



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN
NEUROSCIENZE

XXII CICLO

Il microRNA-101 regola la Proteina Precursore del peptide β -Amiloide

Elisa Vilaro

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Dott. Francesca Ruberti

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

INDICE

INTRODUZIONE-----	pag. 5
Gli RNA non codificanti-----	pag. 5
RNA transfer e ribosomale-----	pag. 6
Editing dell'RNA-----	pag. 7
Piccoli RNA nucleolari-----	pag. 8
Lunghi RNA non codificanti-----	pag. 8
I microRNA-----	pag. 9
I microRNA-----	pag. 11
Biogenesi-----	pag. 11
Genomica-----	pag. 14
Meccanismo di azione -----	pag.18
Le proteine Argonata-----	pag. 21
Predizione dei target di microRNA-----	pag. 22
I microRNA nel sistema nervoso-----	pag. 23
MicroRNA e neurodegenerazione-----	pag. 26
Malattia di Alzheimer-----	pag. 28
Proteina App e sua regolazione-----	pag. 30
Infiammazione e malattia di Alzheimer-----	pag. 33
Malattia di Alzheimer e microRNA -----	pag. 35
SCOPO DELLA TESI-----	pag. 37
MATERIALI E METODI-----	pag. 38
Materiali-----	pag. 38
Tamponi-----	pag. 38
Terreni di coltura-----	pag. 40
Vettori di espressione lentivirali -----	pag. 41
Metodi -----	pag. 43
Digestione DNA con enzimi di restrizione e defosforilazione-----	pag. 43
Descrizione del costrutto per il clonaggio del miRNA-101 -----	pag. 43
Fosforilazione e appaiamento degli oligonucleotidi miR-101 -----	pag. 44
Reazione di ligazione dell'inserto nel vettore di DNA -----	pag. 44

Preparazione delle cellule batteriche competenti per elettroporazione -----	pag. 44
Trasformazione delle cellule batteriche -----	pag. 45
Preparazione del DNA plasmidico -----	pag. 45
Elettroforesi di DNA in gel di agarosio -----	pag. 45
Mutagenesi sito-specifica di DNA plasmidico -----	pag. 46
Vettori lentivirali -----	pag. 46
Coltura cellule 293T e trasfezione -----	pag. 47
Coltura di cellule PC12 e trasfezione -----	pag. 48
Saggi di luciferasi -----	pag. 49
Colture primarie di neuroni ippocampali di ratto e trattamenti -----	pag. 49
Estrazione proteine da cellule ippocampali e quantificazione -----	pag. 50
SDS-PAGE -----	pag. 50
Western blot -----	pag. 51
Isolamento e analisi fibrille di peptide β -amiloide -----	pag. 51
Estrazione RNA-----	pag. 52
RT-Q-PCR-----	pag. 52
Northern blot-----	pag. 53
Marcatura radioattiva della sonda-----	pag. 54
Trattamento di vetrini con polilisina -----	pag. 55
Saggio di Immunofluorescenza -----	pag. 55
Risorse web -----	pag. 55
RISULTATI-----	pag. 56
Il silenziamento di Argonata 2 riduce i livelli di proteina APP-----	pag. 56
APP è un potenziale target di microRNA-----	pag. 57
APP e miR-101 sono espressi in ippocampo con andamento antiparallelo---	pag. 58
miR-101 lega e regola negativamente il 3'UTR di APP-----	pag. 60
miR-101 modula la traduzione della proteina APP endogena-----	pag. 62
Il mediatore dell'inflammatione IL-1beta	
modula miR-101 influenzando i livelli di APP-----	pag. 64
DISCUSSIONE-----	pag. 66
BIBLIOGRAFIA -----	pag. 69

INTRODUZIONE

Gli RNA non codificanti

In una visuale classica l'RNA ricopre il ruolo fondamentale di mediatore del flusso dell'informazione genetica dal DNA al prodotto proteico finale, un quadro che, alla luce degli ultimi progressi nel campo della biologia molecolare finalizzati alla comprensione del sistema cellula, richiede delle profonde revisioni.

Storicamente, l'acido ribonucleico è stato caratterizzato e formalmente suddiviso in diverse classi sulla base delle differenti proprietà e funzioni: gli RNA messaggeri (mRNA) che vanno incontro al processo di traduzione ad opera dei ribosomi per la sintesi proteica; gli RNA ribosomali (rRNA) indispensabili sia per l'assemblaggio delle proteine ribosomali, funzione dunque strutturale, sia per il legame con l'RNA messaggero; gli RNA transfer (tRNA), coinvolti nel processo di sintesi proteica in quanto trasportano nel sito A del ribosoma gli amminoacidi da incorporare nella catena polipeptidica nascente. In realtà negli ultimi anni sono state identificate una serie di ulteriori funzioni biologiche dell'RNA, non solo in qualità di molecole strutturali e con azione catalitica, ma anche e soprattutto come regolatori dell'espressione genica nella maggior parte se non in tutti i processi cellulari, dal differenziamento e sviluppo, all'oncogenesi.

E' noto che l'incremento di sequenze non codificanti proteine nei genomi eucariotici emerge come funzione della complessità dello sviluppo (Mattick J.S. 2004), mentre il numero di geni e la lunghezza delle sequenze codificanti proteine rimane relativamente costante (Frith M.C. et al. 2005; Taft R.J. et al. 2007). Il genoma umano contiene pochi più geni codificanti proteine (Consortium 2004, Goodstadt L. & Ponting C.P. 2006) del genoma del verme nematode *Caenorhabditis elegans* (ConsortiumTCeS 1998), il quale ha appena 1000 cellule. Mentre parte di questa anomalia può essere spiegata dai maggiori livelli di splicing alternativo negli organismi più complessi, un processo che incrementa il numero e la diversità di forme proteiche, sta emergendo come l'espansione delle sequenze introniche ed intergeniche non codificanti proteine, forniscano una grande quantità di informazione regolatoria, principalmente veicolata dall'RNA (Taft R.J. et al. 2007).

Meno dell'1,5% del genoma dei mammiferi codifica proteine, circa il 5% è conservato (Waterson R.H. 2003) e recenti studi su larga scala hanno mostrato che la maggior parte del genoma è trascritta, in un complesso repertorio di trascritti sovrapposti, spesso da entrambi i filamenti del DNA (Carninci P. 2005; Cheng J. 2005; Frith M.c. 2005; Kapranov P. 2005;

Katayama S. 2005; Mattick J.S. & Makunin I.V. 2006). Una parte significativa di questi trascritti sono processati in piccoli e grandi RNA regolatori (riassunti in Mattick J.S. & Makunin I.V. 2006; Mattick J.S. & Makunin I.V. 2005) che agiscono mediante riconoscimento sequenza specifico di altri RNA o DNA per promuovere diversi programmi di sviluppo modulando la struttura di RNA, splicing e stabilità, trascrizione e traduzione, così come la struttura della cromatina (Feng J. 2006; Mattik J.S 2003; Mattik J.S 2001; Mattick JS, Gagen MJ. 2001; Sanchez-Elsner T, et al. 2006).

Numerose classi di RNA non codificanti (ncRNA) sono sovrarappresentate nel sistema nervoso centrale e periferico (Cao X. Et al 2006; Cheng L.C. et al. 2005; Davies W. Et al. 2005; Hsieh J, Gage FH. 2004, Kim J. Et al. 2004; Klein M.E. et al. 2005; Ravasi T. et al. 2006; Rogaev E.I. 2005; Rogelj B. et al. 2004); è noto anche che meccanismi epigenetici come l'editing dell'RNA e la modulazione della struttura della cromatina, anch'essa guidata dall'RNA (Bernstein E. et al. 2005; Mattick JS, Makunin IV. 2005.; Sanchez-Elsner T, et al. 2006.), sono fondamentali nello sviluppo neurale, nella funzionalità dei neuroni maturi (Cao X. Et al. 2006; Colvis C.M. et al. 2005; Hsieh J, Gage FH. 2004.), nella risposta adattativa (Alarcon J.M 2004; Levanon EY, et al 2004.), così come nelle disfunzioni del sistema nervoso (Berube N.G. et al 2005; Shiohama A, et al. 2003.; Taniura H. et al. 2006). Inoltre, geni con ampi introni sono fortemente associati con funzioni neurali, e sono sovrarappresentati tra i geni espressi nei tessuti del sistema nervoso (Siepel A. et al. 2005; Sironi M. et al. 2005; Taft R.J. 2007; Vinogradov A.E. 2006). Queste osservazioni suggeriscono che lo sviluppo del sistema nervoso, le funzioni mature, la plasticità e la vulnerabilità a patologie neurologiche sono inestricabilmente legate all'azione e alle potenziali perturbazioni dei sistemi regolatori mediati dall'RNA.

RNA transfer e ribosomale

In aggiunta ai loro noti ruoli in funzioni basilari della cellula come la traduzione, gli RNA transfer e ribosomale sono stati recentemente implicati in numerose, distinte e specializzate funzioni del cervello durante lo sviluppo e nella vita adulta, così come mostrato dagli effetti di mutazioni in queste due classi di ncRNA nel predisporre a numerose patologie del neurosviluppo, neurodegenerative e neuropsichiatriche (DiMauro S. 2004; DiMauro S. & Davidzon G. 2005; Fattal O. et al. 2006). Queste mutazioni colpiscono principalmente il genoma mitocondriale, dove i 2/3 delle mutazioni patologiche sono a carico dei tRNA che da soli costituiscono 1/10 dell'intero genoma dell'organello. In generale, mutazioni nei tRNA e rRNA possono causare varie patologie neurologiche, incluse l'oftalmoplegia esterna

progressiva cronica (CPEO), la sindrome Kearns-Sayre (KSS), MELAS (encefalopatia mitocondriale con sindromi ischemia-simili) e sindromi MERRF(epilessia mioclonale, miopatia mitocondriale, atassia cerebellare, demenza rara, neuropatia periferica e perdita di udito) (Melher M.F. & Mattick J.S 2007). I tRNA possono più raramente dare origine ad altri disordini neurologici, inclusa atrofia multisistemica, neuropatia ottica ereditaria di Leigh, e sordità neurosensoriale) (Melher M.F. & Mattick J.S 2007). La sindrome MELAS e altre malattie tRNA-mediate sono anche associate con malattie neuropsichiatriche come schizofrenia, psicosi, delirio, disordini della personalità, disordini depressivi e ansia (Fattal O. et al 2006).

Editing dell'RNA

L'editing dell'RNA è un meccanismo post trascrizionale dinamico e versatile per la modificazione delle basi, catalizzato da specifiche classi di enzimi che possono significativamente alterare le proprietà funzionali e i livelli di espressione di vari RNA codificanti proteine e non (Melher M.F. & Mattick J.S 2007). Nonostante varie forme di RNA editing siano state caratterizzate in tutti i metazoi, un notevole incremento dell'RNA editing ha avuto luogo durante l'evoluzione dei mammiferi, e la classe degli ominidi mostra i più alti livelli e le più complesse forme di modificazione dei singoli trascritti. La conversione dell'adenosina in inosina (A-I) catalizzata dalle Adenosina Deaminasi agenti sull'RNA (ADAR) è particolarmente attiva nel cervello, specialmente in trascritti codificanti proteine coinvolte nelle funzioni delle cellule nervose (Bass B.L.2002), come canali ionici a voltaggio dipendenti, recettori, molecole per la trasduzione intracellulare del segnale, molecole coinvolte nell'apoptosi, nell'arresto del ciclo cellulare e modulatori dell'integrità delle terminazioni presinaptiche (Morse D.P et al. 2002; Hoopengardner B. et al. 2003; Maas S. et al. 2003; Athanasiadis A. et al. 2004; Gelbard H.A 2004; Levanon E.Y. et al. 2004; Wang et al. 2004a; Valente & Nishikura, 2005). L'editing A-I è in grado di cambiare la capacità codificante degli mRNA (Bass B.L. 2002), modulare la scelta dei siti di splicing (Laurencikiene et al. 2006), diversificare microRNA e siti target (Blow et al. 2006).

Nei mammiferi le ADAR sono espresse differenzialmente durante l'organogenesi con ADAR3 ristretta al cervello e ADAR2 preferenzialmente espressa nel sistema nervoso (Chen et al. 2000; Bass B.L 2002). L'RNA editing mostra anche una attività differenziata nelle varie strutture ed aree del sistema nervoso centrale e un ruolo regolatorio essenziale durante la maturazione neuronale (Lai et al. 1997; Kohr et al. 1998; Bernard et al. 1999; Paupard et al. 2000). Mutanti ADAR mostrano complessi difetti nel comportamento in *C. elegans*,

drososila e in topo (Reenan, 2001; Tonkin et al. 2002); inoltre, anomalie nell'editing dell'RNA sono state implicate in un ampio spettro di disordini del sistema nervoso, incluse le malattie di Alzheimer e Huntington, sclerosi laterale amiotrofica, epilessia, schizofrenia, depressione, ataxia tipo I, e sindromi Prader-Willi e Angelman (riviste in Valente & Nishikura, 2005).

Piccoli RNA nucleolari

Un'altra importante forma di processamento post trascrizionale dell'RNA è mediato da una classe di RNA non codificanti definiti piccoli RNA nucleolari (small nucleolar RNA, snoRNA). Questi RNA sono lunghi da 60 a 300 nucleotidi e guidano la modificazione sito specifica di nucleotidi in RNA target mediante 2'-O-ribosio metilazione e pseudouridilazione, ad opera degli snoRNA box C/D e box H/ACA, rispettivamente (Bachellerie JP et al. 2002, Lestrade L, Weber MJ 2006; Meier UT. 2005). La maggior parte degli snoRNA noti sono coinvolti nella modificazione di RNA ribosomali e sono localizzati nel nucleolo, altri detti scaRNA guidano la modificazione degli RNA deputati allo splicing (snRNA) e sono localizzati nel citoplasma (Mattick 2007); molti sono implicati in processi come lo splicing alternativo, trascrizione, mantenimento e segregazione dei cromosomi e regolazione del ciclo cellulare (Mattick 2007). Nel topo sono stati identificati vari snoRNA specifici del cervello, la maggior parte appartenenti alla classe dei C/D box, i cui omologhi umani appaiono anch'essi espressi ad alti livelli nel sistema nervoso centrale (Mattick 2007), alcuni arricchiti in specifiche aree come l'ippocampo e l'amigdala (Mattick 2007), ed ancor più nel dettaglio con livelli differenti nelle diverse regioni quali il giro dentato e la regione CA1 dell'ippocampo .

Lunghi RNA non codificanti

Ci sono decine di migliaia di lunghi RNA non codificanti, poliadenilati e non, trascritti dal genoma dei mammiferi (Carninci et al. 2005; Cheng et al. 2005a; Kapranov et al. 2005; Engstrom et al. 2006), molti dei quali appaiono essere regolati durante lo sviluppo, sottoposti a splicing alternativo, inducibili in condizioni fisiologiche e risultano particolarmente abbondanti nel cervello (Inagaki et al. 2005; Ravasi et al. 2006). Un set di questi lunghi ncRNA viene definito macroRNA, trascritti da lunghe regioni non codificanti espresse in topo dette ENOR, molti di essi sono arricchiti nel cervello, presentano trascrizione dell'antisense, sono spesso loci ospiti di microRNA e snoRNA, e appaiono localizzati prevalentemente nel nucleo (Furono et al. 2006).

Molte classi di RNA non codificanti sono coinvolte nello sviluppo dei dendriti, trasporto e localizzazione degli mRNA, e sintesi proteica locale associata a forme di plasticità specifiche delle sinapsi, e accompagnano i cambiamenti a lungo termine della forza delle connessioni (Jin et al. 2004). Componente centrale di questi processi è una proteina che lega l'RNA, FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), la cui assenza causa ritardo mentale, epilessia, autismo e disordini legati all'ansia. FMRP è parte di un elaborato complesso ribonucleoproteico che include anche FXR1P/2P, la nucleolina, YB1/p50, Pura, Staufen, IMP1 e la chinesina 5, e gli RNA non codificanti BC1 e BC200, conservati nel topo e nell'uomo.

In *Drosophila*, lunghi ncRNA sono coinvolti in molti stadi dell'organogenesi e del differenziamento cellulare; mostrano una rapida evoluzione, sono espressi durante l'embriogenesi e sono estremamente specifici per il sistema nervoso centrale e periferico (Inagaki et al. 2005).

Nei mammiferi, lunghi ncRNA derivano anche da trascritti antisenso naturali (Katayama et al. 2005) molti dei quali sono abbondanti nel sistema nervoso, con profili di espressione definiti nello sviluppo e nelle diverse aree, e modulano l'espressione di geni coinvolti nella morfogenesi del cervello, nella proliferazione delle cellule staminali, risposta allo stress, polarità cellulare, funzioni del citoscheletro, sopravvivenza dei neuroni, maturazione e plasticità sinaptica (Korneev & O'Shea 2005).

Nella schizofrenia e in disordini bipolari, sono presenti loci di suscettibilità nel gene DISC1 (Disabled In Schizophrenia) e nell'RNA antisenso DISC2 (Millar et al. 2000, 2004). DISC1 è coinvolto nel trasporto intracellulare, polarità cellulare e migrazione neuronale; la mancanza di DISC1 durante lo sviluppo corticale può in parte contribuire alla patogenesi di queste eterogenee malattie neuropsichiatriche (Kamiya et al. 2005).

I microRNA

I microRNA sono piccole molecole di 18-22 nucleotidi di lunghezza che modulano la traduzione o la stabilità di RNA target (Zamore PD 2005). Nonostante la loro identificazione e descrizione sia relativamente recente, ai microRNA sono state attribuite funzioni che coinvolgono pressoché tutti i processi cellulari fisiologici e patologici; studi importanti si sono concentrati nel portare alla luce il ruolo dei microRNA nella funzione neuronale.

Il primo miRNA caratterizzato fu lin-4, identificato in *C. elegans* durante uno studio del controllo temporale dello sviluppo (Lee et al. 1993).

I mutanti con perdita di funzione di *lin-4* sono caratterizzati da un blocco nello sviluppo larvale e da un'incapacità di diverse linee cellulari di differenziare. Dall'altra parte una delezione della regione 3' non tradotta (UTR) del gene *lin-14* determina un fenotipo molto simile a quello appena descritto di *lin-4*. Sia il mutante in cui la funzione di *lin-4* è assente, sia quello con la delezione del 3'UTR di *lin-14* mostrano un'espressione molto alta della proteina *lin-14* dopo il primo stadio di sviluppo (L1). Nel 1993 Ambros e Ruvkum proposero che *lin-4* down-regolasse *lin-14* mediante l'interazione con il suo 3'UTR. La vera sorpresa arrivò quando attraverso la tecnica del chromosomal walking è stato clonato il gene *lin-4* di *C. elegans*. Il clone di *C. elegans* è stato quindi usato per isolare il gene da altre tre specie. Comparando la sequenza genica di *lin-4* di tutte e quattro le specie e attraverso esperimenti di mutagenesi sito specifica delle potenziali ORF (open reading frame) è stato dimostrato che *lin-4* non codifica per una proteina, bensì da origine ad un piccolo trascritto di 61 nucleotidi (nt) che viene processato in un secondo tempo in un RNA più corto di 22 nt di lunghezza (Lee et al, 1993).

Inoltre i laboratori di Ambros e Ruvkum trovarono che il 3'UTR del mRNA *lin-14* contiene siti multipli non perfettamente complementari al piccolo RNA *lin-4* (Wightman et al, 1993). Questi dati suggeriscono il meccanismo molecolare per la regolazione traduzionale di *lin-14*: il piccolo RNA *lin-4* si appaia in maniera imperfetta ai siti nel 3'UTR del mRNA *lin-14* per formare multipli RNA duplex che down-regolano la traduzione di *lin-14*.

Questa scoperta ha permesso di affermare che i miRNA sono in grado di controllare uno specifico stadio nello sviluppo del nematode, andando a down-regolare il gene *lin-14*, essenziale regolatore della divisione cellulare.

Per i sette anni successivi a questa scoperta, la genomica dei piccoli RNA regolatori è sembrata semplice, e non è stata presa in debita considerazione poiché non esistono ortologi di *lin-4* all'interno delle altre specie. Nel 2000 attraverso studi di genetica forward è stato identificato un secondo miRNA in *C. elegans*: il miRNA del gene *let-7*, gene con funzione analoga a quella di *lin-4*, anche se in grado di agire nella fase larvale tardiva di *C. elegans*: *let-7* riconosce sequenze presenti nel 3'UTR del mRNA *lin-41* e down-regola i livelli proteici di *Lin-41* (Reinhart et al., 2000). Il miRNA *let-7* è altamente conservato sia come sequenza che come pattern di espressione durante lo sviluppo di varie specie animali, presentando degli ortologi sia in *Drosophila melanogaster* che nell'uomo (Pasquinelli et al., 2000).

Questa osservazione ha suggerito l'ipotesi che i miRNA *lin-4* e *let-7* possono essere membri di una classe di piccoli RNA regolatori più ampia.

I microRNA

Genomica

I microRNA sono trascritti tipicamente dalla RNA polimerasi II e dotati di un cap e poliadenilati (Kim V.N. 2005). Alcuni microRNA sono prodotti individualmente da unità trascrizionali separate, ma la maggior parte dei miRNA sono codificati in cluster e trascritti come un'unica molecola precursore (Bartel D.P 2004). Uno studio condotto da Rodriguez e collaboratori nel 2004 ha messo in luce che nei mammiferi il 70% dei geni che codificano per i microRNA sono localizzati in introni di mRNA codificanti proteine o mRNA non codificanti, altri in esoni e altri ancora in zone intergeniche (Rodriguez et al., 2004). Quelli localizzati in introni o esoni possono avere un orientamento senso o antisenso rispetto ai loro geni ospiti: nel primo caso formeranno con questi ultimi una stessa unità trascrizionale, nel secondo caso ne formeranno una indipendente. Un piccolo numero di miRNA risiede nelle regioni non tradotte di RNA messaggeri codificanti proteine: questi trascritti possono quindi generare sia miRNA che proteine, ma non entrambi, da una singola molecola di RNA messaggero (Du et al., 2005).

Alcuni miRNA localizzati in introni condividono i loro elementi regolatori e il trascritto primario con il loro gene ospite. Per gli altri microRNA, presumibilmente trascritti dai loro propri promotori, pochi trascritti primari sono stati identificati; questi trascritti, chiamati pri-miRNA, sono in generale più lunghi dello struttura a forcina conservata, come si può desumere dall'allineamento dei microRNA e le sequenze espresse (EST) presenti nelle banche di dati biologici.

I geni di microRNA sono dispersi in tutti i cromosomi umani eccetto che nel cromosoma Y.

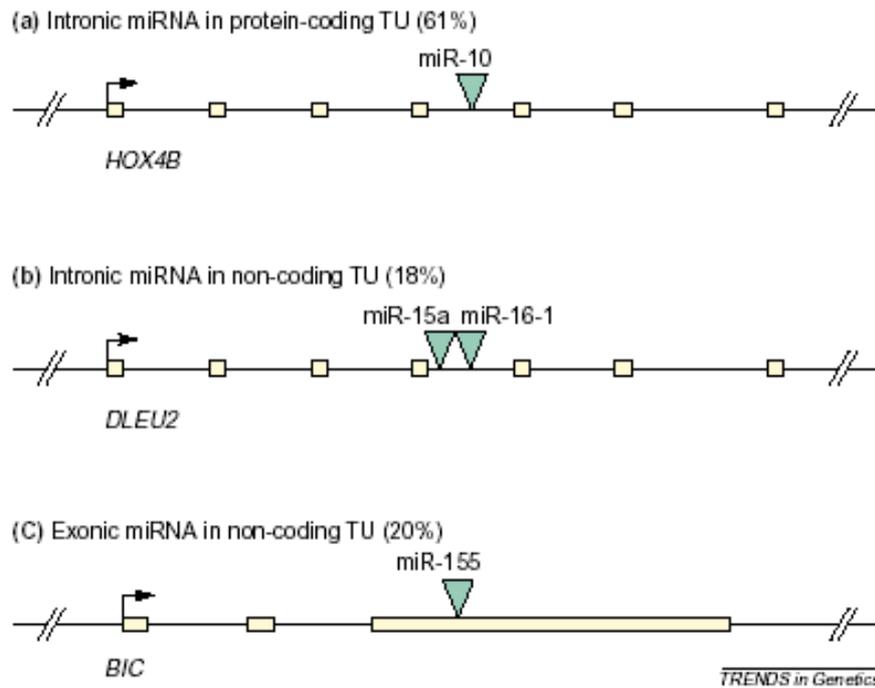


Figura 1. Genomica e struttura di geni di microRNA, TU= unità trascrizionali (Kim V.N. & Nam J. 2006)

Il più accurato catalogo di sequenze di miRNA, mantenuto dall'Istituto Sanger, è miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Tre principi generali sono utilizzati per il riconoscimento di un miRNA:

1- i miRNA sono contenuti all'interno di regioni che hanno una caratteristica struttura a forcina, in cui la sequenza del miRNA è all'interno di un braccio della forcina. La forcina deve essere la struttura con più bassa energia come predetto da programmi come "mfold" che include almeno 16pb dei 22 nucleotidi del miRNA e l'altro braccio della forcina, il quale non dovrebbe contenere grandi loops ne' grandi bulges asimmetrici.

