signaling* e la sua espressione è influenzata dal litio, possiamo ipotizzare che vi sia un'interazione tra la *TGF-beta signaling pathway*, il litio e il mir-186-5p.

Un'altra importante *pathway* è quella della *long-term potentiation*, in cui entrambi i miRNA sono coinvolti nel regolare l'espressione di 22 geni, nello specifico 21 geni sono regolati dal mir-186-5p (fra cui CAMK2D, GRIA1, GRM5) e 1 gene (GRIN2B) è regolato dal mir-4286. Il *long-term potentiation*, o potenziamento a lungo termine (LTP), è un meccanismo di plasticità sinaptica che garantisce l'aumento dell'efficacia sinaptica a lungo termine ed è il meccanismo che sta alla base dell'apprendimento e della memoria. LTP è un meccanismo complesso determinato da stimoli brevi e ad alta frequenza che causano l'attivazione dei recettori NMDA (recettore del glutammato connesso al canale al calcio) e la conseguente entrata di calcio all'interno del neurone. L'aumento di calcio all'interno della cellula neuronale determina l'attivazione della proteinchinasi CaM KII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase II) che a sua volta attiva il recettore AMPA (recettore ionotropico del glutammato) potenziando la sua capacità di trasmissione sinaptica. È importante sottolineare che questa *pathway* porta all'attivazione di altre vie biologiche, tra cui la *MAPK signaling pathway* e la *Calcium signaling pathway*, e a quest'ultima sono risultati associati entrambi i miRNA (tabella 7). Il risultato ottenuto dall'analisi di *pathway* riguardo al coinvolgimento dei miRNA nella LTP *pathway* è supportato dalle numerose evidenze che riportano che i miRNA potrebbero esercitare un ruolo nella regolazione della plasticità sinaptica e nel suicidio (Serafini et al., 2012).

Nel complesso, l'analisi di *pathway* ha permesso di chiarire il possibile ruolo che i miRNA identificati nel nostro studio potrebbero avere nei diversi processi biologici e ha fornito informazioni utili per generare nuove ipotesi da testare negli studi futuri.

In particolare, la predizione dei miRNA target e l'analisi di *pathway* hanno permesso di stabilire le potenziali interazioni tra i miRNA identificati e i geni target che, in seguito, potranno essere testate sperimentalmente per confermare la rilevanza dei risultati ottenuti.

7 - Conclusioni

L'analisi dei profili di espressione dei miRNA condotta nel nostro studio ha permesso di identificare due miRNA, il mir-4286 e il mir-186-5p, differentemente espressi in pazienti bipolari vittime di suicidio confrontati con pazienti bipolari con basso rischio di commettere il suicidio.

L'espressione del mir-4286 è risultata alterata sia nei linfoblasti dei pazienti bipolari suicidi sia nel tessuto cerebrale ottenuto da un campione di pazienti bipolari vittime di suicidio, anche se tale differenza era in direzione opposta nei due tessuti. Questo risultato suggerisce che il mir-4286 potrebbe costituire un potenziale biomarker periferico del suicidio e che potrebbe essere coinvolto nelle alterazioni genetiche coinvolte nella sua eziopatogenesi.

La variazione dei livelli di espressione del mir-186-5p è emersa nei linfoblasti dei pazienti bipolari suicidi solo dopo esposizione al trattamento cronico con il litio, suggerendo un effetto differenziale del trattamento in base al comportamento suicidario. Il coinvolgimento del mir-186-5p nel meccanismo d'azione del litio è stato confermato anche dagli esperimenti condotti sulle cellule progenitrici neurali che hanno mostrato una down-regolazione di entrambi i miRNA dopo trattamento con litio.

Infine, le analisi di Gene Ontology e di pathway hanno fornito informazioni importanti sul possibile ruolo dei miRNA nei meccanismi biologici alla base del suicidio.

Studi futuri per valutare l'interazione miRNA:mRNA target saranno condotti per confermare i risultati ottenuti dal nostro studio e confermarne l'applicabilità come biomarker periferici di comportamento suicidario e come potenziali bersagli di strategie terapeutiche specifiche e innovative.