2- i miRNA e la predetta struttura secondaria del precursore tendono ad essere altamente conservati in specie correlate.

3- il tipo di conservazione è molto caratteristico: estrema conservazione della sequenza delle braccia e minore conservazione del loop e delle regioni fiancheggianti (Chang TS. et al., 2007).

In miRBase, i miRNA vengono identificati con un nome, assegnato solamente dopo che una rivista scientifica abbia pubblicato la sequenza del nuovo microRNA scoperto, contenente un numero e basandosi sulla similarità di sequenza: per esempio, miRNA omologhi di diversi organismi ricevono lo stesso nome. In particolare, se due miRNA con uguale sequenza sono originati da loci genomici separati in un dato organismo gli viene assegnato un suffisso numerico (come miR-6-1 e miR-6-2 per *D. melanogaster*); mentre se la sequenza ha una o due basi diverse, il suffisso assegnato è una lettera (miR-181-a e miR-181-b); se uno studio

di clonaggio ha portato ad evidenziare due miRNA che derivano dallo stesso precursore, ognuno da ciascun braccio della forcina, quello meno rappresentato viene identificato con un asterisco (come il miR-56* in *C. elegans*). Quando sono identificati due differenti miRNA maturi che derivano dalle due braccia della stessa forcina ma di cui non si hanno informazioni per il prodotto predominante, il nome del miRNA contiene il suffisso 5p e 3p per indicare il braccio da cui deriva. Inoltre, sono fornite informazioni su localizzazione genomica, sequenze omologhe e possibili target dei microRNA con links letterari per maggiori informazioni (Griffith-Jones S. 2004; Griffith-Jones S. et al., 2007).

L'identificazione di microRNA dopo la scoperta dei primi rappresentanti della classe di molecole, si è basata sulla ricerca di sequenze omologhe, rivelando l'esistenza di numerosi ortologhi e paraloghi dei miRNA già noti (Pasquinelli et al. 2000; Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee and Ambros 2001). Un altro semplice approccio è stato quello di cercare nelle vicinanze di già noti geni di miRNA, altre strutture a forcina che possono rappresentare un cluster genomico (Lau et al. 2001; Aravin et al 2003; Ohler et al 2004). Questa strategia è importante perché alcuni dei geni di microRNA in più rapida evoluzione sono presenti come ripetizioni in tandem e in questi casi l'approccio di ricerca di omologia non è in grado di identificare sequenze andate incontro a rapida divergenza.

Approcci di identificazione di geni che non dipendono dall'omologia o dalla prossimità a geni noti sono stati sviluppati e applicati agli interi genomi, e si basano sulla ricerca di segmenti genomici conservati nelle regioni intergeniche che possono potenzialmente ripiegarsi in strutture a forcina. Il primo algoritmo fu MiRscan, il quale ha predetto con successo geni di microRNA in nematodi e vertebrati (Lim et al 2003a e 2003b), mentre miRseeker è stato sistematicamente applicato agli insetti (Lai et al. 2003). Miglioramento degli algoritmi di predizione hanno consentito di incrementare enormemente il numero di geni di microRNA predetti. Nuovi parametri introdotti nella ricerca sono stati la forte conservazione dei nucleotidi all'estremità 5' del microRNA maturo e la complementarità a sequenze conservate nelle regioni 3'UTR di RNA messaggeri (Xie et al. 2005).

I microRNA predetti per via bioinformatica devono essere validati per la loro espressione, e vari metodi sono stati sviluppati per questo scopo. La tecnica del Northern blot è la più largamente usata, nonostante possa non essere sufficientemente sensibile per i miRNA meno abbondanti e non riveli l'esatta sequenza del piccolo RNA. Lo sviluppo di sistemi di amplificazione basati sul legame di molecole adattatrici e successiva reazione a catena della polimerasi (PCR), clonaggio e sequenziamento ha permesso di validare piccoli RNA presenti in un numero molto più esiguo di copie.

Biogenesi

La trascrizione dei microRNA è mediata dalla RNA polimerasi II (Pol II) (Lee Y. et al. 2004; Cai X. Et al. 2004). Il trascritto primario contiene il cap di 7-metil-guanosina e una coda poliA, caratteristiche tipiche dei trascritti di Pol II. Ulteriore evidenza per una trascrizione Pol II dipendente è stata fornita dalla dimostrazione della sensibilità all' α -amanitina della trascrizione dei microRNA e dall'associazione fisica della RNA Pol II al promotore di microRNA (Lee Y. et al. 2004). Inoltre, studi successivi hanno messo in evidenza la presenza di elementi tipici per la Pol II, come sequenze TATA box, nei promotori di microRNA (Houbaviy H.B et al. 2005). Comunque non si può formalmente escludere la possibilità che pochi geni microRNA possano essere trascritti da altri tipi di RNA polimerasi; molti geni di microRNA del γ -erpesvirus 68 murino (MHV68) sono apparentemente trascritti dalla Pol III, indicando che alcuni microRNA virali si sono evoluti indipendentemente e possono essere generati attraverso meccanismi di biogenesi diversi (Pfeffer S. et al. 2005). La trascrizione Pol II dipendente permette un controllo spaziale e temporale dell'espressione dei microRNA in modo che uno specifico set di microRNA può essere espresso durante lo sviluppo e in specifiche condizioni in un certo tipo cellulare; ad esempio miR-1, un miRNA muscolo-specifico, può essere indotto dai fattori MyoD e Mef2 (Zhao Y. et al. 2005).

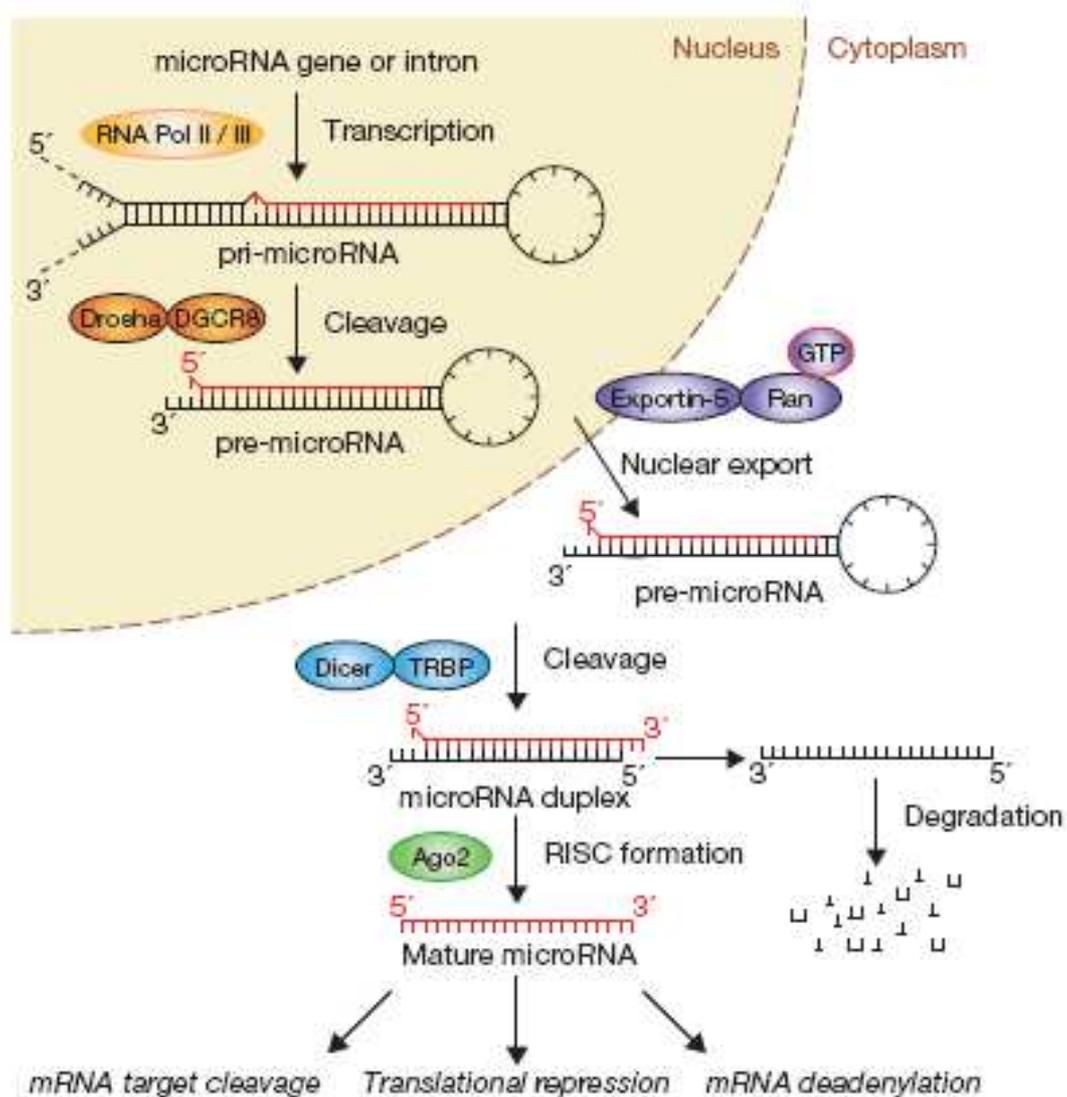


Figura 2. Biogenesi dei microRNA (da Winter J. Et al. 2009).

La trascrizione dei geni microRNA produce lunghi trascritti primari (pri-miRNA) che contengono strutture locali di ripiegamento a forcina. La struttura a forcina è tagliata dall'RNAsi III nucleare Drosha per rilasciare il precursore del microRNA (pre-miRNA) (Lee Y. et al. 2003). I frammenti fiancheggiati rimanenti si suppone vengano degradati nel nucleo, anche se il frammento al 3' può spesso essere trovato nelle banche dati di EST (Lee Y. et al. 2004). Drosha è una grande proteina di 160 kDa conservata tra gli animali ma non nelle piante. (Filippov et al. 2000). Drosha necessita un cofattore, DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) in umano, nota come Pasha in Drosophila e C. elegans (Landthaler M. et al 2004). Drosha e DGCR8 formano un ampio complesso di circa 650 kDa in uomo e 500 kDa in Drosophila, noto come complesso Microprocessor. DGCR8 contiene due domini di legame all'RNA doppio filamento (dsRBDs) e interagisce direttamente con lo

stelo e le regioni fiancheggianti a singolo filamento del pri-miRNA (Denli A.M. 2004; Han et al. 2006), il sito di taglio è precisamente un giro d'elica (11 paia di basi) di distanza dalle regioni fiancheggianti a singolo filamento.

L'efficienza del processamento dei pri-miRNA promosso da Drosha richiede: un'ansa terminale (≥ 10 nucleotidi) nella forcina; una regione "stem" che sia circa un giro d'elica più lunga dello stem risultante del pre-miRNA; un prolungamento 5' e 3' dell'RNA a singolo filamento alla base del futuro pre-miRNA (Du et al., 2005). Il pre-miRNA nascente ha quindi un terminale 5' fosfato e un 3' idrossilico, e si estende di due o tre nucleotidi a singolo filamento al 3'. Questi sono tutti elementi caratteristici del taglio promosso da RNasi di tipo III. Così il taglio di Drosha definisce o il 5' o il 3' del miRNA maturo.

Il taglio mediato dal Microprocessor non è l'unica via di produzione di pre-miRNA negli animali, un processo alternativo usa lo splicing del trascritto pri-miRNA per liberare introni che imitano perfettamente le caratteristiche strutturali di un pre-miRNA (Okamura K. et al. 2007; Ruby J.G. et al. 2007). Questi così detti mirtrons entrano quindi nella via di processamento dei microRNA senza passare per il Microprocessor, non sono comuni ma sono stati trovati in tutto il regno animale.

Poiché il successivo enzima di processamento si trova nel citoplasma, il prodotto di Drosha, il pre-miRNA, deve essere trasportato nel citosol; questa esportazione è mediata da uno dei recettori-trasportatori nucleari Ran dipendenti, l'Esportina 5 (Exp5) (Yi R. et al. 2003). Quando Exp5 è depleta mediante RNAi, i microRNA maturi diminuiscono ma i precursori non si accumulano nel nucleo; ciò suggerisce che i pre-miRNA siano relativamente instabili e anche che i pre-miRNA possano essere stabilizzati dal legame con Exp5. Exp5 riconosce il motivo a mini elica che consiste in uno stelo di almeno 14 paia di basi e un corto 3' protrudente (overhang) (Gwizdek C. et al. 2003).

Il secondo taglio, operato dalla RNase III citoplasmatica Dicer definisce l'altra estremità del microRNA maturo. Dicer è una proteina altamente conservata di circa 200 kDa e come Drosha si associa a un cofattore che lega l'RNA a doppio filamento: Loquacious interagisce con Dicer-1 in *Drosophila* e TRBP (HIV-1 TAR RNA-binding protein) lega Dicer umana (Chendrimada T.P. et al. 2005).

Il dominio Paz di Dicer interagisce col 3' overhang terminale e il sito di taglio è a circa due giri d'elica, 22 paia di basi, di distanza.

Il processamento dei microRNA nel citoplasma e l'assemblaggio del complesso effettore RISC (RNA Induced Silencing Complex) per l'attività dei microRNA sono mediati dall'RLC (RISC Loading Complex), un complesso multiproteico composto Dicer, TRBP,

PACT (Protein activator of PKR) e Ago2 (Arognuta 2) che media anche la funzione effettrice del RISC sugli mRNA target. TRBP e PACT non sono essenziali per il taglio del pre-miRNA mediato da Dicer, ma lo facilitano, con TRBP che stabilizza Dicer (Haase, A. D. et al. 2005; Lee, Y. et al. 2006; Chendrimada, T. P. et al 2005). La deplezione di TRBP e PACT riduce l'efficienza del silenziamento genico post-trascrizionale ed entrambe le proteine possono avere funzioni sovrapponibili nelle vie dei miRNA e dei siRNA (small interfering RNA). La ricostituzione in vitro del caricamento e attivazione del RISC si ottiene con le tre componenti Dicer, TRBP e Ago2 (Macrae, I. J., et al. 2008). La formazione dell'RLC umano inizia, indipendentemente dall'idrolisi di ATP, con l'assemblaggio di Dicer, TRBP e Ago2, e la forcina di RNA esportata si associa solo dopo la formazione di questo complesso ternario (Maniataki, E. & Mourelatos, 2005).

Per i microRNA che mostrano un elevato grado di complementarità lungo lo stelo della forcina, avviene un passaggio ulteriore di taglio endonucleolitico, prima del taglio mediato da Dicer: Ago2, con la sua attività di taglio detta slicer, taglia il braccio al 3' della forcina a metà, generando l'ac-pre-miRNA (Ago2-cleaved precursor miRNA) (Diederichs, S. & Haber, D. A. 2007). Dicer può processare efficientemente questo precursore come un pre-miRNA; questo passaggio mediato da Ago2 probabilmente facilita la successiva dissociazione del filamento e l'attivazione del RISC, ed implica quindi Ago2 come proteina attiva nella biogenesi dei microRNA. Dopo il taglio del substrato, Dicer e il suo cofattore (TRBP o PACT) si dissociano dalla doppia elica del microRNA.

Per formare un complesso RISC attivo, il doppio filamento deve essere separato in filamento guida, complementare all'RNA target, e filamento passeggero che viene successivamente degradato. Nonostante varie elicasi siano state collegate con la via dei microRNA, una elicasi universalmente responsabile della separazione del doppietto non è ancora stata identificata. Elicasi associate con l'attività o la formazione del RISC includono p68, p72, RNA elicasi A (RHA), RCK/p54, TNRC6B, Gemin3/4 e l'umana Mov10 o la sua ortologa Armitage (Tomari Y. et al. 2004; Meister G. et al. 2005; Chu C.Y. & Rana T.M.. 2006; Salzman D.W et al. 2007; Robb G.B. & Rana T.M.. 2007). La deplezione di RCK/p54 determina una diminuzione dell'RNA interference mediato da microRNA ma non da siRNA (Chu C.Y. & Rana T.M.. 2006), suggerendo che specifiche elicasi possano regolare i miRNA differenzialmente.

In principio, il doppietto del microRNA può dare origine a due differenti microRNA maturi, ma solo un filamento è di solito incorporato nel RISC e guida il complesso sugli mRNA target, mentre l'altro filamento viene degradato (Schwarz, D. S. et al. 2003). Questa

asimmetria funzionale dipende dalla stabilità termodinamica dell'appaiamento tra le basi delle due estremità del doppietto: il filamento con appaiamento meno stabile al 5' viene caricato nel RISC.

Riguardo l'emivita e la degradazione dei microRNA, poche informazioni sono attualmente disponibili, solo in *A. thaliana* è stata identificata una famiglia di esoribonucleasi che degrada i microRNA (Ramachandran, V. & Chen, X. 2008). I microRNA maturi sono generalmente stabili, come dimostrato dalla lunga persistenza della maggior parte dei microRNA dopo la deplezione degli enzimi di processamento dei microRNA (Gregory, R. I. et al. (2004).

Meccanismo di azione

All'interno del RISC, il microRNA agisce come un adattatore per legare e regolare specifici RNA target; a parte poche eccezioni fino ad oggi descritte, i siti di legame per i microRNA nei messaggeri degli animali, sono localizzati nella regione al 3' non tradotta e sono di solito presenti in più copie; la maggior parte dei microRNA animali si lega attraverso appaiamenti imperfetti ma con la caratteristica comune di un nucleo di legami tipo Watson-Crick dal nucleotide 2 al nucleotide 8 del miRNA, detto regione seed. Nelle piante invece, la maggior parte dei microRNA si lega in maniera perfettamente complementare a siti presenti anche nella regione codificante dell'mRNA target.

Il grado di complementarità miRNA-mRNA è stato considerato un determinante chiave del meccanismo regolatorio: la complementarità perfetta permette il taglio dell'mRNA catalizzato dalla proteina Argonata, mentre l'appaiamento solo parziale nella regione centrale esclude il taglio e promuove la repressione della traduzione del messaggero. Il meccanismo tramite cui RISC regola la traduzione è tutt'ora oggetto di attivo dibattito, poiché non è ancora stato chiarito in modo definitivo se il blocco avviene a livello dell'inizio della traduzione o nell'allungamento della catena polipeptidica nascente. L'inizio della traduzione prende il via con il legame al cap 5' terminale del fattore eIF4E (eucharyotic Inization Factor 4E) , una subunità del complesso eIF4F; questo complesso contiene anche eIF4a e eIF4G, l'interazione di eIF4G con un altro fattore di inizio, eIF3, recluta la subunità 40S del ribosoma sull'estremità 5', quindi il complesso di preinizio con la 40S lega la subunità 60S sul codone AUG per iniziare l'elongazione. eIF4G interagisce anche con PABP1 (Poly-A Binding Protein) che lega l'estremità 3' del messaggero, e la capacità di eIF4G di interagire simultaneamente con eIF4E e PABP1 di fatto circolarizza la molecola di mRNA; questa circolarizzazione incrementa l'efficienza della traduzione, anche se alcuni

RNA virali iniziano la traduzione senza fattori di inizio, o con un set molto ridotto grazie alla presenza di siti IRES (Internal Ribosome Entry Site).

L'osservazione che i microRNA e i loro target sono associati con i poliribosomi (Olsen PH, Ambros V. 1999; Petersen C.P. et al. 2006) e che la repressione avviene anche quando la traduzione è iniziata da un IRES (Petersen C.P. et al. 2006; Lytle J.R. et al. 2007) indurrebbero a concludere che i microRNA bloccano la traduzione in fasi post-inizio, ma studi sul meccanismo di repressione della traduzione mediato da microRNA, condotti in diversi laboratori, hanno prodotto risultati contrastanti.

Un criterio in base al quale è stata valutato l'effetto di microRNA sulla traduzione è se in seguito a centrifugazione in gradiente di densità, gli mRNA repressi cosedimentano con l'insieme di ribonucleoparticelle libere (repressione dell'inizio) o con i grandi polisomi (repressione dell'elongazione o terminazione); un secondo criterio è stato se gli mRNA repressi, con un IRES diventano resistenti alla repressione. Sulla base di questi criteri, alcuni studi hanno trovato evidenze a favore di una repressione dell'inizio della traduzione (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007; Wakiyama et al., 2007; Ding and Grosshans, 2009), altri per processi post-inizio (Seggerson et al., 2002; Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). I diversi risultati suggeriscono quindi che la repressione può avvenire sia nella fase di inizio che in fasi successive all'inizio di traduzione.

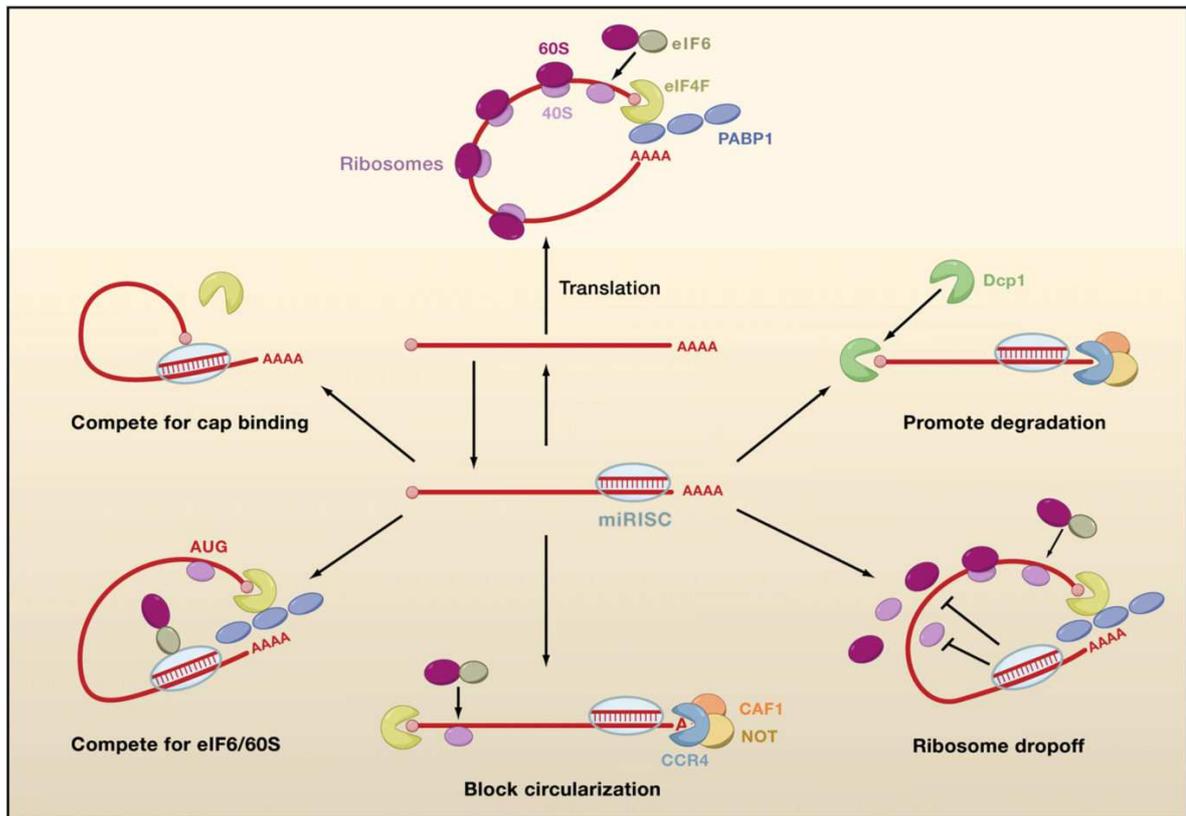


Figura 3. Possibili meccanismi di regolazione miRNA-mediata. L'mRNA non represso recluta i fattori di inizio e le subunità ribosomali e forma una struttura circolarizzata che promuove la traduzione (in alto). Quando RISC lega il messaggero, esso può reprimere l'inizio di traduzione nella fase di legame del cap (in alto a sinistra) o della subunità ribosomale 60S (in basso a sinistra). In alternativa, può indurre la deadenilazione dell'mRNA e quindi inibire la circolarizzazione (in basso). Può reprimere anche in fase post-inizio di traduzione inducendo un distacco prematuro del ribosoma (in basso a destra). Infine, può promuovere la degradazione dell'mRNA inducendo deadenilazione seguita da rimozione del cap (Carthew R.E. and Sontheimer E. J 2009).