Bibliografia

- Afonso-Grunz, Muller - Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015; 72:3127–3141.
- Ahrens, Muller-Oerlinghausen - Does lithium exert an independent antisuicidal effect? *Pharmacopsychiatry*, 2001; 34:132-6.
- Allard, Norlen - Caudate nucleus dopamine D(2) receptors in depressed suicide victims. *Neuropsychobiology*, 2001; 44, 70–73.
- American Psychiatric Association, DSM-5. 2014. *Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali*. Masson.
- Angst et al. - Mortality of patients with mood disorders: follow-up over 34–38 years. *J Affective Disord*, 2002; 68:167–181.
- Arango et al. - Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 25, 892–903.
- Arató et al. - Retrospective psychiatric assessment of 200 suicides in Budapest. *Acta Psychiatr Scand.* 1988;77:454-456.
- Asberg et al. - Serotonin depression - a biochemical subgroup within the affective disorders? *Science*. 1976; 191, 478–480.
- Baldessarini et al. – Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: a meta-analytic review. *Bipolar. Disord.*, 2006B; 8:625-39.
- Baldessarini et al. - Lithium treatment and suicide risk in major affective disorders: update and new findings. *J Clin Psychiatry* 2003; 64:44–52.
- Baldessarini et al. – Suicide in bipolar disorder: Risks and management. *CNS Spectr.* 2006A Jun;11(6):465-71.
- Barbato et al. - Dicer expression and localization in post-mitotic neurons. *Brain Res.* 2007; 1175: 17–27.
- Bellivier et al. - Suicidal attempts in bipolar disorder: results from an observational study (EMBLEM). *Bipolar. Disord.*, 2011; 13:377-86.
- Bertolote, Fleischmann - A global perspective on the magnitude of suicide mortality. In: Wasserman D, Wasserman C, editors. *Oxford textbook of suicide and suicide prevention*. Oxford: Oxford University Press; 2009; p.91-8.
- Bertolote, Fleischmann - Suicidal behavior prevention: WHO perspectives on research. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, 2005; 133C:8-12.

- Betel et al. - The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36:D149–D153.
- Bielau et al. - Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a post-mortem study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1096, 157–169.
- Bolton, Gunnell, Turecki – Suicide risk assessment and intervention in people with mental illness. *BMJ* 2015; 351:h4978.
- Bondy et al. - Lack of association of serotonin-2A receptor gene polymorphism (T102C) with suicidal ideation and suicide. *Am J Med Genet*, 2000; 96:831-835.
- Bondy, Buettner, Zill - Genetics of suicide. *Mol Psychiatry*, 2006; 11:336–351.
- Bowden et al. - Dopamine D1 and D2 receptor binding sites in brain samples from depressed suicides and controls. *Brain Res.*1997; 752, 227–233.
- Brundin et al. - The role of inflammation in suicidal Behavior. *Acta Psychiatr Scand* 2015; 132: 192–203.
- Can, Schulze, Gould - Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014 Aug;123:3-16.
- Cavazzoni et al. - Heterogeneity of the risk of suicidal behavior in bipolar-spectrum disorders. *Bipolar Disord.* 2007; 9:377–385.
- Cerullo et al. - The functional neuroanatomy of bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry* 2009; 21:314–322.
- Cheetham et al. - Brain 5-HT1 binding sites in depressed suicides. *Psychopharmacology (Berl).* 1990; 102(4):544-8.
- Chen et al. - Suicide risk in major affective disorder: results from a national survey in China. *J Affect Disord.*, 2014; 155:174-9.
- Chien-Chang et al. - Suicide Methods in Asia: Implications in Suicide Prevention. *Int J Environ Res Public Health.* 2012; 9(4): 1135–1158.
- Cipriani et al. - Lithium in prevention of suicide in mood disorders: updated systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2013; 346:f3646.
- Cipriani et al. - Lithium in the prevention of suicidal behavior and all-cause mortality in patients with mood disorders: a systematic review of randomized trials. *Am. J. Psychiatry*, 2005; 162:1805-19.
- Cogswell et al. – Identification of miRNA changes in Alzheimer’s disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.*, 2008; 14, 27–41.

Comai et al. - The pharmacology of aggressive behavior: a translational approach: part 2: clinical studies using atypical antipsychotics, anticonvulsants, and lithium. *J Clin Psychopharmacol.* 2012; 32:237–60.