I primi studi sui microRNA degli animali, indicarono che la repressione della traduzione non fosse accompagnata da destabilizzazione dell'RNA. Comunque, per alcune interazioni microRNA-target, c'è una significativa riduzione dell'abbondanza dell'mRNA dovuta ad un'aumentata degradazione (Bagga et al., 2005; Lim et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006). Questa aumentata degradazione non è dovuta a un taglio catalizzato da Ago, ma piuttosto a deadenilazione, rimozione del cap e digestione esonucleolitica dell'mRNA, e necessita Ago, GW182 e il macchinario cellulare di deadenilazione e rimozione del cap (Behm-Ansmant et al., 2006). Attualmente non è noto perché alcuni messaggeri sono degradati e altri no.

Altro effetto emerso negli ultimi anni è la possibilità che il legame di un microRNA attivi, piuttosto che reprimere, la traduzione del suo target. Vasudevan e colleghi nel 2007 hanno riportato che microRNA che reprimono la traduzione in cellule attivamente proliferanti, upregolano i loro target in cellule quiescenti ferme in G0/G1. I risultati indicano che la transizione da repressione ad attivazione in cellule in arresto del ciclo cellulare possa essere causata dall'associazione di Ago2 con altre proteine; essi trovano che Ago2 è associata con FXR1 (Fragile X associated Protein 1) solo in complessi ribonucleoproteici attivanti, ma non repressivi. Questo meccanismo va considerato come non universale in quanto in altri lavori è stata osservata una repressione miRNA-mediata in cellule bloccate in G1 (Li X, Carthew RW, 2005).

Le proteine Argonauta

Le proteine Argonauta sono state estesamente studiate in molti organismi diversi, inclusi *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* e vari mammiferi, e sta diventando sempre più evidente che sono protagonisti chiave in molti processi di silenziamento mediato dall'RNA, importanti per lo sviluppo, differenziamento cellulare e mantenimento della staminalità. Il numero di geni Argonauta è molto variabile tra specie, da uno in *S. pombe* a 27 in *C. elegans*; uomo e topo esprimono otto membri della famiglia Argonauta (Sasaki et al., 2003). Sulla base dell'omologia di sequenza, le proteine Argonauta dei mammiferi sono state divise nelle due sottofamiglie Ago e Piwi; i membri della famiglia Piwi sono filogeneticamente più simili a PIWI di *D. melanogaster*, nel genoma umano ne sono presenti 4, nel topo 3. Studi di espressione hanno dimostrato che la sottofamiglia Ago è espressa ubiquitariamente, mentre l'espressione della sottofamiglia Piwi sembra essere ristretta alle cellule della linea germinale ((Meister et al., 2004; Sasaki et al., 2003). Le proteine argonauta hanno un peso molecolare di circa 100 kDa e sono caratterizzate dai domini PAZ (piwi-argonaute-zwille) e PIWI (Cerutti, L. et al. 2000); studi strutturali hanno rivelato che il dominio PAZ forma uno specifico modulo di legame per i caratteristici 2 nucleotidi che protrudono al 3' di un prodotto di taglio di un'RNasi III come Dicer (Parker and Barford 2006). Studi di cristallografia a raggi X hanno trovato un terzo dominio funzionale importante chiamato dominio MID (Parker et al., 2005; Yuan et al., 2005), che lega specificamente il 5' fosfato di piccoli RNA alla proteina Argonauta. Il ripiegamento del dominio PIWI invece è simile a quello di un'RNasi H, con una triade catalitica (Rivas et al., 2005; Song et al., 2004). Ago2 è l'unica proteina Ago con attività endonucleolitica (Meister G. et al. 2004), la reazione di taglio richiede ioni Mg^{2+} , è ATP-indipendente e libera un'estremità 5' fosfato e un 3'

idrossilico (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). In *Drosophila*, Ago1 interagisce direttamente con GW182, una proteina con dominio di legame all'RNA che recluta il complesso CCR:NOT sull'mRNA (Behm-Ansmant et al., 2006), uno dei maggiori complessi di deadenilasi di *Drosophila*. GW182 appartiene ad una famiglia di proteine conservate che ha tre paraloghi nei mammiferi (Behm-Ansmant et al., 2006), in uomo sono chiamati TNRC6A(GW182), 6B e 6C; 6A e 6B interagiscono con membri della famiglia Argonata e sono quindi potenzialmente coinvolti nella funzione dei microRNA in cellule di mammifero (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a; Meister et al., 2005).

Studi di localizzazione hanno rivelato che le proteine Ago sono arricchite in distinti foci citoplasmatici e colocalizzano con Dcp1, LSm4 e GW182, identificando quindi Ago come proteine dei corpi P citoplasmatici (P bodies) (Liu et al., 2005b; Sen and Blau, 2005). I P bodies sono siti cellulari di turnover degli RNA, contenenti enzimi di rimozione del cap e deadenilazione, ed è stato proposto che le proteine Ago possano identificare gli mRNA target tramite la complementarità di sequenza col microRNA legato e indirizzare questi target ai P bodies per determinarne la degradazione. Poiché Ago può legare RNA messaggeri e inibirne la traduzione senza alterarne la stabilità, è stata formulata un'altra ipotesi secondo cui Ago sequestrerebbe l'mRNA portandolo nei P bodies e lo sottrarrebbe al macchinario della traduzione, eventualmente anche in maniera reversibile. Altri recenti lavori hanno evidenziato che le proteine Ago non localizzano solo nei P bodies, ma anche negli SG (Stress Granules) (Leung et al., 2006). Gli SG si formano quando la cellula sperimenta un qualche tipo di stress, ad esempio da calore o ossidativo, ma non ne è chiara la funzione. Una possibile spiegazione potrebbe essere che in condizioni normali, mRNA richiesti in condizioni di stress sono repressi da Ago e accumulati nei P bodies, in condizioni di stress questi messaggeri verrebbero rilasciati e tradotti mentre altre ribonucleoparticelle si accumulerebbero negli SG.

Predizione dei target di microRNA

La funzione di un microRNA è definibile in funzione dei suoi geni target e dell'effetto che ha su essi. Negli animali, il sito di legame del miRNA è di solito collocato nella regione 3'UTR, già nota come determinante importante nella regolazione degli mRNA. La predizione degli RNA bersaglio di microRNA è complessa a causa della piccola, e discontinua, complementarità di basi tra due molecole, che non è quindi sufficiente per una predizione accurata.

Malgrado queste difficoltà, negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi approcci bioinformatici volti ad identificare gli mRNA bersaglio dei miRNA (Sethupathy et al., 2006); molti di questi strumenti sono anche disponibili in rete. In generale, gli algoritmi di predizione utilizzano alcuni dei seguenti criteri per identificare e classificare i più probabili mRNA bersaglio: (a) complementarietà tra la sequenza seed del miRNA e il 3'UTR dell'mRNA bersaglio; (b) stabilità complessiva del duplex miRNA:mRNA putativo; (c) conservazione del sito di complementarietà del miRNA tra le specie strettamente correlate; (d) siti multipli di legame per un singolo miRNA nel 3'UTR bersaglio; (e) una struttura secondaria che renda accessibile nel mRNA il legame del miRNA a livello del sito predetto (Chang and Mendell, 2007). Questi programmi sono in grado di predire centinaia di mRNA bersaglio per ciascun miRNA e si stima che il 30-90% degli mRNA umani siano regolati da miRNA. Tuttavia la sensibilità e specificità di questi metodi non è ancora del tutto chiara. In merito a ciò, Sethupathy e collaboratori hanno evidenziato che un singolo programma non è sufficiente a predire tutti i possibili mRNA bersagli in maniera appropriata, ma neanche più predizioni di diversi algoritmi sono in grado di produrre una lista esaustiva di probabili mRNA bersaglio senza ottenere dei falsi positivi (Sethupathy et al., 2006).

I microRNA nel sistema nervoso

Circa il 70% dei miRNA individuabili sperimentalmente sono espressi nel cervello e alcuni studi suggeriscono che i miRNA siano intimamente coinvolti nella funzione sinaptica e in segnali specifici durante la formazione della memoria. Esempi di miRNA principalmente espressi nel sistema nervoso centrale sono i miR-138 e miR-124 (Fiore et al., 2007), altri miRNA sono espressi in specifici tipi cellulari del SN come i miR-26 e miR-29 (Fiore et al., 2007), espressi in maniera predominante negli astrociti. Esempi, invece di miRNA espressi durante un preciso stadio di sviluppo sono i miR-17 (Cao et al., 2006), miR-92a e miR-92b (Fiore et al., 2007) che si osservano in progenitori neuronali ma non nei neuroni differenziati, e il miR-130b (Cao et al., 2006) la cui espressione aumenta durante lo sviluppo embrionale raggiungendo il plateau alla nascita.

Proprio il miR-124, che in modelli murini risulta essere il più abbondante, dimostra un'espressione specifica durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Quando il miR-124 viene sovraespresso in cellule HeLa esso è in grado di down-regolare un gran numero di trascritti non neuronali conferendo un profilo di espressione neuronale a questa linea cellulare (Conaco et al., 2006). Esperimenti in vivo, hanno dimostrato che il miR-124 è necessario per il mantenimento dell'identità neuronale (Conaco et al., 2006; Visvanathan et

al., 2007). L'inibizione funzionale del miR-124 è stata ottenuta con i cosiddetti "antagomiRs", oligonucleotidi modificati complementari alla sequenza del miR (Orom et al., 2006). Attraverso questi esperimenti sono stati scoperti due pathways anti-neuronali regolati dal miR-124. Infatti, in primo luogo il miR-124 antagonizza il fattore trascrizionale NRSF/REST (neuronal restricted silencing factor/RE-1 silencing transcription factor), un repressore globale della trascrizione di geni neuronali in un tessuto non-neuronale. La down regolazione di REST durante la transizione di cellule neuronali da progenitori a neuroni postmitotici porta ad un aumento dei livelli di espressione del miR-124. L'espressione del miR-124 provoca la degradazione di trascritti non-neuronali, incluso la fosfatasi SCP1, un noto fattore anti-neurale (Conaco et al., 2006; Visvanathan et al., 2007). Un secondo mRNA bersaglio del miR-124 è PTBP1, un repressore globale dello splicing alternativo neurone-specifico in cellule non neuronali. È stato visto che la riduzione dell'espressione di PTBP1 coincide con l'aumento dell'espressione dell'omologo PTBP2, anch'esso specifico del sistema nervoso (Makeyev et al., 2007). PTBP2 è un regolatore dello splicing necessario per l'induzione di un pattern di splicing alternativo specifico del sistema nervoso centrale. Durante il differenziamento neuronale il miR-124 riduce i livelli di PTBP1 portando all'accumulo del mRNA di PTBP2 e all'aumento della proteina PTBP2. Questo evento porta ad una transizione specifica da un pattern di tipo non neuronale ad uno neuronale. Così il miR-124 è in grado di indurre e mantenere l'identità neuronale sopprimendo i livelli di espressione di due dei maggiori fattori anti-neurali (Fiore et al., 2007).

Molti altri miRNA sono specificamente trascritti in cellule cerebrali embrionali in *D. melanogaster*, inclusi miR-315, miR-92a e miR-7, e in mammifero (Mehler and Mattick, 2007).

I miRNA possono quindi contribuire notevolmente all'alto grado di diversità cellulare riscontrato nel cervello di organismi superiori, e regolare gli aspetti generali di sviluppo del sistema nervoso e i meccanismi cellulari che sottointendono all'alto grado di sviluppo delle funzioni cognitive (Fiore et al., 2007).

Nel sistema nervoso maturo, i miRNA hanno un ruolo come regolatori della plasticità sinaptica, delle modificazioni morfologiche e funzionali che si verificano alle sinapsi, e che sono alla base delle funzioni cognitive più importanti come l'apprendimento e la memoria. Un meccanismo di regolazione della plasticità sinaptica è rappresentato dalla sintesi proteica dendritica, attraverso la quale la stimolazione sinaptica attiva la traduzione locale di mRNA immagazzinati nelle sinapsi. Questo processo può spiegare i cambiamenti specifici che avvengono alle sinapsi quando quest'ultime sono sottoposte a modificazioni a lungo termine

(Fiore et al., 2007). Studi recenti mettono in luce la relazione tra i miRNA, la sintesi di proteine dendritiche e la plasticità sinaptica.

L'interazione genetica e biochimica del regolatore della sinaptogenesi, fragile-X mental retardation protein (FMRP), con Ago1 e Dicer è stata dimostrata in *D. melanogaster* (Jim et al., 2004).

FMRP è una proteina che lega gli mRNA e che risulta mutata nella sindrome X-Fragile, una delle forme più comuni di ritardo mentale. La malattia X-Fragile è caratterizzata da anomalie nello sviluppo strutturale delle spine dendritiche. È stato evidenziato che FMRP agisce come repressore traduzionale di alcuni mRNA dendritici. Quindi è stato suggerito che la malattia dell'X-Fragile sia causata dalla disregolazione dell'espressione degli mRNA bersaglio di FMRP. La localizzazione di FMRP e alcuni componenti del RISC nel compartimento somatodendritico, suggerisce la possibilità che FMRP possa svolgere il suo ruolo reclutando componenti del pathway dei miRNA (Lugli et al., 2005). Comunque, non è chiaro se FMRP interagisca direttamente con i miRNA o se FMRP sia necessaria per il controllo miRNA-mediato sull'espressione genica.

L'importanza dei componenti del complesso RISC alle sinapsi per stabilire alcune forme di memoria a lungo termine in *D. melanogaster* è stata recentemente evidenziata da Ashraf e collaboratori (Ashraf et al., 2006). Gli autori mostrano che Armitage, un componente del RISC, e un reporter fluorescente della proteina chinasi II α -calcio/calmodulina dipendente (α -CamKII) colocalizzano alle sinapsi di *D. melanogaster*. L'aumentata espressione del reporter α -CamKII nei cervelli in cui sono stati deleti dicer, armitage e aubergine, tutti componenti del RISC, suggerisce che questo mRNA è regolato dal meccanismo di traduzione mediato da RISC. Come ulteriore dimostrazione gli autori osservano che l'attività neurale induce la degradazione proteosoma-dipendente di Armitage portando all'aumento di una traduzione locale di α -CamKII e della plasticità sinaptica (Ashraf et al., 2006).

Altri studi hanno permesso di collegare la funzione dei miRNA alla plasticità sinaptica in neuroni di mammifero. Schratt e collaboratori trovano che il miR-134 inibisce la traduzione del mRNA che codifica per la proteina Lim chinasi 1 (Limk1), che controlla lo sviluppo delle spine dendritiche (Schratt et al., 2006). Le spine dendritiche sono protusioni specializzate dei dendriti neuronali dove molte sinapsi eccitatorie originano, e le loro dimensioni sono fortemente correlate con l'attività delle sinapsi. I trascritti di Limk1 e del miR-134 colocalizzano. La sovraespressione del miR-134 causa una diminuzione delle spine dendritiche e al contrario la sua deplezione porta ad un aumento del loro volume. Il 3'UTR del miRNA codificante per Limk1 contiene siti di legame per il miR-134. La

sovraespressione di un gene reporter codificante per la luciferasi fuso al 3'UTR del mRNA di *Limk1* diminuisce con la sovraespressione del miR-134 e aumenta con la sua deplezione. La deplezione del miR-134 aumenta anche l'espressione del trascritto endogeno di *Limk1*. Infine, i difetti nelle dimensioni delle spine dendritiche indotti dalla sovraespressione del miR-134 sono parzialmente recuperati attraverso la co-espressione di un mRNA di *Limk1* in cui i siti di legame per il miR-134 sono stati mutati.

In analogia agli studi in *D. melanogaster* anche in questo processo l'attivazione neuronale elimina la repressione traduzionale mediata dal miRNA. Infatti grazie al rilascio del fattore BDNF in risposta alla stimolazione sinaptica è eliminata l'inibizione traduzionale promossa dal miR-134 sull'espressione di *Limk1* (Fiore et al., 2007).

La regolazione attività-dipendente dell'espressione dei miRNA in neuroni maturi rappresenta un ulteriore livello di regolazione. L'espressione del miR-132 è controllata dal fattore trascrizionale CREB (proteina legante l'elemento responsivo al cAMP). Diversi esperimenti hanno rivelato che il miR-132 è necessario per la neuritogenesi, il gradino fondamentale del processo di crescita che precede la formazione delle connessioni sinaptiche. Il miR-132 esercita il suo effetto inibendo la proteina attivante la GTPase, p250GAP, un regolatore negativo della crescita neuritica (Vo et al., 2005). Recentemente è stato dimostrato che il miR-132 è indotto rapidamente dall'attività neuronale e, downregolando l'espressione di p250GAP, induce la crescita dendritica in colture ippocampali (Wayman G.A. et al., 2008).

Un altro microRNA correlato con la morfogenesi delle spine dendritiche è il microRNA-138, un microRNA notevolmente arricchito nel cervello e localizzato a livello dei dendriti. È stato dimostrato che miR.138 inibisce la sintesi di APT1 (Acil Protein Tioesterasi 1) (Siegel G. et al. 2009), un enzima che regola lo stato di palmitoilazione di proteine note per la loro importanza a livello delle spine, inclusa la subunità $\alpha 13$ delle proteine G. L'inibizione di miR-138 causa un allargamento delle spine dendritiche.

MicroRNA e neurodegenerazione

Il termine neurodegenerazione viene usato per riferirsi a diversi fenomeni associati a malattie che colpiscono il sistema nervoso. Durante il normale sviluppo cerebrale, un gran numero di cellule nervose muore, ma molte malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una degenerazione patologica neuronale e o muscolare. Questi fenomeni che coinvolgono la morte di cellule nervose sono stati riprodotti sia in modelli animali che in colture cellulari e grazie a ciò sono state studiate malattie quali l'Alzheimer, il Parkinson.

I miRNA sono implicati in numerose condizioni patologiche del SNC, anche se un legame diretto tra questi piccoli RNA e lo sviluppo di patologie è stato accertato solo in alcuni casi (Nelson et al., 2007).

Recentemente, un interessante meccanismo che coinvolge i miRNA in malattie umane è emerso da studi su polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP). Le sequenze varianti di un gene candidato sul cromosoma 13q31.1, chiamato SLITRK1 (Slit and Trk-like 1), sono state identificate in pazienti affetti dalla sindrome di Tourette (TS), una malattia neurologica che si manifesta con un comportamento anormale ed è caratterizzata da tic motori e vocali. La variante TS chiamata var321 è localizzata nel 3'UTR del mRNA di SLITRK1, nel sito di legame per il miR-189 (Abelson et al., 2005). La mutazione coinvolge l'interazione del mRNA di SLITRK1 e il miR-189 e determina una stringente repressione dell'espressione di SLITRK1.

I meccanismi biochimici che sono alla base della sindrome dell'X-fragile sono già stati discussi. Studi recenti in *D. melanogaster* e mammifero indicano che FMRP e i miRNA cooperano nella repressione dell'espressione degli mRNA dendritici associando i miRNA all'insorgenza e allo sviluppo della malattia.

Anche la patologia di Huntington, come molte atassie spino-cerebrali, è una malattia neurodegenerativa causata dalla presenza anormale di più copie della tripletta CAG presente in copia singola nei soggetti sani. È stato dimostrato che l'up-regolazione del miRNA bantam modula la degenerazione indotta dalla proteina poly-Q Ataxin-3 (Bilen et al., 2006). Inoltre, mutazioni nell'enzima Dicer aumentano la tossicità del polyQ in *D. melanogaster* e cellule HeLa, suggerendo un ruolo neuroprotettivo dei miRNA (Bilen et al., 2006). In un altro studio si è evidenziato che l'ablazione di Dicer in cellule del Purkinje porta quest'ultime alla morte. La mancanza di Dicer è stata associata alla progressiva perdita di miRNA seguita da neurodegenerazione e morte, indicando un coinvolgimento dei miRNA nelle neurodegenerazione cerebellare (Schaefer et al., 2007).

Recentemente diversi studi suggeriscono un ruolo dei miRNA nelle malattie degenerative come Parkinson e Alzheimer. In particolare, una riduzione dell'espressione del miR-133b è stata osservata nei neuroni dopaminergici di cervelli di individui affetti dalla malattia di Parkinson rispetto ad individui normali. Dall'altra parte, il miR-133b regola negativamente la maturazione dei neuroni dopaminergici poiché l'inibizione e la sovraespressione del miR-133b determina rispettivamente un aumento o una diminuzione del numero di neuroni dopaminergici in coltura. Sebbene queste informazioni siano al momento contraddittorie

sollecitano ad analizzare in dettaglio gli mRNA bersaglio regolati dal miR-133b e a studiare il meccanismo d'azione nel contesto dei neuroni dopaminergici.

La malattia di Alzheimer

Nel 1906, Alois Alzheimer descrisse in occasione di un congresso di psichiatri del sud-ovest della Germania, gli aspetti clinici e neuropatologici di un suo caso, Auguste D., morta all'età di 55 anni e affetta da demenza; nella sua breve descrizione egli discusse gli aspetti clinici e patologici osservati, inclusa la presenza di placche e grovigli nel suo cervello (Alzheimer, 1907). Alzheimer non fu il primo a descrivere gli aspetti clinici della malattia ne' il primo a descrivere le placche (Redlich, 1898), ma sembra sia stato il primo a descrivere i grovigli e prese il suo nome in quanto fu il primo a descriverla come una malattia ben distinta da altre forme di demenza presenile. Purtroppo non abbiamo nessuna informazione riguardo la famiglia di Auguste D., per cui non sappiamo se ella fosse affetta da una forma autosomica dominante della patologia. I primi casi autosomici dominanti di malattia di Alzheimer (AD) furono descritti da Schottky (1932), Van Bogaert and Maert (1940), and Essen-Moller (1946). La fondazione della Alzheimer's Association negli Stati Uniti nel 1979 e successivamente in altri paesi, ha incrementato notevolmente i finanziamenti della ricerca sulla patologia.

Oggi possiamo dire che l'AD è la forma più comune di malattia neurodegenerativa, e una delle malattie più comuni nel mondo industrializzato.

L'analisi immunoistochimica post mortem dei cervelli affetti da AD ha evidenziato la perdita di sinapsi, diminuzione di corpi cellulari neuronali e la presenza di placche senili extracellulari e di grovigli neurofibrillari o NFT (neurofibrillary tangles) intracellulari. La corteccia entorinale e l'ippocampo sono le prime aree del cervello che sono colpite dalle lesioni tipiche della patologia, successivamente, i lobi parietali e temporale vanno incontro a neurodegenerazione.

I grovigli neurofibrillari, sono costituiti da filamenti proteici spiraliformi appaiati (paired, helically wound protein filaments o PHF) situati nel citoplasma dei corpi cellulari, dei dendriti e degli assoni dei neuroni. La proteina più abbondante negli NFT è Tau, che funzionalmente è legata al citoscheletro ed è coinvolta nel trasporto assonale. All'interno degli NFT Tau è presente principalmente in forma iperfosforilata (Selkoe 2004).

Le placche sono composte principalmente dal peptide β -amiloide o $A\beta$ (amyloid beta). Le placche neuritiche sono forme caratteristiche di placche amiloidi nelle quali il nucleo amiloide fibrillare è strettamente associato a dendriti ed assoni distrofici, alcuni dei quali contengono PHF, e da cellule microgliali attivate da astrociti. Le placche diffuse sono

definite dalla presenza di depositi di peptide A β non fibrillare, comprendenti forme amorphe del peptide, soprattutto granulari e prefibrillari, che al contrario delle placche senili e neuritiche sono reattive agli anticorpi ma non ai composti chimici che riconoscono le strutture fibrillari (Selkoe 2004).

Geneticamente l'AD è eterogenea e mostra eredità complessa. Rare forme precoci autosomiche dominanti della malattia sono causate da mutazioni in tre geni, tutti riguardanti la produzione del peptide β -amiloide (A β), principale componente delle placche senili. L'A β viene generata a partire dalla proteina precursore dell'amiloide (APP), una proteina transmembrana di tipo 1, da una serie di tagli operati da due enzimi: β -secretase e γ -secretasi (De Strooper et al. 1998; Wolfe et al 1999; Vasser et al. 1999). Il taglio mediato da un altro enzima, l' α -secretasi, genera invece un prodotto non tossico o addirittura neurotrofico. L'A β prodotta puo variare nella lunghezza a seconda del sito di taglio, la forma A β 42 ha una maggiore propensione a formare gli aggregati fibrillari riscontrabili nel cervello di soggetti AD (Iwatsubo T. et al. 1994), e si ipotizza che sia quindi la forma più patogena, paragonata alla forma più comune ma meno prona alla fibrillogenesi A β 40.

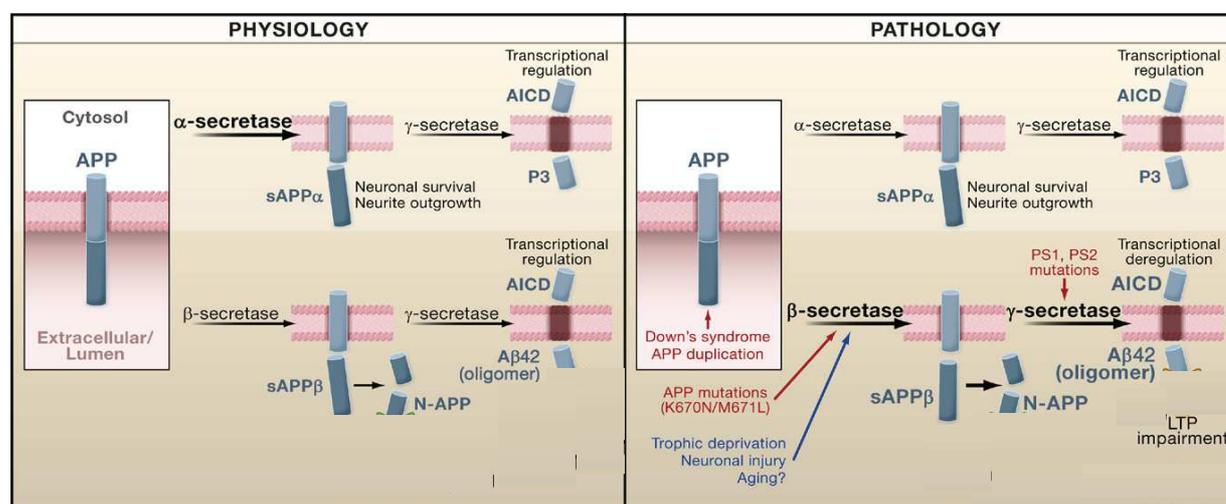


Figura 4. Processamento di APP in fisiologia e patologia (adattata da Kim & Tsai 2009).

Un ruolo per il processamento di APP nella patogenesi dell'AD è supportato da osservazioni fatte su pazienti con malattia di Alzheimer familiare (FAD), forma rara ma aggressiva di AD: tutte le mutazioni che causano AD precoce (60-65 anni di età) sono localizzate nel gene di APP o nei geni che codificano le proteine del nucleo catalitico del complesso γ -secretasi, presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), con l'effetto finale di incrementare un

processamento di tipo β e/o la produzione di A β 42 (Price et al., 1998). Forme familiari di AD sono determinate anche dall'aumento dell'espressione dell'APP. Individui con sindrome di Down, che hanno una copia extra del gene di APP sul cromosoma 21 soprannumerario, sviluppano demenza che appare essere identica alla patologia di Alzheimer (Price et al., 1998). La duplicazione del gene APP è stata evidenziata in 5 famiglie con AD e angiopatia amiloidea. In queste famiglie i segmenti duplicati del cromosoma 21 hanno dimensioni di 0,58-6,37 Mb e comprendono il gene di APP e solamente altri 4 geni (Rovelet- Lécru et al. 2006). Inoltre, polimorfismi nel promotore di APP sono associati ad AD (Theuns 2006).

La suscettibilità alla patologia di Alzheimer in forma tardiva mostra un'ereditarietà meno ovvia se non assente, viene definita sporadica ed è possibile che sia dovuta ad una serie di fattori di rischio comuni a carico di diversi geni. Il numero totale di geni che costituiscono fattore di rischio per AD e la loro precisa identità non sono chiari, ma sembra che la loro combinazione possa avere effetti sulla predisposizione alla malattia e sull'età della sua manifestazione (Gatz M. et al 2006). Nonostante siano stati condotti molti lavori alla ricerca di altri geni candidati come potenziali fattori di rischio per AD, solo il polimorfismo per l'allele ϵ 4 del gene dell'apolipoproteina E (APOE) è stato dimostrato influenzare consistentemente il rischio di sviluppare la malattia e l'età della comparsa (Strittmatter W.J et al. 1993; Bertram L. et al. 2007).

Proteina App e sua regolazione

La funzione cruciale di APP rimane tuttora non chiara, nonostante le siano stati attribuiti una serie di ruoli fisiologici; diversi domini della proteina sono stati caratterizzati per l'azione di legame di metalli (rame e zinco), interazione con componenti della matrice cellulare (eparina, collagene e laminina), domini con azione neurotrofica, di adesione, di inibitori di proteasi (Thinakaran G. & Koo E.H. 2008).

Il precursore del peptide β -amiloide è espresso in vari tessuti, con i livelli più alti nelle cellule del sistema nervoso centrale (Goedert M. 1987); la sua espressione può essere indotta da fattori di crescita e citochine (Lahiri D.K. & Nall C. 1995) e in condizione di stress (Dewji N.N. et al. 1995). La produzione di APP è sottoposta a numerosi e complessi livelli di regolazione, dalla trascrizione del messaggero, alla sua stabilità, traduzione, e degradazione.

Il promotore del gene di APP contiene numerosi siti putativi di legame per fattori che regolano la trascrizione, ma è stato dimostrato che meno di 100 bp altamente conservate, a monte del sito di inizio della trascrizione, sono sufficienti per alti livelli di espressione in vari tipi cellulari (rivisto in Theuns J. & Van Broeckoven C. 2000); questa regione è priva di

una canonica TATA box, l'inizio della trascrizione è iniziato da un Initiator element (Inr) e la sequenza a monte, detta UE (Upstream element), è anch'essa legata da fattori (Quitschke W.W. et al. 1996).

L'attivazione del promotore è mediata principalmente da due elementi ricchi in GC (Pollwein P. et al. 1992). La regione -92/-82 contribuisce per il 70% in cellule neuronali e non, e lega il fattore CTCF (CCCTC-binding factor), noto regolatore di c-myc e dell'apoptosi (Quitschke W.W. et al. 1996). La sequenza -65/-41 lega SP1 (Stimulating Protein 1) e USF (Upstream Stimulating Factor) (Pollwein P. 1993; Vostrov AA et al. 1995). L'attivazione del promotore di APP può essere mediata anche dal legame di HSF-1 (Heat Shock Factor 1) in posizione -317 (Dewji N.N. & Do C. 1995), AP1 in posizione -355/-350 (Lahiri D.K. & Robakis N.K. 1991), e NF-KB a -1837/1822 e 2250/2241 (Grilli M. et al. 1995).

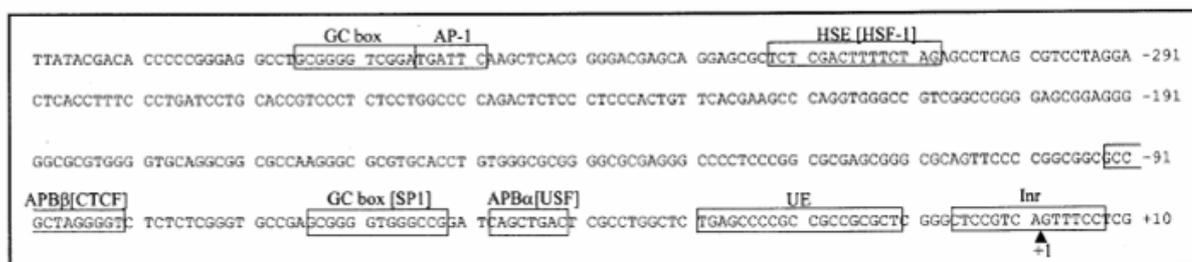


Figura 5. Promotore del gene di APP

A livello della regione al 5' non tradotta, sono state caratterizzate sequenze con attività regolatoria (Lahiri D.K. et al. 2005). La sequenza nota come CAGA box si trova in posizione 83-86 dopo l'inizio di trascrizione e lega le proteine Smad 3/4, due cofattori che mediano la via di trasduzione del TGF- β ; subito a monte c'è un elemento responsivo al TGF- β detto APPtre), mentre subito a valle troviamo una sequenza responsiva all'IL-1 (acute box). Questi tre elementi regolatori ricadono in una regione nota per essere responsiva al ferro (IRE) che si estende da +55 a +144 rispetto all'inizio di trascrizione. E' stato dimostrato che questa sequenza, capace di ripiegarsi a formare una struttura a forcina simile a quella della ferritina, in seguito a trattamento con IL-1 media uno stimolo traduzionale sul messaggero di APP, con un conseguente incremento della produzione della proteina senza sostanziale variazione del mRNA (Rogers J.T. et al. 1999).

Sulla regione 3' non tradotta del messaggero di APP intervengono numerosi meccanismi di modulazione della traduzione e stabilità dell'mRNA.

APP 3' UTR umana



Figura 6. Sequenze con attività regolatoria nota all'interno del 3'UTR del mRNA di APP. I (per i dettagli vedi testo a seguire)

Nel laboratorio di James Malter, nel 1994, è stata identificata una specifica sequenza del 3'UTR di APP in grado di influenzare la stabilità del messaggero; denominata sequenza 29be, è lunga 29 nucleotidi e si trova 197 nucleotidi a valle del codone di stop nel trascritto umano; ricca in AU, è conservata nel topo a 209 nucleotidi dal codone di stop dell'omologo murino (Zaidi S.H.E. & Malter J.E. 1994). La 29be lega sei diversi tipi di complessi proteici presenti in linee cellulari tumorali e, a livelli più bassi, in estratti proteici di cervello, ma assenti in fegato, rene, intestino, cuore, muscolo e polmone (Zaidi S.H.E. et al 1994). In linee cellulari in condizioni basali, i complessi proteici non sono legati alla 29be e l'emivita del mRNA di APP è di circa 4h, ma in seguito a somministrazione di promitotici o fattori di crescita (Rajagopalan L.E. et al. 2000), le proteine legano l'RNA e l'emivita raggiunge 12h; un mRNA reporter contenente il 3'UTR di APP delecto della 29be mostra un'emivita di >10h. Gli autori concludono quindi che la 29be agisca in cis destabilizzando il messaggero di APP e che il legame di proteine, successivamente indagate ed identificate (Zaidi S.H.E. et al 1995; Rajagopalan L.E. et al. 1998), prevenga l'azione di destabilizzazione.

Poiché la regione del 3'UTR di APP prossimale al codone di stop è estremamente conservata, è possibile che siano presenti elementi funzionali all'interno della sequenza. Infatti, nel 2006 Malter e colleghi hanno identificato un'altra sequenza con attività regolatoria: essa è costituita dai primi 52 nucleotidi del 3'UTR di APP, detta 52sce, ed è legata da proteine cellulari, la cui presenza ha invece un effetto stabilizzatore sul messaggero (Westmark P.R. 2006).

In posizione 642 del 3'UTR dell'APP umana, è stata identificata un'altra sequenza regolatoria, lunga 81 nucleotidi, che in seguito a trattamento con TGF- β , in una linea di astrocita umano viene legata da un complesso proteico con effetto stabilizzante (Amara F.M. et al 1999).

Inoltre, nella porzione terminale del 3'UTR di APP, è stata mostrata la capacità di un semplice dinucleotide GG di inibire il legame di proteine e determinare un incremento della traduzione dell'mRNA in proteina (Mbella E.G.M. 2000).

Malattia di Alzheimer, infiammazione e Interleuchina-1

Un tempo considerato organo immunologicamente privilegiato per via della barriera ematoencefalica, è oggi chiaro che mentre l'accesso dei mediatori dell'immunità dalla periferia al cervello è strettamente regolata, il sistema nervoso centrale stesso è capace di mettere in atto una risposta infiammatoria a diversi stimoli (Rivest S. 2009). Infezioni, traumi, ischemia, tossine e altri insulti sono capaci di indurre una risposta immunitaria immediata e di breve durata (Rivest S. 2009; Crutcher K.A. et al. 2008). Questa risposta neuroinfiammatoria acuta include l'attivazione di cellule dell'immunità residenti nel sistema nervoso, la microglia, il rilascio di citochine e chemochine e la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno; in alcuni casi si osserva anche la migrazione di cellule del sistema immunitario provenienti dal circolo sanguigno (Soulet D. & Rivest S. 2008).

La somministrazione di Lipopolisaccaride (LPS), classico stimolo flogogeno, induce nella microglia l'espressione dei geni per le proteine del complemento, varie chemochine, citochine proinfiammatorie incluse l'interleuchina 1 (IL-1), TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-6, IL-12, TGF β (Transforming Growth Factor), enzimi come la cicloossigenasi 2 (COX2) e l'ossido nitrico sintasi (NOS), molecole di adesione, e recettori per mediatori dell'immunità (Lacroix et al. 1998; Quan et al. 2007a e 2007b; Nguyen M.D. et al. 2002; Glezer I et al. 2007a e 2007b).

In quali circostanze la risposta immunitaria nel sistema nervoso centrale diventi da meccanismo di difesa un processo dannoso è argomento di aperto dibattito (Rivest S. 2009).

Nel cervello di pazienti AD, è stata osservata l'overespressione di proteine coinvolte nella infiammazione, e la presenza di microglia attivata in corrispondenza delle lesioni (Akiyama H. et al. 2000; Griffin W.S. 2006; Rogers et al. 2007). L'inibizione di citochine proinfiammatorie in modelli animali di Alzheimer migliora la progressione della malattia, la somministrazione di citochine esogene incrementa la formazione di placche amiloidi e accelera il declino cognitivo, mentre sostanze anti-infiammatorie hanno un effetto protettivo nei modelli della malattia (Wyss-Coray, T. 2006). Studi clinici iniziali hanno riportato che la somministrazione di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) prima dello sviluppo della malattia, riducono la probabilità di insorgenza, ma in soggetti con AD i FANS si sono dimostrati non efficaci o addirittura deleteri (Martin, B. K. et al. 2008).

L'IL-1 viene considerata la capostipite delle citochine proinfiammatorie perché la prima caratterizzata; la famiglia è composta da tre proteine strettamente correlate prodotte da geni diversi: IL-1 α , IL-1 β , e l'antagonista naturale del recettore per IL-1 (IL-1 R1), IL-1 ra (Dinarello 2002).

IL-1 è espressa in piccole quantità in tutto il cervello, con i livelli più elevati in ippocampo e ipotalamo (Breder et al. 1988; Molenaar et al. 1993)., mentre il recettore è presente soprattutto in ippocampo e corteccia cerebrale (Farrar et al. 1987; French et al. 1999). L'IL-1 nel cervello può essere prodotta e andare ad agire su microglia, astrociti, cellule endoteliali, leucociti infiltrati, neuroni e oligodendrociti (Basu A. et al. 2004; Vela J.M. et al. 2002; Higgins G.A. & Oloschowka J.A. 1991). I livelli di IL-1 nel cervello regolano l'appetito, la temperatura corporea (inducendo eventualmente la febbre), e i cicli sonno/veglia dei mammiferi (Dunn A.J. 2000) e IL-1 è il principale mediatore della neuroinfiammazione, inducendo l'espressione di altre citochine proinfiammatorie, molecole chemotattiche che inducono l'infiltrazione di leucociti, cicloossigenasi e metalloproteasi (Shaftel S.S. et al. 2008). L'overespressione di IL-1 è stata osservata nel cervello di pazienti deceduti in seguito ad ischemia, ma anche in soggetti affetti da AD, da sclerosi multipla, sindrome di Down e demenza associata ad HIV (Griffin W.S. et al. 1989; McGuinness M.C. et al. 1997; Zhao M.L. et al. 2001). Anche in seguito a trauma, l'IL-1 viene prodotta nel sistema nervoso centrale, e il blocco della sua attività mostra effetti protettivi contro il danno (Gibson R.M. et al. 1999; Boutin H. et al. 2001; Loddick S.A. et al. 1997). Il danno da eccitotossicità è stato proposto come una possibile connessione tra IL-1 e danno neuronale, poiché è stato visto che IL-1 aumenta in seguito ad eccitotossicità indotta da NMDA (Pearson et al. 1999), e il blocco del recettore NMDA può sopprimere il rilascio di IL-1 in seguito a ischemia cerebrale (Jander et al. 2000); inoltre, l'IL-1 induce la produzione di vari fattori associati alla tossicità da glutammato, quali la NOS e l'acido arachidonico. Anche lo stress ossidativo è stato dimostrato indurre IL-1 (Min et al. 2003).

Topi knockout per IL-1 α , IL-1 β e IL-1R1 non mostrano particolari difetti fisiologici o di sviluppo (Glaccum et al. 1997; Horai et al. 1998), suggerendo che l'IL-1 abbia un ruolo marginale nello sviluppo del tessuto sano e che funzioni soprattutto in condizioni patologiche e nella risposta al danno.

D'altra parte, recentemente l'IL-1 è stata correlata con i meccanismi di plasticità sinaptica che hanno luogo nell'ippocampo, poiché viene prodotta durante la "Long Term Potenziazione"(LTP) (Schneider H. et al. 1998), ma una sua overespressione blocca l'LTP (O'Connor J.J. 1999).

Elevati livelli di IL-1 sono stati osservati in studi post mortem nel liquido cerebrospinale e nel cervello di pazienti AD, in particolare in corrispondenza delle lesioni (Griffin et al. 1989; Cacabelos et al. 1991). Polimorfismi del gene di IL-1 che ne inducono una sovrapproduzione, sono stati documentati come fattore di rischio per lo sviluppo della patologia di Alzheimer

(Licastro et al. 2004) e l'Interleuchina-1 induce l'overespressione dell'APP (Griffin et al. 2006). Un'altra indicazione del coinvolgimento dell'IL-1 nella patologia di Alzheimer deriva dall'osservazione che IL-1 induce l'espressione dell'acetilcolinesterasi (AChE) (Li Y. et al. 2000) e il trattamento con inibitori dell'AChE attenua il deficit di memoria negli stadi precoci di AD (Small D.H. 2004), mentre l'IL-1 stessa inibisce la produzione di acetilcolina (Carmeliet et al. 1989).

Studi recenti hanno però evidenziato come l'IL-1 abbia un effetto benefico nell'ippocampo di topi modello di AD, con una riduzione delle placche nonostante l'induzione di una robusta risposta neuroinfiammatoria (Shaftelet et al 2007).

Malattia di Alzheimer e microRNA

Per via del coinvolgimento dei microRNA in tutti i processi fondamentali del sistema nervoso, dallo sviluppo e differenziamento, alla funzionalità dei neuroni maturi, vari gruppi di ricerca si sono focalizzati negli ultimi anni nell'indagare un possibile coinvolgimento dei miRNA nella patologia di Alzheimer.

Pathology	No. samples (age matched)	No. miRNAs (profiled)	Method of analysis	Tissue examined	Reported changes	Potential targets and/or signaling pathways
AD	10 (5 controls; 5 AD)	13	Northern blot	Brain: CA1 region	Increased miR-9, miR-138 and miR-125b	N/A
AD	23 (5 controls, no A β plaques; 6 controls, with A β plaques; 6 MCI; 6 AD)	200 (~70 analyzed)	Microarray, northern blot	Brain: superior and middle temporal cortex	Decreased miR-107, and possibly miR-103 in MCI and AD; decreased miR-23b in AD (note that miR-9 was not measured)	BACE1/ β -secretase
AD	27 (7 controls; 10 AD braak stage 3-4; 10 AD braak stage 5-6)	244	qRT-PCR	Brain: hippocampus, medial frontal gyrus, cerebellum	Various: decreased miR-9 in AD Braak stage 5-6 in all regions; increased miR-29a, miR-29b-1 in AD Braak stage 5-6 in medial frontal gyrus	Insulin resistance; innate immunity
AD	20 (10 controls; 10 AD)	201	qRT-PCR	CSF	Various	N/A
AD	10 (5 controls; 5 AD)	328 (168 above background signal)	Microarray, qRT-PCR	Brain: temporal cortex	Various: decreased miR-29b-1, miR-29a and miR-9	BACE1/ β -secretase
AD	32 (16 controls, 16 AD)	426	Microarray, qRT-PCR	White blood cells	Various	N/A

Tabella 1. Studi riportanti cambiamenti nel profilo di microRNA in AD (adattato da Hebert S.S. et al. 2009; referenze nell'ordine: Lukiw W.J. 2007a; Wang W.X 2008; Cogswell J.P. 2008; Cogswell J.P. 2008; Hebert S.S. 2008; Schipper H.M. 2008).

Nel laboratorio di Walter Lukiw, sono state osservate delle differenze di espressione di alcuni miRNA in tessuti di ippocampo provenienti da soggetti AD confrontati con controlli non affetti e campioni di cervello fetali (Lukiw W.J. 2007a), con miR-9 elevato in ippocampo fetale e di soggetti AD, miR-128a over-rappresentato nei campioni AD, e miR-125b anch'esso indotto negli AD anche se in maniera non significativa. In un secondo lavoro (Lukiw W.J. 2007b), lo stesso laboratorio ha riportato l'osservazione che in colture primarie contenenti neuroni e astrociti, il trattamento con sali metallici che promuovono la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) induce l'aumento dei medesimi miR-9, miR-128a e miR-125b.

Nel 2008, Patel et al. hanno validato in vitro la capacità di miR-106a e miR-520c di regolare il 3'UTR di APP, come predetto da algoritmi di predizione di target di microRNA, il valore di tale dimostrazione rimane elusivo, visto che miR-520c non è espresso nel cervello e miR-106a lo è a livelli molto bassi. Altri miRNA della famiglia 106 (miR-106b, miR-20a e miR-17-5p) sono stati dimostrati come potenziali regolatori di APP, con il miR-106b, relativamente più espresso nel cervello, drasticamente ridotto in casi sporadici di AD (Hebert S.S. 2008). Anche Apl-1, omologo di APP in *C.elegans*, interagisce geneticamente con i microRNA, e sembra essere sotto il controllo di membri della famiglia let-7 durante lo sviluppo (Niwa R. et al. 2008). Un'altra proteina chiave nella produzione dell'A β , BACE1, enzima fattore limitante nel taglio β di APP e la cui overespressione è fattore di rischio per la malattia di Alzheimer (Fukumoto et al. 2002; Holsinger et al. 2002), è stata dimostrata essere target di miR-29a/b, e questi stessi microRNA sono alterati in cervelli di casi sporadici di AD (Hebert S.S. et al 2008). Wang e colleghi nel 2008 invece riportano la regolazione di BACE1 ad opera di miR-107, microRNA downregolato nei loro campioni di RNA provenienti da soggetti AD. BACE1 è target di un altro tipo di regolazione mediata dall'RNA, infatti Faghihi e colleghi nel 2008, hanno dimostrato che nel sistema nervoso l'RNA antisenso di BACE1 viene trascritto ad elevati livelli ed ha la capacità di stabilizzare il messaggero di BACE1, determinando un aumento di produzione dell'A β ; a sua volta l'A β induce la trascrizione dell'antisenso.