Costanza et al. – Neurobiology of suicide: do biomarkers exist? *Int J Legal Med,* 2014; 128:73–82.

Crump et al. - Comorbidities and Mortality in Bipolar Disorder A Swedish National Cohort Study. *JAMA Psychiatry.* 2013; 70(9):931-939.

Currier et al. - Stress, genes and the biology of suicidal behavior. *Psychiatr. Clin. North Am.* 2008; 31, 247–269.

Devorak et al. - Cellular and Molecular Inflammatory Profile of the Choroid Plexus in Depression and Suicide. *Front Psychiatry.* 2015; 6:138.

Dwivedi et al. - Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch. Gen.Psychiatry.* 2003; 60, 804–815.

Endicott, Spitzer - A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry,* 1978; 35:837-44.

Erhardt et al. - Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38:743–52.

Ernst, Chen, Turecki - Histone methylation and decreased expression of TrkB.T1 in orbital frontal cortex of suicide completers. *Mol Psychiatry,* 2009; 14:830-832.

Escriba et al. - Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29, 1512–1521.

Evans et al., 2004 – Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101, 15506–15511.

Finnegan et al. - MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013; 48(1):51-68.

Fiori et al. - Disorder Implication of the polyamine system in mental disorders *J Psychiatry Neurosci.* 2008; 33:102-10.

Fiori, Turecki - Epigenetic regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SAT1) in suicide. *J. Psychiatr. Res.* 2011; 45, 1229–1235.

Fiori, Turecki - Genetic and epigenetic influences on expression of spermine synthase and spermine oxidase in suicide completers. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010; 13:725–736.

Forstner et al. - Genome-wide analysis implicates microRNAs and their target genes in the development of bipolar disorder. *Translational Psychiatry,* 2015; 5, e678.

- Galfalvy et al. - Increased risk of suicide attempt in mood disorders and TPH1 genotype. *J. Affect. Disord.* 2009; 115:331-8.
- Geiss et al. - Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(3):317-25.
- Gilad and Gilad - Overview of the Brain Polyamine-Stress-Response: Regulation, Development, and Modulation by Lithium and Role in Cell Survival. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2002; 23, 637-649.
- Giraldez et al. - MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science.* 2005; 308(5723):833-8.
- Gonda et al. - The possible contributory role of the S allele of 5-HTTLPR in the emergence of suicidality. *J. Psychopharmacol.* 2011; 25:857-66.
- Goodwin, Jamison - *Manic-Depressive Illness.* New York, NY: Oxford University Press; 1990.
- Grande et al. - Bipolar disorder. *Lancet.* 2015; S0140-6736(15)00241.
- Griffiths-Jones – The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*; 2004, Vol. 32.
- Guipponi et al. – Genetic and epigenetic analysis of SSAT gene dysregulation in suicidal behaviour. *American Journal of Medical Genetics Part.B: Neuropsychiatric Genetics*, 2008; 150B, 799–807.
- Haghighi et al. - Investigating the relationship between the demographic variables associated with suicide in different seasons, among suicidal people in the Shahid Mohammadi Hospital, Bandar Abass, Iran. *J Educ Health Promot.* 2015; 4: 3.
- Hanke, et al. - A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol.Oncol.*, 2010; 28, 655–661.
- Harris, Barraclough - Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis. *Br J Psychiatry* 1997; 170:205-28.
- Hercher et al. - Alcohol dependence–related increase of glial cell density in the anterior cingulate cortex of suicide completers. *J Psychiatry Neurosci* 2009; 34(4):281-8.
- Hor, Taylor - Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J Psychopharmacol*, 2010; 24 (Suppl):81–90.
- Isometsá et al. - Suicide in bipolar disorder in Finland. *Am J Psychiatry.* 1994; 151:1020-1024.
- Jacobs - Practice guideline for the assessment and treatment of patients with suicidal behaviors. *Am J Psychiatry.* 2003; 160(11 Suppl):1-60.
- Keller et al. - Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67:258–267.