SCOPO DELLA TESI

Nella patogenesi della malattia di Alzheimer, il livello di espressione della proteina precursore del peptide β -amiloide (APP) riveste un ruolo determinante. È stato evidenziato che mutazioni che incrementano la sintesi proteica di APP, inclusa la duplicazione genica del locus di APP in alcune famiglie e nella trisomia del cromosoma 21, che contiene il gene APP, sono sufficienti per indurre lo sviluppo della patologia in forma precoce. Per questo motivo, la regolazione del gene APP è stata oggetto di intensi studi riguardanti sia la caratterizzazione del promotore, che le regioni 5' e 3' non tradotte dell'RNA messaggero. Negli ultimi anni, il meccanismo di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediato dai microRNA è stato estesamente indagato in diversi processi biologici e in vari tipi cellulari. I microRNA modulano finemente la traduzione di proteine necessarie alla risposta a stimoli di origine extracellulare, ed in altri casi definiscono spazialmente e temporalmente i profili di espressione di geni coinvolti nello sviluppo e differenziamento neuronale.

Lo svolgimento di questa tesi sperimentale ha trovato il suo avvio nella domanda se il sistema dei microRNA fosse coinvolto in maniera significativa nella regolazione dell'espressione dell'APP.

Dall'interrogazione di banche di dati di predizione di target di microRNA, emerge che il 3'UTR dell'mRNA di APP, comune a tutte le forme di splicing del messaggero, può interagire con vari microRNA a livello di sequenze ampiamente conservate, tra mRNA umano, di topo, ratto ed altri vertebrati. L'APP è espressa ad alti livelli nell'ippocampo, una delle strutture cerebrali maggiormente colpite nel corso della patologia di Alzheimer. Per studiare l'interazione tra APP e microRNA, è stato quindi utilizzato un sistema modello di colture primarie di neuroni dell'ippocampo di ratto.

Tramite analisi bioinformatica, sono stati selezionati alcuni microRNA che possono potenzialmente interagire con la regione 3' non tradotta del messaggero dell'APP, e tramite incrocio con le banche dati di espressione genica e i dati riportati in letteratura sul profilo di espressione dei microRNA, è stato selezionato il microRNA-101 come miglior candidato regolatore di APP. Successivamente alla validazione dell'interazione funzionale tra il miR-101 e l'APP nel sistema modello di colture primarie di ippocampo di ratto, è stata verificata la suscettibilità del piccolo RNA ad una via di segnalazione notoriamente correlata con la patologia di Alzheimer, quale lo stimolo proinfiammatorio indotto dalla Interleuchina-1 β .

MATERIALI E METODI

Materiali

Tamponi:

TBS 1X	20mM	Tris-HCl pH 7.4
	150mM	NaCl
TBE	90mM	Tris base
	90mM	Acido Borico
	2mM	EDTA
PBS 1X pH 7.4	100mM	NaCl
	2mM	KCl
	10mM	Na ₂ HPO ₄
	1.8mM	KH ₂ PO ₄
RIPA	1%	Triton,
	0,5%	SDS
	0,5 %	Deoxycholic acid
	50mM	NaPO ₄ ,
	150 mM	NaCl,
	2 mM	EDTA
Tampone stacking gel	125mM	Tris HCl pH 6.5
SDS-PAGE	0.1%	SDS
Tampone running gel:	375mM	Tris HCl pH 8.8
SDS-PAGE	0.1%	SDS
Tampone di corsa	25mM	Tris base
SDS-PAGE 1X	20mM	Glicina
(SDS-Tris-Glicina)	0,1 %	SDS

Tampone di caricamento (Sample Buffer 4X)	200 mM	Tris-HCl pH6.8
SDS-PAGE	4 %	SDS
	40 %	Glicerolo
	20 %	β -Mercaptoetanol
	0,1 %	Comassie Blue Brilliant
Tampone di trasferimento SDS-PAGE	25mM	Tris base
	20mM	Glicina
	20 %	Metanolo
Tampone di caricamento (Loading Buffer)	80 %	Formammide deionizzata
Northern blot	10 mM	EDTA pH 8
	1 mg/ml	Blu Bromo Fenolo
	1 mg/ml	Xilen Cianolo
Tampone di corsa Northern blot	1 X	TBE
Tampone di trasferimento Northern blot	0,5 X	TBE
Tampone di ibridazione Northern blot	6 X	SSPE
	5 X	Denhardt
	0,5 %	SDS
SSPE 6X	3 M	NaCl
	0,2 M	NaH ₂ PO ₄
	0,02 M	EDTA

Terreni di coltura per cellule 293T:

D-MEM supplementato con	Glucosio	(4,5mg/ml)
	L-glutamina	(2mg/ml)
	Streptomicina	(50µg/ml)
	FBS(SieroBovinoFetale)	(10%)

Terreni di coltura per cellule PC12:

RPMI supplementato con	HS(Siero di cavallo)	(10%)
	FBS (SieroBovinoFetale)	(10%)
	Streptomicina	(50µg/ml)

Terreni di coltura per batteri* (1 litro):

LB pH 7.0	10g	NaCl
(Louria-Bertani)	10g	Tryptone
	5g	Estratto enzimatico di lievito
	100mg	Ampicillina

Piastre LB	10g	NaCl
	10g	Tryptone
	5g	Estratto enzimatico di lievito
	20g	Agar
	100mg	Ampicillina

*Prima di aggiungere l'ampicillina i terreni sono stati autoclavati a 121°C per 21 minuti. L'antibiotico viene aggiunto al terreno LB agar sterile a temperatura non superiore ai 55°C.

Vettori di espressione lentivirali:

-pLB: Vettore di 8,8 Kilobasi (Kb) utilizzato per l'espressione di shRNA in cellule di mammifero (Kissler S et al., 2006). Il plasmide codifica per la proteina Green fluorescent protein (GFP) sotto il controllo del promotore Citomegalovirus (CMV), un promotore eucariotico costitutivo che permette un alto livello di trascrizione, e contiene il promotore U6 a valle del quale è possibile clonare sequenze di shRNA o miRNA. Inoltre, il vettore possiede il gene che conferisce la resistenza all'ampicillina e l'origine di replicazione che permettono la selezione e il mantenimento in *E.coli*.

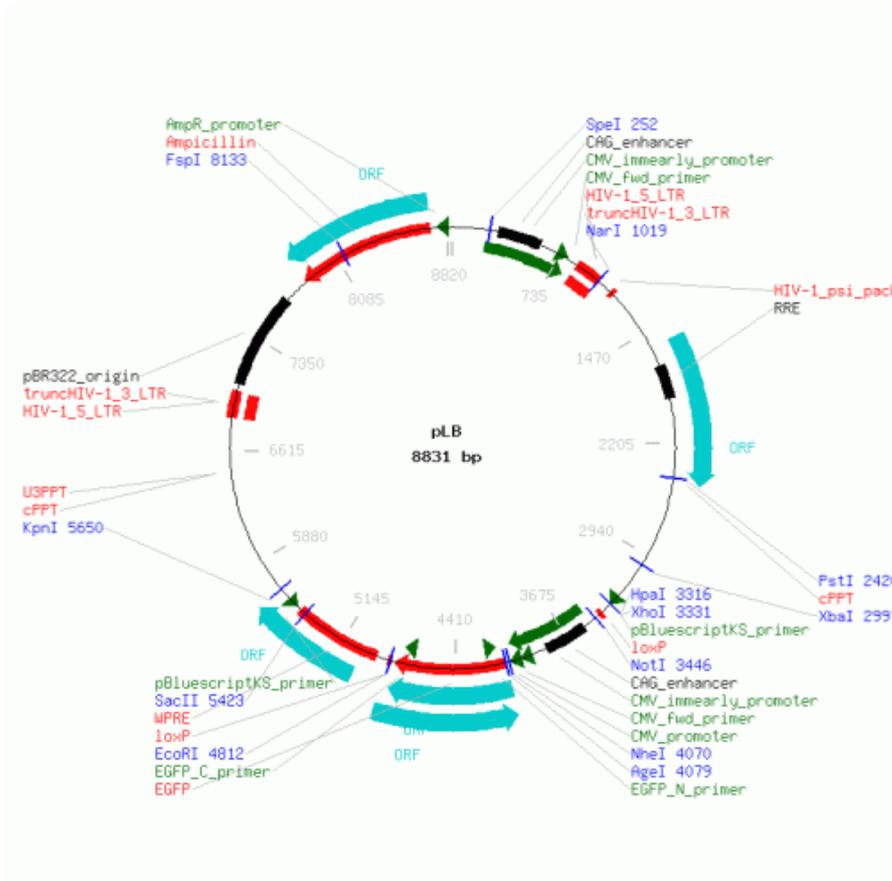


Figura 7. Mappa del vettore pLB utilizzato (dal sito web dell'Addgene, www.addgene.org).

-pLKO.1 puro: vettore della serie MISSION® (Sigma Aldrich), esprime un shRNA processato in siRNA. E' stato utilizzato il clone 9631 che esprime un shRNA processato in siRNA diretto contro l'mRNA di AGO2. Come controllo è stato utilizzato il clone SHC002, esprime un siRNA incapace di legare alcun trascritto nel ratto.

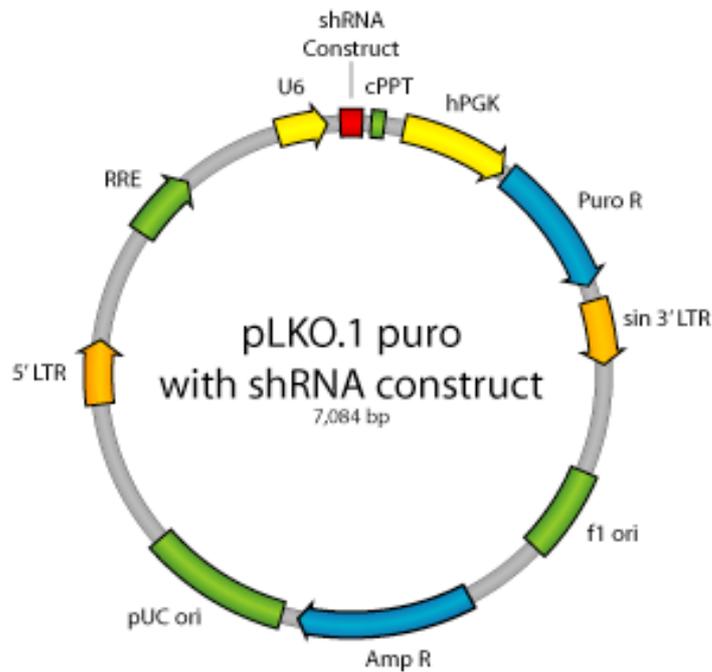


Figura 8. Mappa del vettore pLKO.1 puro (Sigma Aldrich)

Anticorpi

Per Western blot:

Primari

Anti-APP 4G8 (SIGNET) monoclonale di topo

Anti-APP 22C11 (CHEMICON) monoclonale di topo

Anti COX2 (Cayman) policlonale di coniglio

Anti GAPDH (Covance) monoclonale di topo

Secondari

IgG anti-topo coniugato alla perossidasi di rafano (GeHealthCare)

IgG anti-coniglio coniugato alla perossidasi di rafano (GeHealthCare)

Per immunofluorescenza:

Primario

Anti-APP 4G8 (SIGNET) monoclonale di topo

Secondario

IgG Alexa 594 (Molecular Probes Invitrogen).

Metodi

Digestione DNA con enzimi di restrizione

Per la digestione sono stati utilizzati gli enzimi HpaI e XhoI , che tagliano nel sito multiplo di clonaggio a valle del promotore U6. In particolare, sono state utilizzate 4 unità di enzima per µg di DNA e la reazione di digestione, in opportuni tamponi specifici per questi enzimi di restrizione, è stata incubata a 37°C e per 2 ore.

Il vettore, un volta linearizzato a seguito della digestione con enzimi di restrizione, è stato defosforilato utilizzando la fosfatasi alcalina, alla concentrazione di 1 unità per µg di DNA, CIP (calf intestinal phosphatase, fosfatasi di intestino di vitello) in una reazione condotta a 37°C per 30 minuti. La CIP è stata successivamente inattivata a 60°C aggiungendo SDS (0,5% finale) ed EDTA (25 mM finale) per 20 minuti.

Descrizione del costrutto utilizzato per il clonaggio del miRNA-101

Per la realizzazione del costrutto pLB/miR-101 sono stati utilizzati oligonucleotidi sintetici di circa 60 nucleotidi contenenti la sequenza del miR-101 maturo e disegnati come shRNA con all'estremità 5' e 3' i nucleotidi corrispondenti alle estremità prodotte dagli enzimi HpaI e XhoI, rispettivamente. Come controllo è stata clonata una sequenza processata in un siRNA incapace di legare alcuna sequenza in ratto.

La sequenza degli oligonucleotidi è:

hsa-miR101UP:

TGTTTCAGTTATCACAGTACTGTACTCGAGTACAGTACTGTGATAACTGAACTTTTTTC;

hsa-miR101DOWN:

TCGAGAAAAAGTTCAGTTATCACAGTACTGTACTCGAGTACAGTACTGTGATAACTGAACA;

shc002UP:

TGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGCTTTTTTTC;

shc002DOWN:

CTGAGAAAAAGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGCA.

Poiché l'enzima HpaI in pLB lascia un'estremità netta prima della porzione -1 del promotore U6, l'oligonucleotide da noi disegnato contiene al 5' una T per ricostruire il nucleotide -1.

Fosforilazione e appaiamento degli oligonucleotidi miR-101

Gli oligonucleotidi hsa-miR101up e hsa-miR101down sono stati fosforilati (300pmoli ciascuno) utilizzando una reazione attivata dalla T4PNK (10 unità) (polinucleotide chinasi del batteriofago T4), ad una temperatura di 37°C per un'ora in presenza di ATP (0,2 mM), in un volume di 50µl. L'enzima infatti catalizza una reazione di trasferimento e scambio del fosfato in posizione γ dell'ATP al 5' dell'oligonucleotide, sia a singolo che a doppio filamento. Poi la temperatura è stata innalzata a 90°C per 2 minuti, abbassata a 37°C per 30 minuti; lasciato il campione a temperatura ambiente per 2 ore e infine a 4°C, in modo tale che i due oligonucleotidi si appaiassero correttamente per tutta la loro lunghezza, generando all'estremità 5' un'estremità netta compatibile con l'estremità lasciata dall'enzima HpaI nel vettore pLB, mentre all'estremità 3' un'estremità protrudente compatibile con l'estremità lasciata dall'enzima XhoI.

Reazione di ligazione dell'inserto nel vettore di DNA

L'inserto di DNA fosforilato e il vettore plasmidico linearizzato e defosforilato sono ligati con un rapporto di numero di molecole di inserto rispetto al vettore pari a 3:1, in un opportuno tampone a 20°C per 6 ore.

Preparazione delle cellule batteriche competenti per elettroporazione

I batteri del ceppo di *E.coli* DH5 α sono stati resi competenti per la trasformazione con DNA plasmidico mediante elettroporazione. Una coltura di batteri cresciuta in terreno LB privo di antibiotici, per 14 ore a 37°C con agitazione, è stata diluita 1:100 con LB fresco in volume finale di 400 ml ed è stata nuovamente incubata a 37°C, fino a raggiungere una densità ottica a 600 nm compresa fra 0,6 e 0,8. I batteri sono stati quindi incubati per 30 minuti in ghiaccio e centrifugati a 3500 rpm per 5 minuti. Il terreno LB è stato eliminato e i batteri, risospesi in 400 ml di acqua bidistillata fredda, sono stati centrifugati nelle stesse condizioni. I batteri sono quindi stati risospesi nella metà del volume (200 ml) di acqua bidistillata fredda e sono stati ricentrifugati sempre a 3500 rpm per 5 minuti. Successivamente i batteri sono stati risospesi in 8 ml di una soluzione preraffreddata di acqua bidistillata con il 10% di glicerolo. Dopo un'ulteriore centrifugazione i batteri sono stati risospesi in acqua con 10% glicerolo in un volume finale di 1,2 ml. La sospensione batterica è stata quindi distribuita in aliquote da 50 µl preraffreddate, e le aliquote sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Trasformazione delle cellule batteriche

I batteri sono stati trasformati con il metodo dell'elettroporazione. I batteri appena scongelati sono stati brevemente incubati con DNA legato in un rapporto di volume 50:1 e sono stati posti in cuvette preraffreddate da 2 mm, nell'elettroporatore E.coli Pulser (Biorad). L'elettroporazione è stata effettuata applicando una differenza di potenziale di 2500 V in un elettroporatore (Biorad). In seguito allo shock elettrico, i batteri sono stati trasferiti in LB medium per un'ora a 37°C su agitatore. Le cellule batteriche sono state poi piastrate su piastre Petri con LB Agar con l'antibiotico opportuno (ampicillina) e sono state fatte crescere per 16 ore a 37°C. Le colonie di interesse sono state prelevate e inoculate in terreno di crescita LB-ampicillina.

Gli stock batterici sono stati preparati aggiungendo glicerolo al 20% del volume finale di un'aliquota di coltura batterica cresciuta 16 ore.

Preparazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto e purificato utilizzando il kit Qiaprep spin Mniprep kit (QIAGEN), PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kits per midi-preparazioni (Invitrogen) e Endofree Maxi-Prep Kit (QIAGEN).

Elettroforesi di DNA in gel di agarosio

I gel di agarosio sono stati utilizzati per visualizzare e quantificare il DNA confrontandolo con marcatori di peso molecolare e concentrazione nota.

Il gel d'agarosio è stato preparato solubilizzando l'agarosio in tampone TBE 1X a temperatura elevata in un forno a microonde. Una volta che la temperatura è scesa a 55°C è stato aggiunto alla soluzione bromuro di etidio 1 µg/ml (è un intercalante del DNA in grado di riemettere ad una lunghezza d'onda maggiore la luce ultravioletta assorbita). Il gel è stato poi colato in appositi supporti e i campioni di DNA sono quindi stati caricati aggiungendovi il tampone di corsa contenente il colorante blue di bromofenolo, utile per seguire la corsa. Il DNA è stato sottoposto a elettroforesi ed è stato visualizzato mediante irradiazione con raggi ultravioletti.

Mutagenesi sito-specifica di DNA plasmidico

Il plasmide pSSG-APP (Swith Gear Genomics), contenente la sequenza del 3' UTR dell'APP umana a valle della sequenza codificante per la luciferasi di Firefly, è stato mutagenizzato in maniera sito-specifica utilizzando il kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) secondo le indicazioni del produttore. La sequenza è stata modificata sostituendo i nucleotidi 4° e 5° di ogni sito di legame per il microRNA-101 nel 3'UTR di APP; sono stati quindi generati il costrutto mutante per il primo sito, pSSG-MUT1, il mutante per il sito più a valle, pSSG-MUT2, e il doppio mutante, pSSG-MUT12, tutti controllati tramite sequenziamento.

Vettori lentivirali

I vettori lentivirali sono un tipo di retrovirus in grado di infettare sia cellule in attiva proliferazione che non, in quanto il loro complesso di preintegrazione (virus "shell") può attraversare l'intatta membrana nucleare delle cellule target. I lentivirus possono essere usati per effettuare una terapia genica ad alta efficienza andando a modificare l'espressione genica delle loro cellule target per più di sei mesi. Vengono utilizzati indifferentemente per cellule non differenziate o terminalmente differenziate come sono i neuroni, macrofagi, cellule staminali ematopoietiche, fotorecettori della retina, cellule muscolari ed epatiche.

I lentivirus sono gli unici virus diploidi: hanno infatti due filamenti di RNA. Il filamento positivo del genoma a RNA è lungo circa 10kb e ha alle estremità sequenze LTRs (long terminal repeats). Ritroviamo poi una sequenza Ψ vicino al 5' terminale, che è necessaria per il packaging ("impacchettamento") del RNA virale nel capsido del virus per proseguire l'infezione in cellula ospite. Una volta nella cellula ospite, l'RNA viene convertito in DNA grazie alla trascrizione inversa (RNA in DNA). La trascrittasi inversa sintetizza il primo filamento di DNA dall'RNA template, mentre la DNA polimerasi dell'ospite sintetizza il secondo filamento per produrre così un DNA a doppio filamento (dsDNA).

Per ottenere un vettore lentivirale sicuro, i geni e le sequenze necessarie per la produzione delle particelle virali sono suddivisi tra 4 plasmidi che si complementano in trans. Un gene di interesse viene inserito in un vettore alle cui estremità ritroviamo le LTRs e la sequenza Ψ . Le LTRs sono necessarie per l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula target, mentre la sequenza Ψ è necessaria al packaging dell'RNA con il gene reporter nei virioni; mentre le sequenze codificanti per le proteine virali deputate all'infezione non vengono

inserite nei virioni. In questo modo si producono solo particelle virali che non sono in grado di replicarsi ma sono disegnate solo per infettare l'ospite introducendo il loro RNA.

Con questi riferimenti sono stati preparati lentivirus in grado di infettare le cellule ippocampali con un sistema a 4 plasmidi (Dull et al., 1998).

-Plasmide pREV: complementa il costrutto pMDL poiché contiene le sequenze geniche codificanti per la proteina REV, proteina virionica in grado di regolare il trasporto dal nucleo al citoplasma dei trascritti per gag e pol prodotti dal plasmide pMDL e consentirne l'espressione;

-Costrutto packaging, pMDL: è la base del sistema d'infezione virale, la sua espressione è guidata dal promotore del cytomegalovirus umano (hCMV) che è responsabile dell'espressione delle proteine virali. In questo plasmide troviamo solamente le sequenze codificanti per *gag* e *pol*. I segnali di packaging e i loro segnali adiacenti vengono rimossi in modo tale da separare la parte responsabile al packaging del RNA virale dalla parte che lo attiva. Così, le sequenze packaging non vengono incorporate nel genoma virale e il virus non è in grado di riprodursi dopo l'infezione nella cellula ospite.

-Plasmide dell'envelope, pVSVG: è il vettore che specifica che tipo di cellula bersaglio e di infezione il virus è diretto a compiere. Questo conferisce al vettore lentivirale dell'HIV un largo spettro di possibili cellule bersaglio. Nei nostri esperimenti ci si è serviti della glicoproteina G del Virus della Stomatite Vesicolare (VSV-G) che è in grado di conferire stabilità alle particelle virali, legando insieme le particelle che vengono prodotte dal plasmide packaging e permette al vettore di essere concentrato con un alto titolo.

-Plasmide di trasferimento pLB-miR101: in questo plasmide è stata clonata la sequenza del microRNA di interesse. pLB contiene le sequenze in cis (LTRs, self-inattivanti, e Psi) necessarie al vettore affinché il genoma virale possa essere incapsidato nelle particelle virali e successivamente possa integrarsi nel genoma delle cellule infettate.

Coltura cellule 293T e trasfezione

Le cellule HEK293T utilizzate sono state coltivate in monostrato, in incubatore a 37°C, con il 90% di umidità ed il 5% di CO₂. Il terreno di coltura utilizzato è il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contenente L-glutamina (alla concentrazione finale di 2 µg/ml) e streptomicina (50 µg/ml).

Le HEK293T derivano da una linea cellulare di rene embrionale umano, denominate HEK293, ingegnerizzata col gene che codifica per l'antigene T del virus SV40 che riconosce e lega fortemente i promotori derivati da questo virus.

Le cellule 293T sono state seminate ad una densità di $1,8 \times 10^6$ cellule/ml in DMEM contenente il 10% FCS (fetal cow serum), in piastre da 100mm.