- Kessler et al. - Trends in suicide ideation, plans, gestures, and attempts in the United States, 1990-1992 to 2001-2003. *JAMA*. 2005; 293:2487-2495.
- Kim et al. - MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res*. 2010; 124(1-3):183-91.
- Klempan et al. - Profiling brain expression of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2009; 150B, 934–943.
- Kupfer et al. - Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 2012; 379:1045-55.
- Lee et al. - The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854.
- Lewis et al. - Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2015; 120:15–20.
- Lewitzka et al. - The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence—a narrative review. *International Journal of Bipolar Disorders*, 2015; 3:15.
- Liang et al. - Lithium inhibits Smad3/4 transactivation via increased CREB activity induced by enhanced PKA and AKT signaling. *Mol Cell Neurosci*. 2008; 37(3): 440–453.
- Lim et al. - Longitudinal neuroimaging and neuropsychological changes in bipolar disorder patients: review of the evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37:418–435.
- Lopez et al. - Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression. *Biol. Psychiatry*, 2007; 62:72-80.
- Lopez et al. - miR-1202: A Primate Specific and Brain Enriched miRNA Involved in Major Depression and Antidepressant Treatment. *Nat Med*. 2014B; 20(7): 764–768.
- Lopez et al. - Regulatory role of miRNAs in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 2014A; 17, 23–32.
- Maffioletti et al. - Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2014; 11;8:75.
- Manchia et al. - Genetic risk of suicidal behavior in bipolar spectrum disorder: analysis of 737 pedigrees. *Bipolar Disord*. 2013; 15: 496–506
- Manchon et al. - Benzodiazepine receptor and neurotransmitter studies in the brain of suicides. *Life Sci*. 1987; 41, 2623–2630.
- Mann - A current perspective of suicide and attempted suicide. *Ann Intern Med*, 2002; 136:302–311.

Marangell et al. - Prospective predictors of suicide and suicide attempts in 1,556 patients with bipolar disorders followed for up to 2 years *Bipolar Disorders* 2006; 8: 566–575.

McGowan et al. - Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*, 2009; 12:342–348.

Merali et al. - Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects. *Biol. Psychiatry*. 2006; 59, 594–602.

Merikangas et al. - Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2007; 64:543-52.

Miller et al. - MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(8):3125-30.

Miller, Wahlestedt - MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. *Brain Res*. 2010; 1338:89-99.115, 199–208.

Mitchell et al. – Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(30):10513-8.

Moreau et al. – Altered microRNA expression profiles in post-mortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2011; 69(2):188-93.

Moreno-Moya et al. - MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1516-23.

Muhleisen et al. - Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat Commun* 2014; 5: 3339.

Muller-Oerlinghausen et al. - The Impact of Lithium Long-Term Medication on Suicidal Behavior and Mortality of Bipolar Patients. *Archives of Suicide Research*, 2005; 9:307–319.

Neitzel - A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet*. 1986; 73(4):320-6.

Nibuya et al. - Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci*. 1995; 15, 7539–7547.

Niola et al. – Lithium-induced differential expression of SAT1 in suicide completers and controls is not correlated with polymorphisms in the promoter region of the gene. *Psychiatry Res*. 2014; 30;220(3):1167-8.

O'Connor et al. - Little things on which happiness depends: microRNAs as novel therapeutic targets for the treatment of anxiety and depression. *Molecular Psychiatry*, 2012; 17, 359–376.

Oldham - Borderline personality disorder and suicidality. *Am J Psychiatry*, 2006; 163:20–26.

- Omrani et al. - The Association of TGF- β 1 Codon 10 Polymorphism With Suicide Behavior. *Am J Med Genet Part B*, 2012; 159B:772–775.
- Pandey - Neurobiology of adult and teenage suicide. *Asian J Psychiatr*, 2011; 4:2-13.
- Pandey et al. - Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008; 11, 1047–1061.
- Pandey, Dwivedi - What can post-mortem studies tell us about the pathoetiology of suicide? *Future Neurol* 2010; 5(5):701–720.
- Paraskevopoulou et al. - DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(Web Server issue):W169-73.
- Park, et al. - Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15, 5473–5477.
- Perkins et al. - Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2005; 10(1):69-78.
- Peterson et al. - Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5:23, 1-10.
- Pompili et al. - Suicidal Behavior and Alcohol Abuse. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7(4): 1392–1431.
- Pritchard et al. - MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.*, 2012; 13(5):358-69.
- Reczko et al. - Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*, 2012.
- Rong et al. - MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(1):92-5.
- Roshanaei-Moghaddam et al. - Premature Mortality From General Medical Illnesses Among Persons With Bipolar Disorder: A Review. *Psychiatric Services*, 2009; 60:147–156.
- Roy - Family history of suicide. *Arch Gen Psychiatry.* 1983; 40(9):971-4.
- Ruvkun - Molecular Biology: Glimpses of a Tiny RNA World. *Science* 2001; 294, 797–799.
- Santarelli et al. - Upregulation of dicer and microRNA expression in the dorsolateral prefrontal Cortex Brodmann area 46 in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011; 69(2):180-7.
- Schaefer et al. - Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med.* 2007; 204: 1553–1558.