Dopo 24 ore, il terreno delle cellule è stato sostituito con un terreno fresco privo di antibiotici. Sono stati preparati i campioni di DNA per la trasfezione con queste modalità; per una piastra da 100 mm sono stati utilizzati 2,6 µg di MDL, 0,6 µg di REV., 0,75 µg di VSVG, 2,6 µg di pLB in OptiMEM (GIBCO), per un totale di 6,5 µg. Poi è stata preparata una seconda soluzione con FuGENE (13 µl per piastra) e OptiMEM. Le due miscele sono state unite e incubate per 15 minuti a temperatura ambiente, per permettere il formarsi dei complessi DNA-lipidi. A questo punto le soluzioni contenenti i complessi sono state aggiunte alle colture cellulari.

Dopo 12-15 ore il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate una volta con DMEM e incubate con 5 ml DMEM e 10% FBS in presenza di antibiotici.

Dopo 48 ore di incubazione a 37°, il terreno di coltura delle cellule infettate contenente il virus è stato raccolto, centrifugato per 5 minuti a 1500 rpm e poi filtrato con filtri 0,45 µm per eliminare ogni detrito cellulare prima di purificare il virus.

A questo punto il terreno è stato aliquotato in tubi da ultracentrifuga sopra un cuscinetto di saccarosio al 20% in PBS che permette di purificare ulteriormente il virus da contaminazioni di detriti cellulari e da particelle virali non perfettamente assemblate e centrifugato per un'ora e 40 minuti a 25.000 rpm. Il pellet contenente il virus è stato risospeso in 50 µl di PBS con 1% BSA, aliquotato e congelato a -80°C.

Per calcolare il titolo virale sono state infettate cellule 293T con diluizioni in serie del virus purificato. Dopo 72 ore le cellule sono state osservate al microscopio e analizzate per l'espressione della proteina GFP. Le cellule verdi esprimenti la GFP sono state contate e moltiplicando per il fattore di diluizione, è stato calcolato il titolo virale espresso in TU (transducing units)/ml.

Coltura di cellule PC12 e trasfezione

Le cellule PC12 sono state mantenute in coltura in terreno RPMI supplementato con HS 10% e FBS 5%.

Per la trasfezione, le cellule sono state piastrate 24 ore prima dell'esperimento, alla densità di 3×10^5 in pozzetti da 24 mm di piastre precedentemente polilisinata. Per i saggi di luciferasi, 20 ng di plasmide pSSG (esprime la luciferasi Firefly), 10 ng di plasmide pRLTK (esprime Renilla), e 100 picomoli di microRNA duplex miR-101 o cel-46 (Dharmacon) sono stati complessati con 1,2 μ l di Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 300 μ l di terreno Optimem per ogni pozzetto da 24 mm.

Dopo 24 ore le cellule sono state lavate e lisate per il successivo saggio di luciferasi.

Saggi di luciferasi

Il saggio è stato condotto con il kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) secondo le indicazioni del produttore. Brevemente, le cellule sono state lavate con PBS e lisate in 100 μ l di un apposito buffer non denaturante, quindi 20 μ l di lisato sono stati trasferiti in un tubo da lettura luminometrica ed è stato aggiunto il substrato per la luciferasi Firefly; registrata la luminescenza d'emissione, è stato aggiunto il substrato per la luciferasi di Renilla, contenente un inibitore della luciferasi di Firefly, ed è stata registrata la seconda luminescenza di emissione.

Culture primarie di neuroni ippocampali di ratto e trattamenti

I neuroni ippocampali sono stati preparati da embrioni di ratti Wistar al giorno 17-18 (E17/E18). Gli ippocampi sono stati dissezionati in soluzione salina Hanks tamponata con HEPES, e dissociati con trattamento con tripsina/EDTA. Le cellule sono state piastrate alla densità di 1×10^6 su piastre di 3.5 cm ricoperti con polilisina. Dopo due giorni di coltura in terreno Neurobasal supplementato con B-27 e Glutamax, citosina arabinofuranoside è stato aggiunto per ridurre la crescita di cellule gliali. Metà del terreno è stato sostituito ogni 3-4 giorni.

Le cellule di ippocampo sono state infettate a 13 giorni in coltura. Nelle nostre colture la quantità di lentivirus utilizzata è pari a 2×10^6 particelle virali per $0,5 \times 10^6$ cellule. Dopo l'infezione le cellule sono state fatte crescere in incubatore a 37°C e raccolte a 17 DIV per eseguire l'estrazione di RNA e proteine.

Una quantità minore di virus ($0,5 \times 10^6$) è stata usata per $0,5 \times 10^6$ cellule da analizzare attraverso saggi di immunofluorescenza, in modo da ottenere sullo stesso vetrino sia cellule infettate che cellule non infettate di controllo.

Per la trasfezione dell' inibitore di miR-101, 267 ng di microRNA hairpin inhibitor (Dharmacon, Thermo Scientific) sono stati coniugati con 2 μ l di Lipofectamine 2000 e somministrati in 300 μ l di terreno Neuro Basal supplementato con B27 per 6 ore. Le cellule sono state raccolte dopo 4 giorni dalla trasfezione ed analizzate per Western Blot.

L'Interleuchina-1 β di ratto è stata somministrata dopo 7 giorni di coltura in vitro, alla concentrazione di 10 ng/ml finali, per 4, 6, o 8 ore.

Estrazione proteine da cellule hippocampali e quantificazione

Le cellule hippocampali sono state lavate con PBS 1X per tre volte e le proteine sono state estratte con il buffer RIPA: dopo l'abrasione delle proteine dalle piastre di coltura, ogni campione è stato incubato a 4°C per 30 minuti e quindi centrifugato a 12000g per 15 minuti per sedimentare i detriti e le membrane.

La quantificazione dei campioni è stato effettuato utilizzando il Kit DC Protein Assay (BIO-RAD) secondo le specifiche del produttore, per confronto con una curva standard effettuata utilizzando quantità note di BSA (Bovine Serum Albumine), sciolta nello stesso tampone di lisi dei campioni di cui si vuole determinare la concentrazione.

SDS-PAGE

Le proteine derivanti da estratti cellulari sono state separate in base al loro peso molecolare (p.m.) mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in tampone contenente SDS (Sodio Dodecil Solfato). L'SDS è un detergente anionico capace di legarsi alle proteine in quantità proporzionale alla loro lunghezza e indipendentemente dalla loro sequenza. In questo modo il complesso SDS-proteina migra attraverso la poliacrilammide in accordo con il peso molecolare della stessa proteina. Usando poi un marcatore di peso molecolare noto, è possibile stimare il p.m. della catena polipeptidica (tenendo conto delle possibili modifiche post-traduzionali). I gel sono costituiti da due porzioni con concentrazione diversa di acrilammide: lo stacking gel è la porzione superiore, dove sono caricati i campioni e ha una concentrazione di poliacrilammide molto bassa per far migrare insieme le proteine con diversi pesi molecolari; mentre il running gel è la porzione inferiore, in cui si ha la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare. L'SDS è presente sia nel gel che nel tampone di corsa, ed è pari allo 0,1% del volume.

I campioni risospesi in tampone SB1X supplementati con β -mercaptoetanololo sono stati incubati 5 minuti a 100°C per denaturare le proteine e ridurre i ponti disolfuro, poi raffreddati in ghiaccio, centrifugati per breve tempo e caricati su gel; lo stesso viene fatto in parallelo con i marcatori di molecolare. La corsa elettroforetica è effettuata applicando una differenza di potenziale costante pari a 75 V, a temperatura ambiente, per 3 ore.

Western blot

Dopo SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa. Il gel venga posizionato sulla membrana di trasferimento, entrambi posti sopra due fogli di carta assorbente 3MM precedentemente immersa in tampone di trasferimento e ricoperti da altri due fogli di carta. Il tutto viene a sua volta inserito fra due spugne anch'esse imbevute di tampone di trasferimento, che sono poi state inserite in un supporto rigido e fenestrato per consentire il passaggio di corrente con maggiore facilità.

Il supporto contenente gel e filtro è stato poi inserito in una cameretta contenente il tampone di trasferimento, in modo tale che il filtro fosse posto tra il gel e l'anodo. Infatti, il trasferimento avviene da catodo a anodo ed è stato eseguito per 16 ore con un voltaggio di 30 V.

Il filtro è stato poi trattato con il colorante Rosso Ponceau per controllare la presenza delle proteine sulla membrana, poi la membrana è stata lavata con TBS per eliminare il colorante. Prima di essere usato per i saggi di ibridazione con anticorpi, il filtro è stato saturato per un'ora a temperatura ambiente con la soluzione di blocco preparata sciogliendo al 5% latte scremato in polvere in tampone TBS contenente TWEEN allo 0,1% (TTBS), dopo è stato lavato una volta con TBS per 5 minuti. L'anticorpo primario è stato incubato con il filtro nella soluzione di blocco per 16 ore a 4°C, mentre il secondario coniugato alla perossidasi di rafano è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo ogni incubazione il filtro è stato lavato più volte con lavaggi di 5 minuti con tampone TTBS.

Il saggio di chemiluminescenza è stato effettuato con ECL (Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore), contenente luminolo, il substrato della perossidasi di rafano.

Isolamento e analisi fibrille di peptide β -amiloide

Le fibrille di peptide β -amiloide sono state ottenute da 15 ml di terreno di coltura condizionato per 96 ore dai neuroni. Il terreno è stato centrifugato a 10000g per 30 minuti

per rimuovere i detriti cellulari e successivamente ultracentrifugato a 100000g per 4h a 4°C per sedimentare fibrille e protofibrille (Romano A. et al. 2003). Il materiale sedimentato è stato risospeso in 70% acido formico, sonicato e successivamente dissolto in buffer di Tricina 2X. I campioni sono stati quindi analizzati tramite elettroforesi su gel Tris-Tricina 10-16%, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e saggiati con l'anticorpo anti-APP 4G8.

Estrazione RNA

Le cellule sono state lisate direttamente nella loro piastra di coltura da 3,5 cm di diametro con 1 ml di reagente TRIzol (INVITROGEN), usato per l'estrazione dell'RNA da cellule e tessuti. Il reagente TRIzol, infatti, mantiene l'integrità dell'RNA mentre lisa le cellule e dissolve i componenti cellulari. In aggiunta al cloroformio, è in grado di separare la soluzione in due fasi, acquosa e organica, mantenendo esclusivamente l'RNA nella fase acquosa. La quantità di reagente utilizzata si basa sulla grandezza della piastra e non sul numero di cellule. Le cellule vengono così estratte in maniera da non avere una contaminazione di DNA nella preparazione.

Gli omogenati sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleo proteici. Successivamente si è aggiunto 0,2 ml di cloroformio per 1 ml di reagente TRIzol agitando i tubi vigorosamente per 15 secondi e incubando successivamente per altri 2-3 minuti a temperatura 15/30°C. Poi si sono centrifugati i campioni a 12000 xg per 15 minuti a 4°C per ottenere così una separazione di fase che ci permette di estrarre esclusivamente l'RNA purificato.

La fase acquosa, contenente l'RNA, viene trasferita in tubi nuovi. L'RNA viene precipitato con alcol isopropilico (0,5 ml per 1 ml di reagente TRIzol usato nella fase di omogenizzazione) incubando i campioni a 15/30°C per 10 minuti e centrifugandoli successivamente a 12000 xg per 15 minuti a 4°C.

Rimosso il supernatante, il pellet di RNA viene lavato una volta con 75% di etanolo (1 ml di 75% di etanolo per 1 ml di TRIzol usato) agitando in vortex e centrifugando a 7500 xg per 5 minuti a temperatura 4°C.

Il pellet di RNA, lasciato asciugare all'aria per qualche minuto viene risospeso in acqua priva di RNasi e conservato a -80°C.

Real-Time Q-PCR

Per la quantificazione degli RNA messaggeri di Ago2, Ago1 e APP, è stata utilizzata la reazione a catena della polimerasi, effettuata in presenza di una sonda marcata con un fluoroforo, in un termociclatore dotato di laser e scanner per la stimolazione e registrazione della fluorescenza emessa dalla sonda. L'RNA è stato sottoposto a trattamento con DNase TURBO DNA-free™ (Ambion) e successivamente retrotrascritto in cDNA con la trascrittasi inversa SuperScript® III (Invitrogen). I cDNA sono stati quindi amplificati in presenza di oligonucleotidi specifici per ogni messaggero di interesse e della sonda specifica scelta dalla collezione from Universal Probe Library (Roche) nel termociclatore 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Le sonde utilizzate sono i #77 per Ago1 e Ago2 di ratto, #69 per APP di ratto e #129 per TBP di ratto (Tata Binding Protein, usato come normalizzatore della quantità di cDNA usata).

Gli oligonucleotidi utilizzati come inneschi per le amplificazioni sono:

AGO1rno695 - 715FW	GTGTCCTCGCAGAGTCAACC
AGO1rno740 - 759RW	GATCTGCGGTTTGAAATGCT
rno-TBP-1029-1048FW	CCCACCAGCAGTTCAGTAGC
rno-TBP-1081-1103RW	CAATTCTGGGTTTGATCATTCTG
rno-APP-659-678FW	GGAGCGGACACAGACTATGC
rno-APP730-750RW	GCTTCTTCTTCCTCAACATCG
rno-AGO2-1559FW	AACACATACGCTGGTCTCCA
rno-AGO2RW	CTCCCACACGCTTGACTTC
pri-mir101FW297-321	CAGTACTGTGATAACTGAAGGATGG
pri-mir101RW381-398	GTCCCTGTCCCGGTGTCCT

I dati di espressione sono stati analizzati secondo il metodo del Delta-Delta ct.

Per la quantificazione dei microRNA mediante Real-Time Q-PCR, sono stati utilizzati il TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit e i TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) per hsa-miR-101a e U6 come normalizzatore, tutto secondo le specifiche del produttore.

Northern blot

La densità ottica dei campioni di RNA è stata determinata con il NanoDrop ad un valore di assorbanza pari a A_{260nm} e l'mRNA è stato controllato su gel d'agarosio all'1% in tampone TBE 0,5X, con l'aggiunta di etidio bromuro, per assicurarsi della loro integrità ed escludere la presenza di una possibile degradazione. Successivamente è stato aggiunto ad ogni campione di RNA il Loading Buffer (contenente l'agente denaturante formammide

deionizzata) in una concentrazione tale da avere 1 parte di RNA e 3 parti di soluzione tampone. Quindi l'RNA è stato denaturato a 90°C per 5 minuti. Prima di caricare i campioni nel gel, è stata effettuata una precorsa di 1 ora del gel a vuoto per consentire allo stesso gel di equilibrarsi in termini di pH e forza ionica. Successivamente i campioni sono stati caricati su un gel denaturante di acrilammide al 10%, 7M urea, che consente di separare efficientemente piccoli RNA, tra i 10 e i 180 nucleotidi di lunghezza. Anche la composizione del gel prevede la presenza di agenti denaturanti, in particolare è stata usata l'urea. Terminata la corsa elettroforetica il gel è stato posizionato su una membrana di nylon, entrambi posti sopra tre fogli di carta assorbente 3MM e ricoperti con altri tre fogli. Il "sandwich" è stato a sua volta inserito in due spugne posizionate in un supporto rigido e fenestrato per consentire il passaggio di corrente. Il supporto contenente gel e filtro è stato poi immerso in una cameretta contenente il tampone di trasferimento, in modo tale che il filtro sia disposto tra il gel e l'anodo. Il trasferimento è stato effettuato per 16 ore ad un voltaggio pari a 10 V a 4°C; poichè il legame del RNA alla membrana avviene attraverso legami deboli, il filtro è stato esposto per circa un minuto a raggi UV in modo da legare covalentemente l'RNA alla membrana. Concluso il trasferimento, il filtro è stato equilibrato per un'ora con la soluzione di ibridazione, allo scopo di rendere omogeneo il filtro rispetto a pH e forza ionica. Successivamente il filtro è stato ibridato per 16 ore a 37°C con la sonda marcata con ³²P, precedentemente preparata e diluita in soluzione di ibridazione. Poi sono stati fatti due lavaggi con SSPE 6X per 20 minuti, il primo a temperatura ambiente, il secondo a 37°C. Per la visualizzazione la membrana è stata esposta ad uno schermo sensibile alla radioattività rilevando così la posizione dell'RNA di interesse. L'immagine è stata infine acquisita con un apposito scanner (STORM 840, Amersham Biosciences).

Gli oligonucleotidi utilizzati come sonda per Northern sono i seguenti:

anti-U6: AGTATATGTGCTGCCGAAGCCCATCC;

anti-hsa-miRNA-101 TTCAGTTATCACAGTACTGTACCATCC,

Marcatura radioattiva della sonda

L'oligonucleotide a DNA di sequenza complementare al microRNA-101 o alla sequenza di U6 è stato marcato radioattivamente con ³²P mediante la reazione di fosforilazione catalizzata dalla polinucleotide chinasi T4. 5 picomoli dell'oligonucleotide sono stati incubati con 15 µCi di γ ³²P-ATP, 10 unità di T4PNK, in tampone contenente DTT per un volume finale di 15µl. La marcatura dell'oligonucleotide è stata eseguita per 40 min a 37°C.

Trattamento di vetrini con polilisina

La polilisina è un polimero che in seguito all'esposizione alle radiazioni ultraviolette facilita l'adesione delle cellule ai supporti di coltura (il vetro, la plastica). 100 µl di polilisina (1mg/ml) sono stati depositati sui vetrini posizionati in piastre di coltura cellulare ed esposti ai raggi UV per 30 minuti. Successivamente si elimina la polilisina e si lasciano i vetrini asciugare per 12 ore. Le cellule possono essere quindi piastrate sulle superfici trattate.

Saggio di Immunofluorescenza

Le cellule di ippocampo di ratto, seminate su vetrini polilisinati ad una densità di 1×10^6 cell/ml, i vetrini sono stati lavati due volte con PBS 1X e le cellule sono state fissate con una soluzione di para-formaldeide al 4% per 15 minuti. I vetrini sono stati lavati tre volte con PBS 1X, e le membrane cellulari sono state rese permeabili incubando i vetrini in una soluzione di PBS 1X, 0,1% di Triton X-100 per 8 minuti. Le cellule sono state nuovamente lavate tre volte con PBS 1X e sono state incubate con l'anticorpo primario per 16 ore a 4°C. I vetrini sono stati lavati tre volte con PBS 1X e sono stati incubati con l'anticorpo secondario per 20 minuti a temperatura ambiente. A 5 minuti dalla fine dell'incubazione dell'anticorpo secondario è stato aggiunto il colorante Hoechst, che si lega ai nuclei ed emette una fluorescenza di colore blu.

Risorse web

MirBase	www.mirbase.org
UCSC	http://genome.ucsc.edu
Allen Brain Atlas	www.brain-map.org
BioGPS	http://biogps.gnf.org
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de
TargetScan	www.targetscan.org
microRNA expression	www.mirz.unibas.ch
TESS	www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess

RISULTATI

Il silenziamento di Argonata 2 riduce i livelli di proteina APP in neuroni ippocampali

L' esperimento preliminare per valutare il ruolo dei microRNA sull'espressione dell'APP nell'ippocampo, e' stato interferire con il complesso ribonucleoproteico che media l'azione dei microRNA. Mediante la dissezione e messa in coltura di neuroni ippocampali di embrione di ratto, è stato riprodotto un sistema modello in vitro di tale popolazione cellulare contenente una piccola componente gliale. Dal momento della messa in coltura, nel corso del tempo i neuroni sviluppano prolungamenti funzionali e connessioni sinaptiche, e giungono a manifestare un fenotipo paragonabile a quello di un neurone maturo, in termini di morfologia, espressione di marcatori proteici e responsività agli stimoli. I neuroni ippocampali di ratto a 13 giorni in vitro (DIV) sono stati trasdotti con il vettore lentivirale pLKO.1 puro, che esprime un shRNA disegnato per silenziare in maniera specifica l'RNA messaggero di Argonata 2. Le cellule sono state raccolte dopo 72h dall'infezione per l'analisi di proteine e dell'RNA.

I livelli di mRNA di AGO2 sono stati quantificati mediante Real-Time Q-PCR, e come si può vedere dalla figura 9A, il silenziamento ottenuto è di circa il 60%, confrontato con il campione delle cellule trasdotte con il vettore SHC0002, esprimente un siRNA di controllo che non riconosce sequenze bersaglio nel genoma di ratto.

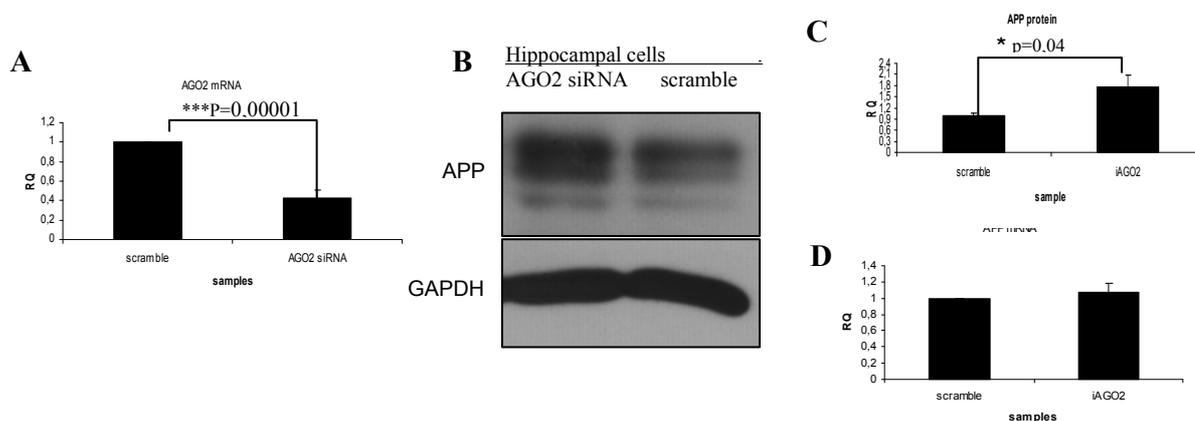


Figura 9. APP è regolata da Argonata 2. A) quantificazione relativa dell'mRNA di AGO2 mediante Real-Time Q-PCR, nelle cellule silenziate per AGO2, confrontate con cellule trasdotte con SHC0002 (scramble); B) Western blot rappresentativo di APP, rivelato con anticorpo 4G8, nelle cellule silenziate per AGO2, GAPDH è stata utilizzata come controllo di caricamento; C) quantificazione della proteina di APP al pannello B; D) livelli di mRNA di APP nelle cellule infettate con vettore di controllo e vettore silenziante AGO2. Gli istogrammi mostrano la media di almeno tre esperimenti \pm DS; la significatività statistica è calcolata mediante t-test ed è indicata per ogni variazione in termini di valore p.

Tra i microRNA predetti avere sequenze bersaglio nel 3'UTR del mRNA dell' APP, il microRNA-101 è un microRNA altamente conservato (da MirBase), i suoi siti putativi di legame sul 3'UTR di APP sono conservati (Fig. 10), ed è descritto come espresso ubiquitariamente ma arricchito nel sistema nervoso. Dal confronto tra l'omologo murino del pri-miR-101a e la banca dati di sequenze espresse (EST), è stato identificato il trascritto primario del piccolo RNA, corrispondente al trascritto E130102H24RIK, noto come lungo RNA non codificante specifico del sistema nervoso centrale (Mercer T.R et al. 2008).

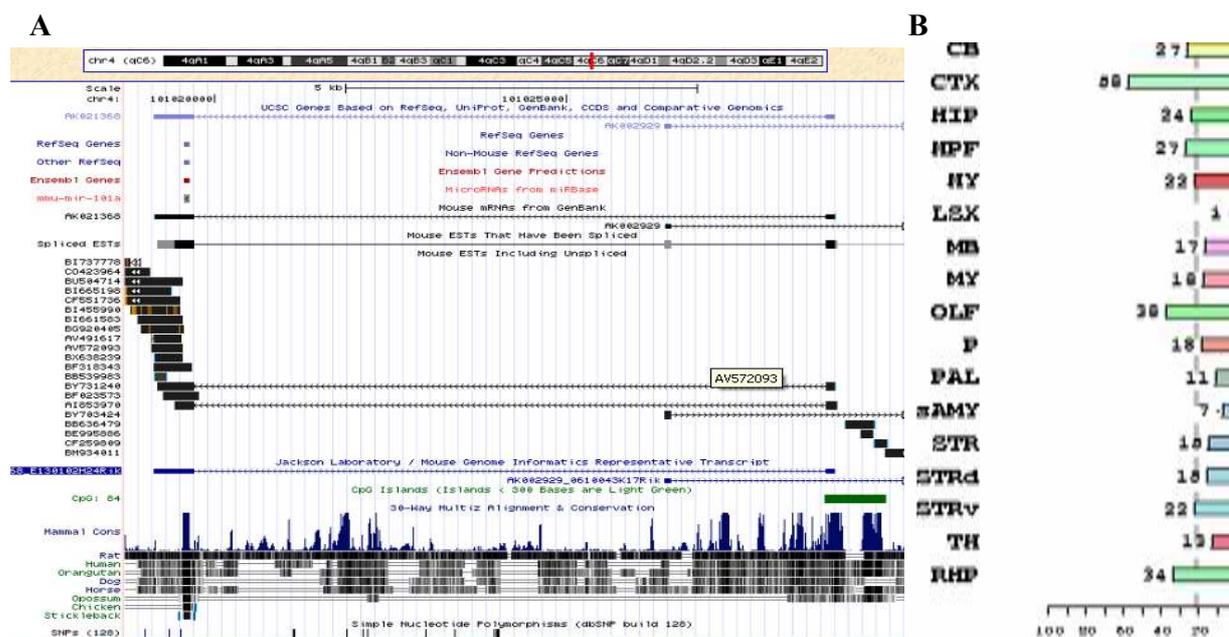


Figura 11. Trascritto primario del microRNA. A) locus corrispondente al pri-miR-101a. B) Livelli relativi di espressione del trascritto E130102H24RIK in diverse aree cerebrali, determinati mediante ibridazione in situ e densitometria dei segnali ottenuti. CB cerebellum, CTX cerebral cortex, HIP hippocampal region, HPF hippocampal formation, HY hypothalamus, LSX lateral septal complex, MB midbrain, MY medulla, OLF olfactory bulb, P pons, PAL pallidum, sAMY striatum-like amygdalar nuclei, STR striatum, STRd striatum dorsal region, STRv striatum ventral region, TH thalamus, RHP retrohippocampal region (adattato da ALLEN BRAIN ATLAS).

APP e miR-101 sono espressi in ippocampo con andamento antiparallelo

Selezionato il microRNA-101 come buon candidato, sono stati realizzati una serie di esperimenti per caratterizzare più dettagliatamente il profilo di espressione del miR-101 nel sistema nervoso, in particolare durante la sua maturazione, e con particolare attenzione al confronto con il profilo di espressione dell'APP.

Come si può osservare nella figura 12, la proteina APP appare diminuire nell'ippocampo di ratto da 8 giorni a 1 mese di età, per poi mantenersi su livelli simili di espressione fino allo

stato adulto nell'animale di 6 mesi, mentre il messaggero di APP appare avere un andamento sostanzialmente scorrelato dalla proteina (figura 12B), suggerendo la presenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionale della quantità di prodotto proteico finale.

Il microRNA-101 appare invece aumentare durante il periodo di tempo preso in esame, come mostrato in figura 12C, accompagnato da un parallelo incremento del suo trascritto primario (fig. 12D). Dal confronto in figura 12E si può osservare il sostanziale antiparallelismo tra il microRNA-101 e la proteina precursore del peptide β -amiloide.

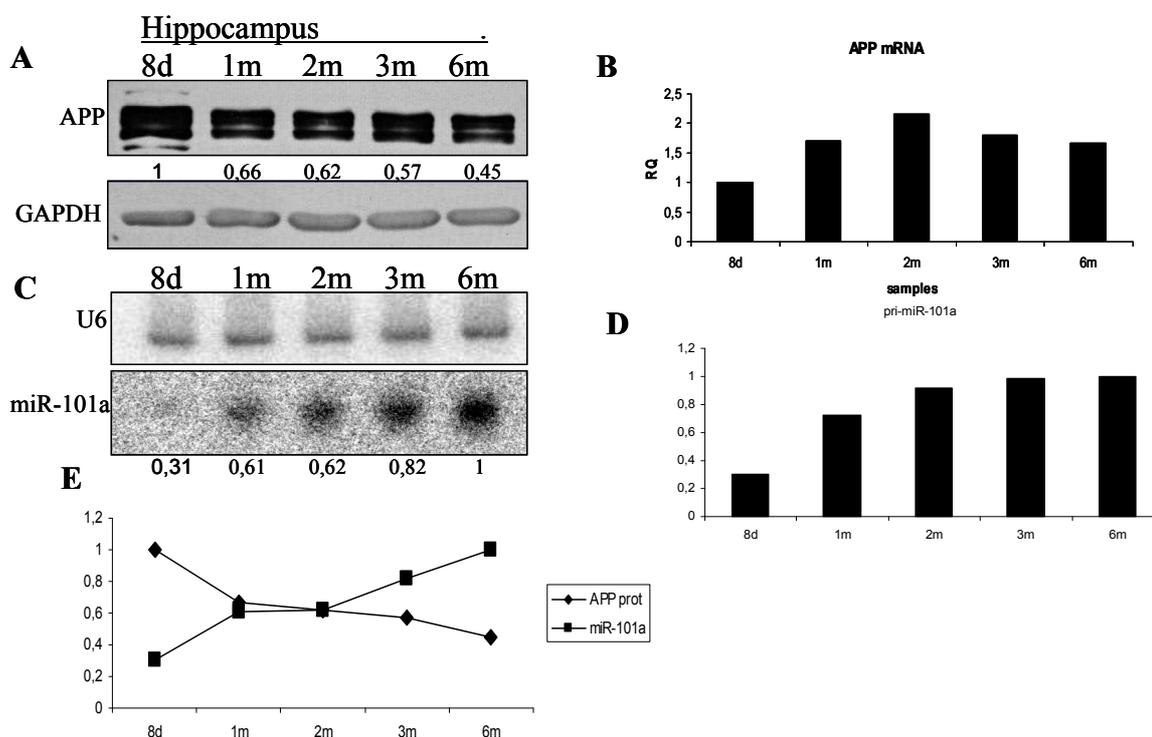


Figura 12. Profilo di espressione di miR-101 e APP in ippocampo di ratto da 8giorni a 6 mesi di età. A) immunoreattività per l'anticorpo anti-APP 4G8 in estratti proteici derivanti da ippocampi di ratti di 8 giorni, 1 mese, 2 mesi, 3 mesi e 6 mesi. In corrispondenza di ogni banda è riportata la quantificazione densitometrica di APP media di due serie indipendenti di tessuti (normalizzata rispetto a GAPDH, il valore massimo è stato posto uguale a 1;. B) mRNA di APP quantificato per Real Time Q-PCR nei medesimi tessuti al pannello A, normalizzati rispetto ai valori di espressione a 8 giorni. C) Northern blot ibridato con sonda anti-miR-101, sotto ogni banda è riportata la quantificazione densitometrica di miR-101 media di due serie indipendenti di tessuti (normalizzata rispetto a U6, il valore massimo è stato posto uguale a 1). D) Quantificazione mediante Real Time Q-PCR del trascritto primario del miR-101 E130102H24RIK. E) Confronto tra il profilo di espressione della proteina APP e miR-101 maturo.

L'espressione del MiR-101 e della proteina APP è stata analizzata anche nelle colture di neuroni ippocampali durante lo sviluppo *in vitro* da 2 a 17 giorni.

In questo sistema modello è stato osservato un analogo profilo di espressione della proteina APP che viene down-regolata, mentre si osserva un incremento del microRNA-101 (Fig. 13).

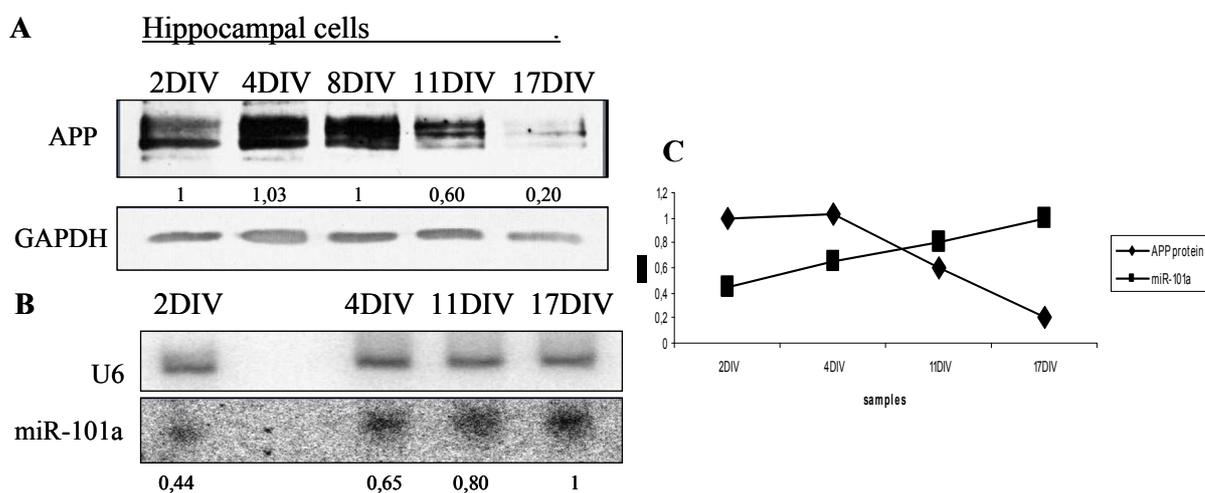


Figura 13. Profilo di espressione della proteina APP e del microRNA-101 in colture primarie di neuroni ippocampali di ratto. A) Western blot per APP e relativa quantificazione normalizzata (come in fig.12). B) Northern blot e relativa quantificazione normalizzata. C) Confronto tra proteina APP e miR-101.

miR-101 lega e regola negativamente il 3'UTR di APP

Nel 3'UTR di APP sono presenti due siti putativi di legame per il microRNA (Fig. 14A). Per verificare l'interazione diretta tra il miR-101 e il messaggero di APP, cellule PC12 coltivate in monostrato sono state trasfettate con il plasmide pSSG-APP contenente il 3'UTR di APP umana a valle della sequenza codificante per la luciferasi di Firefly e molecole di RNA sintetico che mimano il miR-101 maturo. La cotrasfezione del miR-101 riduce l'attività della luciferasi, quindi la sua traduzione, del 40% paragonata rispetto al controllo.

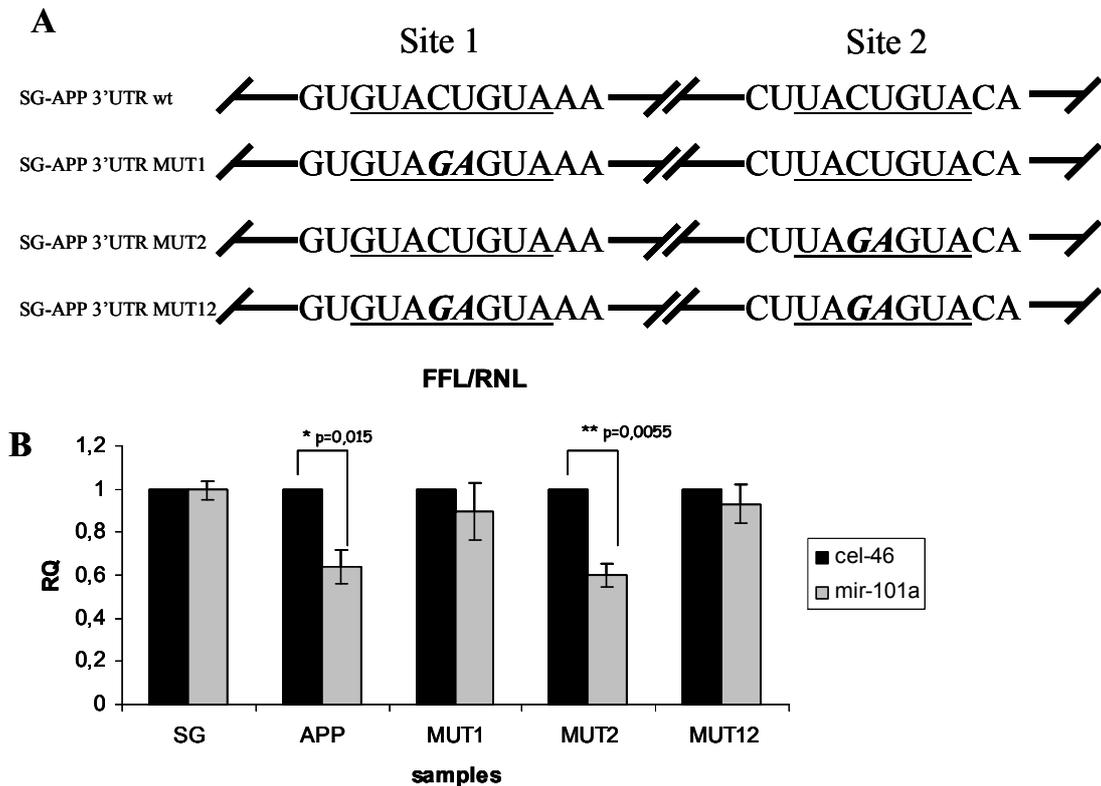


Figura 14. Interazione diretta tra il miR-101 e il 3'UTR di APP. A) Dettaglio dei costrutti reporter utilizzati: i due siti di legame corrispondenti alla regione seed del miR-101 (sottolineati), sono stati mutati sostituendo le basi in posizione 4 e 5 del microRNA (corsivo grassetto), così da abolire la possibilità di legame. B) Effetto della cotrasfezione del miR-101 sull'attività del reporter luciferasi. L'intensità di luminescenza del reporter firefly è stata normalizzata rispetto alla luminescenza emessa dalla luciferasi renilla, espressa da un plasmide cotrasfettato come controllo interno di trasfezione. Il rapporto di questi due valori, in presenza del miR-101, è stato normalizzato rispetto al controllo trasfettato con cel-46, un miR non correlato usato come controllo. SG: vettore firefly senza 3'UTR, APP: vettore con 3'UTR di APP umana, MUT1 MUT2 e MUT12 mutanti come da pannello A.

Per verificare che l'effetto di inibizione della traduzione del reporter è dovuto al legame diretto del miR sul 3'UTR, sono stati generati mutanti sito-specifici per i due singoli siti di legame e un mutante per entrambi i siti. La mutazione e quindi l'abolizione del sito 1 determina una reversione pressochè completa dell'effetto inibitorio del miR-101, mentre la mutazione del sito 2 non ha un effetto sensibile sul livello di traduzione del reporter. La mutazione di entrambi i siti abolisce l'inibizione similmente alla mutazione del singolo sito 1. Tutto ciò mostra che, nel sistema biologico utilizzato, le cellule PC12 di ratto, il sito 1 è legato direttamente e specificamente dal miR-101 con una conseguente inibizione traduzionale, mentre il sito 2 non interagisce col microRNA in maniera determinante.

miR-101 modula la traduzione della proteina APP endogena

Per valutare se miR-101 puo' regolare i livelli di APP endogena colture primarie di neuroni ippocampali a 3 DIV sono state trasfettate con molecole anti-miR, capaci di interferire specificamente con il miR-101. Le cellule sono state analizzate a 7 DIV e l'analisi delle proteine mediante western blotting, dimostra che l'inibizione del miR-101 induce un aumento nelle colture dell'espressione della proteina APP endogena (Fig 15A).

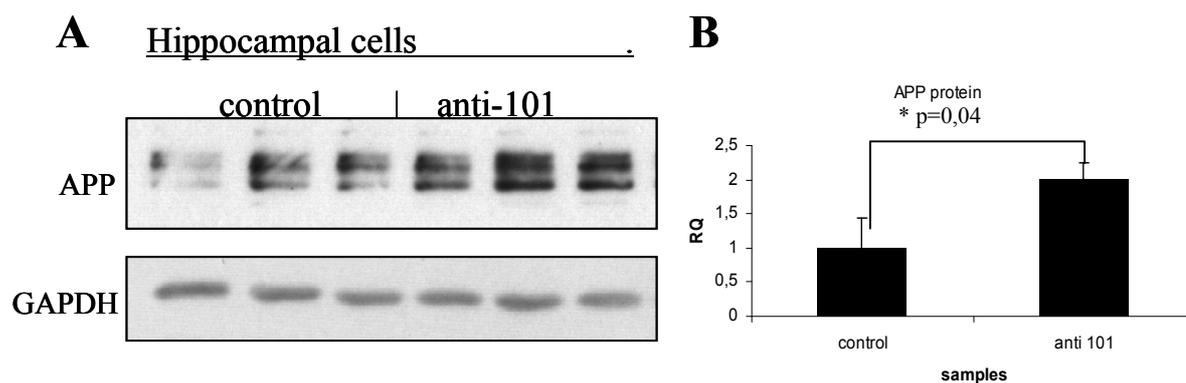


Figura 15. Inibizione del miR-101 endogeno in colture primarie di neuroni ippocampali di ratto. A) Western blot per APP (anticorpo 4G8) in cellule trasfettate con una molecola di controllo e l'anti-miR-101. Le tre repliche mostrate per ogni gruppo derivano da tre campioni differenti. B) quantificazione dell'esperimento al pannello A.

Per ottenere una over-espressione del miR-101, sono stati invece generati ed utilizzati dei vettori di espressione lentivirali. L'infezione dei neuroni ippocampali in coltura con un vettore lentivirale esprimente il microRNA-101 determina una riduzione dei livelli della proteina APP endogena di circa il 50% (Fig. 16A), senza produrre alcun effetto significativo sull'RNA messaggero (Fig. 16C), confermando un effetto di tipo post-trascrizionale.

Come controllo dell'attività del microRNA-101 espresso dal vettore lentivirale, è stata analizzata l'espressione della cicloossigenasi 2 (COX2), descritta in letteratura come target già validato del miR-101 (Chakrabarty et al. 2007); la proteina COX2 appare ridotta del 34%, indicando l'efficacia del miR espresso di regolare modulare un target fisiologico (Fig. 16D).

Per escludere una riduzione della proteina APP intera dovuta ad un'alterazione del suo processamento, sono state analizzate anche la porzione extracellulare dell'APP e le fibrille di β -amiloide presenti nel mezzo di coltura. Come mostrato in figura 16, pannelli E ed F, anche i prodotti di processamento dell'APP risultano fortemente ridotti nelle colture cellulari trasdotte col vettore lentivirale over-esprimente miR-101.

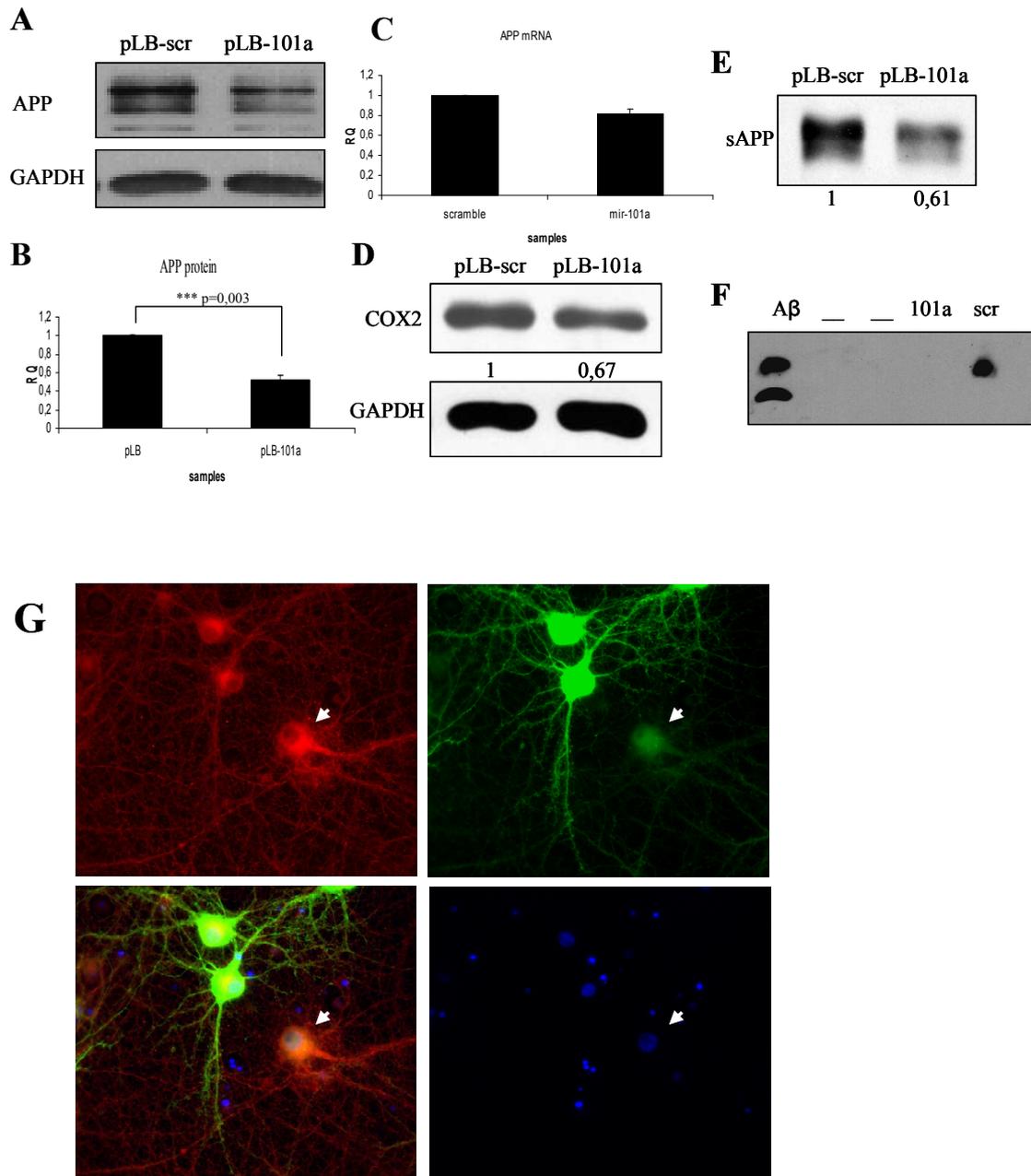


Figura 16. Overespressione del miR-101 in neuroni ipocampali di ratto. A) Western blot rappresentativo per l'espressione di APP (anticorpo 4G8) in cellule ipocampali di ratto infettate con pLB-miR-101, confrontate con il controllo infettato con pLB-SCH0002, esprime un piccolo RNA incapace di legare alcun messaggero. B) Media della quantificazione di tre repliche sperimentali indipendenti analoghe all'esperimento in A. C) Livelli di espressione del mRNA di APP in cellule over-esprementi miR-101 e controllo, quantificati mediante Real Time Q-PCR, media \pm DS di tre esperimenti indipendenti di real time Q-PCR. D) Western blot per la proteina COX2 con quantificazione normalizzata rispetto a GAPDH. E) Western blot per la porzione N-terminale dell'APP secreto nel mezzo di coltura (anticorpo anti-APP 22C11). F) Western blot per il peptide β -amiloide ottenuto dalle fibrille insolubili nel mezzo di coltura dei neuroni ipocampali. G) Immunofluorescenza per APP (in rosso), le cellule in verde esprimono GFP e sono positive per l'infezione con pLB-miR-101, in blu (colorazione Hoechst) sono visualizzati i nuclei per controllo di integrità; in basso a sinistra è mostrata la sovrapposizione delle tre immagini.

L'effetto dell'over-espressione del microRNA tramite vettore lentivirale è stata verificata anche tramite immunofluorescenza e l'immagine di un campo rappresentativo è mostrata in figura 16 pannello G; come si può osservare, le cellule positive per la fluorescenza verde, dovuta alla produzione di GFP codificata nel vettore pLB-miR-101, mostrano una minore intensità di fluorescenza per il rosso, con cui è stata evidenziata la proteina APP; la cellula indicata dalla freccia, negativa per la GFP (la lieve fluorescenza è attribuibile ad un segnale di fondo della preparazione cellulare), mostra una maggiore intensità di segnale per APP.