- Schratt et al. - A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439(7074):283-9.
- Sequeira et al. - Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Mol Psychiatry*, 2007; 12:640-655.
- Serafini et al. - The role of microRNAs in synaptic plasticity, major affective disorders and suicidal behavior. *Neuroscience Research*, 2013; 73,179–190.
- Severino et al. - Pharmacogenomics of bipolar disorder. *Pharmacogenomics*. 2013; 14(6):655-74.
- Smalheiser et al. - MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLoS One* 2012; 7(3):e33201.
- Squassina et al. - Differential effect of lithium on Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase expression in suicidal behavior. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16:2209-18.
- Stanley, Mann - Increased serotonin-2 binding sites in frontal cortex of suicide victims. *Lancet*,1983; 1:214-216.
- Steiner et al. - Immunological aspects in neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*. 2008; 42:151–7.
- Stocks et al. - Benzodiazepine binding sites in amygdala and hippocampus of depressed suicide victims. *J. Affect Disord*. 1990; 18, 11–15.
- Terao et al. - Effect of latitude on suicide rates in Japan. *Lancet*. 2002; 360(9348):1892.
- Tondo et al. - Suicidal behaviour in bipolar disorder: risk and prevention. *CNS. Drugs*, 2003; 17:491-511.
- Torres-Platas et al. - Astrocytic Hypertrophy in Anterior Cingulate White Matter of Depressed Suicides. *Neuropsychopharmacology*, 2011; 36, 2650–2658.
- Turecki – The molecular bases of the suicidal brain. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 5(12):802-16.
- Turecki et al. - The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends Neurosci*, 2012; 35:14–23.
- Van Rooij Eva - The Art of MicroRNA Research. *Circulation Research* 2011; 108:219-234.
- Vita et al. - Lithium in drinking water and suicide prevention: a review of the evidence. *International Clinical Psychopharmacology* 2015, 30:1–5.
- Vlachos et al. - DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, 2015, Vol. 43, Web Server issue Published online 14 May 2015

Wang - miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 2008; 14(6):1012-1017.

Weiner, Warren, Fiedorowicz – Cardiovascular morbidity and mortality in bipolar disorder. *Ann Clin Psychiatry*. 2011 Feb; 23(1):40-7.

Westrin - Stress systemalterations and mood disorders in suicidal patients. A review. *Biomed. Pharmacother*. 2000; 54, 142–145.

Wightman et al. - Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75:855– 862.

Windfuhr et al. - Suicide and mental illness: a clinical review of 15 years findings from the UK National Confidential Inquiry into suicide. *Br Med Bull*, 2011; 100:101–121.

Yi et al. - Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short Hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; 17, 3011–3016.

Zhu et al. - Normal [³H]flunitrazepam binding to GABAA receptors in the locus coeruleus in major depression and suicide. *Brain Res*. 2006; 1125, 138–146.

Ziats, Rennert – Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Mol Psychiatry*. 2014; 19(7):848-52.

Zubakov, et al. – MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int.J.LegalMed.*, 2010; 124, 217–226.

SITI INTERNET:

American foundation for suicide prevention, www.afsp.org

Douglas-Bell Canada Brain Bank, www.douglasbrainbank.ca

Gene Ontology, www.geneontology.org

Istituto Nazionale di Statistica, ISTAT, www.istat.it

MiRBase, www.mirbase.org

Nanostring nCounter, www.nanostring.com

WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit, WebGestalt, www.bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/

World Health Organization, WHO, www.who.int/en/