Il mediatore dell'infiammazione IL-1 β modula miR-101 influenzando i livelli di APP

Le colture di neuroni ippocampali di ratto, sono state sottoposte a trattamento con Interleuchina-1 β e raccolte a diversi tempi di trattamento, a 4, 6 e 8 ore per la successiva analisi dei livelli di espressione di APP e miR-101.

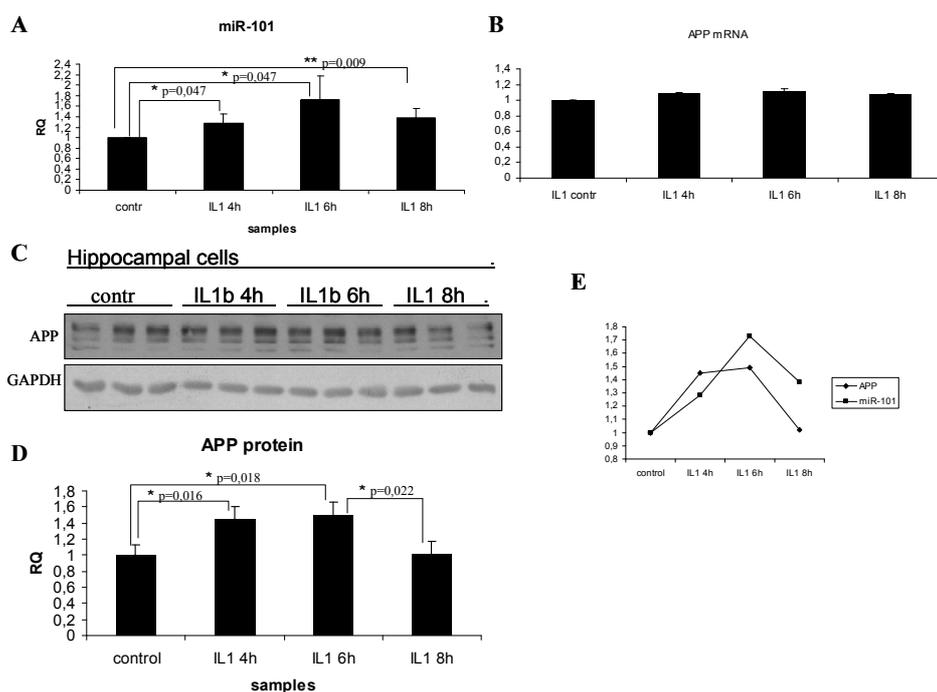


Figura 17. Effetto dell'Interleuchina-1 su miR-101 e APP. A) livelli di espressione del microRNA-101 quantificati mediante Real Time Q-PCR a 4, 6 e 8 ore di trattamento con IL-1 β (10 ng/ml), paragonati con i campioni di controllo non trattati, media \pm DS di tre esperimenti indipendenti; B) media \pm DS dei livelli di mRNA di APP ai medesimi tempi di trattamento, misurati mediante real time Q-PCR. C) Western blot per la proteina APP (anticorpo 4G8), ogni triplicato deriva da tre campioni diversi per ogni gruppo. D) Medie della quantificazione dei segnali al pannello C. E) Confronto tra l'andamento del microRNA-101 e la proteina APP.

Come si può osservare in figura 17A, il microRNA risulta indotto in seguito a trattamento con IL-1 β , con un picco di espressione massima intorno alle 6 ore di trattamento, per poi ridiminuire in tempi successivi. Riguardo APP, nonostante non sia osservabile alcuna sensibile variazione dei livelli di RNA messaggero (Fig. 17B), la proteina mostra un incremento di circa il 50% già a 4 ore di trattamento, per poi tornare sui valori iniziali entro le 8 ore di trattamento (Fig. 17C e D).

In figura 17E è schematizzato il confronto tra le curve di induzione di miR-101 e APP, le quali risultano essere sfalsate nel tempo, con il picco di induzione di APP più precoce rispetto al picco di espressione della proteina APP.

Vista la modulazione coordinata nel tempo di miR-101 ad opera dell'IL-1 β , è stata condotta una analisi in silico del promotore putativo del microRNA. Dalla banca dati genomica accessibile tramite il sito dell'UCSC, è stata scaricata la sequenza nucleotidica di 2000 paia di basi a monte dell'inizio di trascrizione del trascritto primario di miR-101, una regione ragionevolmente ampia da contenere tutti gli elementi fondamentali del promotore di un microRNA (Saini H.K et al. 2007), ed analizzata tramite il programma di predizione di siti di legame per fattori di trascrizione TESS.

In figura 18 è riportata una rappresentazione schematica dei siti putativi per fattori di trascrizione, selezionati in base al punteggio di bontà attribuito dall'algoritmo stesso del software per il sito legame, e per la conservazione filogenetica della sequenza.

Nella regione prossimale al sito di inizio di trascrizione è presente una regione CpG, caratteristica tipica di un promotore di polimerasi II, e generalmente considerata regione d'elezione per il legame di fattori di trascrizione.

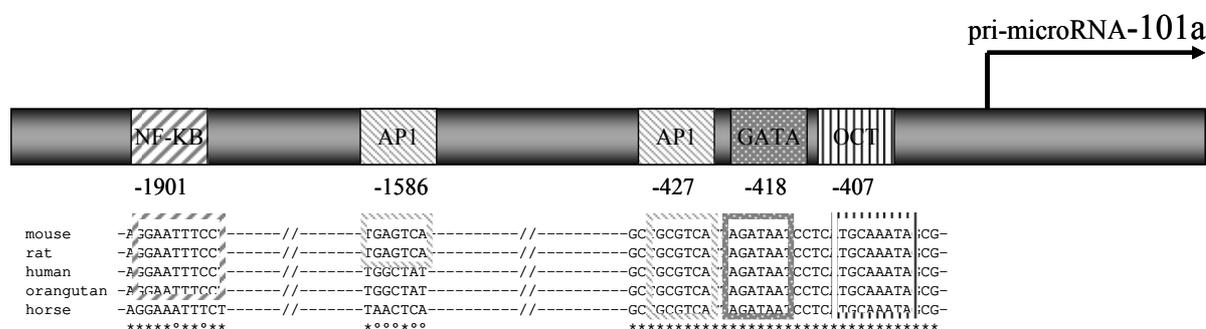


Figura 18. Rappresentazione schematica del promotore ipotetico del pri-miR-101. In basso sono mostrati degli estratti della sequenza genomica e il confronto tra diversi mammiferi; gli asterischi indicano conservazione al 100%, i circoletti una conservazione parziale. I riquadri tratteggiati delimitano il sito di legame per il fattore di trascrizione sovrastante. Le distanze non sono in scala .

DISCUSSIONE

Lo studio qui presentato, dimostra che in neuroni ippocampali la traduzione dell'mRNA di APP è regolata da AGO2 e dall'interazione diretta con il miR-101.

La prima osservazione descrive l'aumento dei livelli della proteina APP in seguito al silenziamento di AGO2. Questi dati suggeriscono che l'espressione di APP sia dipendente dalla funzione di AGO2 e che le altre proteine Argonata, i cui livelli di espressione non variano nelle cellule silenziate per AGO2 (dati non mostrati), non possono compensare per la sua assenza. Il grado di specializzazione delle quattro proteine Argonata non è ancora stato definito in dettaglio nei mammiferi, anche se sono stati isolati mRNA bersaglio legati specificamente ad AGO1 o AGO2 (Beitzinger M. et al 2007). Poiché la riduzione di AGO2 nei neuroni ippocampali non produce variazioni nei livelli di mRNA dell'APP, è possibile escludere un effetto indiretto mediato da fattori di trascrizione che intervengono sul promotore di APP; d'altra parte, non si può escludere che AGO2 influenzi anche altre proteine coinvolte nel metabolismo del precursore del peptide β -amiloide.

I dati ottenuti e descritti in questa tesi, mettono in campo come nuovo protagonista il microRNA-101, il quale gioca il ruolo di regolatore diretto dei livelli di APP. Infatti, dagli esperimenti di cotrasfezione del miR-101 con il reporter luciferasico con a valle il 3' UTR di APP, emerge la capacità del miR di interagire direttamente e specificamente con il primo sito nel 3'UTR. Ciò non esclude che il secondo sito possa essere responsivo al microRNA in un contesto neuronale, caratterizzato dalla presenza di differenti proteine leganti l'RNA che possono alterare la struttura secondaria dell'mRNA e l'accessibilità delle sequenze. Del resto, è ben noto che la regione 3'UTR di APP può essere legata da diversi complessi proteici che ne influenzano la stabilità e traduzione (Zaidi S.H.E. & Malter J.E. 1994; Westmark P.R. 2006; Amara F.M. et al 1999; Mbella E.G.M. 2000). E' anche possibile ipotizzare che l'effetto regolatorio di questi complessi proteici, non approfonditamente indagata dagli scopritori, possa coinvolgere i microRNA alterando l'accessibilità ai possibili siti di legame. Tramite gli esperimenti di inibizione del miR-101 endogeno, e della sua overespressione, nelle colture primarie ippocampali di ratto, è qui stata dimostrata l'attività regolatoria del miRNA sull'APP nel contesto neuronale, indicando quindi che la sua azione è significativa nel determinare i livelli di proteina APP nonostante gli ulteriori, e numerosi, meccanismi di regolazione esistenti. E' da sottolineare che l'overespressione del miR-101 riduce nei neuroni ippocampali sia i livelli di $A\beta$ fibrillare che quelli della proteina ciclossigenasi-2. L'accumulo di $A\beta$ oligomeri e fibrille è uno degli elementi caratteristici della patologia di

Alzheimer; la proteina COX2 e' essenziale per la sintesi della prostaglandina E2, un potente induttore dell'infiammazione ed elevati livelli di PGE2 e COX2 sono coinvolti nella progressione della patologia di Alzheimer (Kitamura Y et al., 1999; Montine TJ et al, 1999) . Infine PGE2 stimola la produzione di A β (Hoshino T et al 2007). Considerando che una diminuzione dell'espressione del miR-101 e' stata recentemente descritta in cervelli di pazienti affetti da patologia di Alzheimer (Hebert et al., 2008), sar  importante valutare se alterazioni dei livelli del miR-101 siano coinvolti nell'eziopatogenesi o intervengano nel corso della malattia innescando un feedback positivo che pu  esacerbare la neurodegenerazione.

Dall'analisi del profilo di espressione di miR-101 e APP nel corso del tempo, emerge l'indicazione che durante lo sviluppo il microRNA possa accompagnare il raggiungimento dei livelli fisiologici di proteina APP, per poi instaurare un rapporto di equilibrio dinamico tra le due molecole, sensibile a stimolazioni provenienti da vie di trasduzione del segnale attivabili da fattori intra ed extra-cellulari.

Nel caso specifico,   stata descritta una modulazione coordinata di miR-101 e APP in seguito a somministrazione di Interleuchina-1, principale mediatore dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale. Come gi  descritto, son gi  noti meccanismi di modulazione post-trascrizionali controllati dall'Interleuchina-1 a carico del messaggero di APP, in particolare a livello della regione 5'UTR dove una sequenza responsiva al ferro, in seguito a stimolazione con IL-1, induce un aumento della traduzione di APP entro poche ore dal trattamento, con un successivo e rapido ritorno di APP ai livelli basali (Rogers J.T. et al. 1999).

In questo lavoro di tesi, tale meccanismo viene riprodotto, con un aumento consistente della proteina APP gi  dopo 4 ore di IL-1, inserendo un nuovo componente, il miR-101, il quale viene a sua volta indotto con un picco di espressione intorno alle 6 ore di trattamento. Da notare la differenza tra i tempi di risposta di APP e miR-101, dove quest'ultimo viene indotto con ritardo rispetto al suo target.

Un modello del meccanismo sottostante a tale regolazione pu  collocare il microRNA come fattore limitante l'induzione di APP, la quale deve avere una durata e attivit  delimitata nel tempo, per cui lo spegnimento della risposta viene determinato dal venire a mancare del fattore inducente, sommato al reclutamento di un inibitore della traduzione.

Un circuito di "feedback" di questo tipo pu  trovare spiegazione nel coinvolgimento di fattori di trascrizione attivati a valle della via dell'IL-1. Un fattore su cui rivolgere l'attenzione   fos, componente proteico del fattore di trascrizione AP1 attivato da IL-1, che   stato dimostrato essere target di mir-101 (Li S. et al. 2009). All'interno del promotore

presunto del trascritto primario di miR-101, è possibile identificare almeno due siti di legame per AP1, ed AP1 è noto essere uno dei primi fattori di trascrizione attivati dall'Interleuchina-1, in un lasso di tempo che va da poche decine di minuti a poche ore (Srinivasan D. et al. 2004; Ericsson A. et al. 1994). La sua attivazione precoce potrebbe spiegare l'aumento di produzione del microRNA-101, il quale a sua volta andrebbe poi a reprimere i suoi target naturali, tra cui APP e fos stesso, andando a spegnere il circuito. Come già sottolineato questo studio e lavori precedenti dimostrano che miR-101 regola anche la cicloossigenasi 2 (Strillacci A. et al. 2009), altro enzima chiave nei processi infiammatori e la cui over-espressione è stata correlata con l'AD (Oka A. & Takashima S. 1997; Lukiw WJ & Bazan NG. 1997).

L'utilizzo di farmaci antinfiammatori in sperimentazione clinica ha fornito risultati contrastanti, in quanto se la somministrazione di tali farmaci sembra avere un effetto di prevenzione dell'insorgenza della patologia, in altri casi l'inibizione della risposta infiammatoria sembra ridurre l'efficienza di rimozione del peptide β -amiloide (Martin B.K. et al. 2008), suggerendo quindi che la risposta infiammatoria sia un meccanismo di risposta fisiologica e protettiva per il sistema nervoso, che a causa di un disequilibrio dei suoi mediatori, causato da fattori ambientali o genetici, può convergere verso la via patologica. Inoltre, gli oligomeri e le fibrille di peptide β -amiloide prodotti dal processamento di APP, sono in grado di interagire con recettori di superficie cellulare (Yan S.D. 1996), attivare la microglia (Rogers J. & Lye L.F. 2001) e stimolare la produzione di IL-1 (Lue L.F. 2001), intensificando il processo infiammatorio e promuovendo ulteriormente la progressione della patogenesi.

In questo scenario, il miR-101 si riveste del ruolo di "interruttore molecolare" di un sistema importantissimo nella difesa cellulare e risposta al danno in seguito a traumi, infezioni, ecc., ed è interessante porsi la domanda se una perturbazione di questo microRNA può essere sufficiente per spingere il sistema verso una aumentata amiloidogenesi ed in ultima analisi nel promuovere la patologia di Alzheimer. Si ricorda inoltre il fatto che è stata dimostrata l'importanza dell'IL-1 in ippocampo nell'instaurarsi dei meccanismi di LTP (Schneider H. et al. 1998), e che una alterazione del sistema da essa attivato potrebbe giocare un ruolo nel deficit di apprendimento e memoria, in cui l'LTP è fondamentale, osservato nei pazienti AD. Lo sviluppo futuro di questo lavoro si prefigge lo scopo di andare ad analizzare in dettaglio la via di trasduzione del segnale attivata nel contesto neuronale dall'IL-1 e che coinvolge il miR-101 e APP, e verificare sperimentalmente il modello qui proposto.

BIBLIOGRAFIA

Abelson J.F., Kwan K.Y., O’Roak B.J., Baek D.Y., Stillman A.A. et al. (2005). Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette’s syndrome. *Science* 310:317-320.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383-421.

Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{-/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42: 947–959, 2004.

Alzheimer, A. (1907). Über einen eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 64, 146–148

Amara FM, Junaid A, Clough RR, Liang B. TGF-beta(1), regulation of alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71(1):42–9.

Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J. and Tuschl T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 2003; 5, 337-350

Ashraf SI., McLoon AL., Sclarsic SM., Kunes S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124:191-205

Athanasiadis A, Rich A & Maas S (2004). Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS Biol* 2, e391.

Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A. The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84: 775–790, 2002.

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005;122:553–563

Bass BL (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71, 817–846.

Basu A, Krady JK, Levison SW: Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 2004, 78(2):151-156.

Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J.Y., Kremmer, E., Meister, G.(2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol.* 4:76–84

- Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19: 1635–1655, 2005
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 2006;20:1885–1898
- Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y & Khrestchatsky M (1999). Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci* **11**, 604–616.
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D. & Tanzi, R. E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature Genet.* 39, 17–23 (2007).
- Berube NG, Mangelsdorf M, Jagla M, Vanderluit J, Garrick D., Gibbons RJ, Higgs DR, Slack RS, Picketts DJ. The chromatin remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J Clin Invest* 115: 258–267, 2005
- Bilen J., Liu N., Burnett BG., Pittman RN., Bononi NM. (2006). MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* 24(1):157-163.
- Blessed, G., Tomlinson, B.E., and Roth, M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry* 114, 797–811.
- Blow MJ, Grocock RJ, van Dongen S, Enright AJ, Dicks E, Futreal PA, Wooster R & Stratton MR (2006). RNA editing of human microRNAs. *Genome Biol* **7**, R27.
- Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ: Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* 2001, 21(15):5528-5534.
- Breder C. D., Dinarello C. A. and Saper C. B. (1988) Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science (New York, NY)* 240, 321–324.
- Brion, J.P., Passareiro, H., Nunez, J., and Flament Durand, J. (1985). Mise en évidence de la immunologique de la protéine tau au lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie Alzheimer *Arch. Biol. (Brux)* 95, 229–235
- Cacabelos R., Barquero M., Garcia P., Alvarez X. A. and Varela de Seijas E. (1991) Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta (IL-1 beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13, 455–458.

Cai X. et al. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10, 1957-1966

Cao X., Yeo G., Muotri A.R., Kuwabara T., Gage F.H. (2006). Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System. *Neuroscience* 29:77-103.

Carmeliet P., Van Damme J. and Denef C. (1989) Interleukin-1 beta inhibits acetylcholine synthesis in the pituitary corticotropic cell line AtT20. *Brain Res.* 491, 199–203.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559–1563, 2005.

Carthew R.E. and Sontheimer E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009 February 20; 136(4): 642–655

Cerutti, L., Mian, N., and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25, 481–482.

A. Chakrabarty, S. Tranguch, T. Daikoku, K. Jensen, H. Furneaux, S.K. Dey, MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 15144–15149

Chakravarty, S. & Herkenham, M. Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J. Neurosci.* 25, 1788–1796 (2005).

Chang T.C. and Mendell J. T. (2007). microRNAs in Vertebrate Physiology and Human Disease. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 8:215-39

Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC & Nishikura K (2000). A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA* 6, 755–767.

Chendrimada T.P. et al. TRBP recruits Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436, 740-744

Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammanna H, Helt G, Sementchenko V, Piccolboni A, Bekiranov S, Bailey DK, Ganesh M, Ghosh S, Bell I, Gerhard DS, Gingeras TR. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308: 1149–1154, 2005.

Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs. *Neuron* 46: 363–367, 2005

Chu, C. Y. & Rana, T. M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 4, e210 (2006).

Cogswell, J.P. et al. (2008) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.* 14, 27–41

Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Kozus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25: 10379–10389, 2005.

Conaco C., Otto S., Han JJ., Mandel G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:2422-2427.

Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945, 2004.

Consortium TCeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018, 1998

Crutcher, K.A., Gendelman, H. E., Kipnis, J. Perez-Polo, J. R., Perry, V. H., Popovich, P. G., Weaver, L. C., Debate: "is increasing neuroinflammation beneficial for neural repair?" *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006. 1(3): p. 195-211.

- Davies W, Isles AR, Wilkinson LS. Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 421–430, 2005
- Denli AM et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 2004; 432, 231-235
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):387-90.
- Dewji N.N., Do C. and Bayney R.M. (1995) Transcriptional activation of Alzheimer's β -amyloid precursor protein gene by stress. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 33, 245-253.
- Dewji N.N. & Do C. (1996) Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's β -amyloid precursor protein gene in response to stress. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 35, 325-328
- Diederichs, S. & Haber, D. A. Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108 (2007)
- Dimauro S. Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 1659: 107–114, 2004.
- Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 37: 222–232, 2005.
- Dinarello C. A. (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, S1–S13.
- Ding XC, Grosshans H. Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J.* 2009
- Du T., Zamore P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132, 4645-4652.
- Dunn AJ: Cytokine activation of the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917(1):608-617.
- Engstrom PG, Suzuki H, Ninomiya N, Akalin A, Sessa L, Lavorgna G *et al.* (2006). Complex loci in human and mouse genomes. *PLoS Genet* 2, e47.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1994) A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stressrelated neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897–913.
- Essen-Moller, E. (1946). A family with Alzheimer's disease. *Acta. Psychiatr. Neurol. Scand* 21, 233–244

- Faghigi, M.A. et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of b-secretase. *Nat. Med.* **14**, 723–730 (2008).
- Farrar W. L., Kilian P. L., Ruff M. R., Hill J. M. and Pert C. B. (1987) Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J. Immunol.* **139**, 459–463.
- French R. A., VanHoy R. W., Chizzonite R., Zachary J. F., Dantzer R., Parnet P., Bluthe R. M. and Kelley K. W. (1999) Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J. Neuroimmunol.* **93**, 194–202.
- Fattal O, Budur K, Vaughan AJ, Franco K. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. *Psychosomatics* **47**: 1–7, 2006.
- Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P, Kohtz JD. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev* **20**: 1470–1484, 2006.
- Filippov V. et al. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* **2000**; **245**, 213-221
- Fiore R., Siegel G., Scharatt G. (2007). MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *BBA* **12.006**
- Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet* **13**: 894–897, 2005.
- Fukumoto, H. et al. (2002) b-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 1381–1389
- Furuno M, Pang KC, Ninomiya N, Fukuda S, Frith MC, Bult C *et al.* (2006). Clusters of internally-primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet* **2**, e37.
- Gatz, M. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**, 168–174 (2006).
- Gelbard HA (2004). Synapses and sisyphus: life without paraplegin. *J Clin Invest* **113**, 185–187.
- Gibson RM, Rothwell NJ, Le Feuvre RA: CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *Vet J* **2004**, **168**(3):230-237.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **2006**; **312**:75–79.

Glaccum M. B., Stocking K. L., Charrier K., Smith J. L., Willis C. R., Maliszewski C., Livingston D. J., Peschon J. J. and Morrissey P. J. (1997) Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J. Immunol.* 159, 3364–3371.

Glezer, I., Chernomoretz, A., David, S., Plante, M. M. & Rivest, S. Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation. *PLoS ONE* 2, e310 (2007).

Glezer, I., Simard, A. R. & Rivest, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867–883 (2007).

Goedert, M., (1987) Neuronal localization of amyloid β protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. *EMBO J*, 7, 367-372

Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease, identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4051–4055.

Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15(1): 45–49.

Goodstadt L, Ponting CP. Phylogenetic reconstruction of orthology, paralogy, conserved synteny for dog and human. *PloS Comput Biol* 2: 1134–1150, 2006.

Gregory, R. I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432, 235–240

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C: Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86(19):7611-7615.

Griffin W. S., Liu L., Li Y., Mrak R. E. and Barger S. W. (2006) Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. *J. Neuroinflamm.* 3, 5.

Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83:470S-474S.

Grilli M. et al. (1995) Identification and characterization of a KB/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J.Biol.Chem.*, 270, 26774-26777

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.

Gwizdek C. et al. Exportin 5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 5505-5508

Haase, A. D. et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961–967 (2005).

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125:887–901

He L., Hannon G.J. MicroRNAs: small RNA with a big role in gene regulation. *Nat Rev Gen* 5, 522-531(2004)

Hebert, S.S. et al. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol. Dis.* www.sciencedirect.com 10.1016/j.nbd.2008.11.009

Hebert, S.S. et al. (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/bsecretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6415–6420

Hebert, S.S. et al. (2009) Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* Vol.32 No.4

Higgins GA, Olschowka JA: Induction of interleukin-1 beta mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1991, 9(1-2):143-148.

Holsinger, R.M. et al. (2002) Increased expression of the amyloid precursor b-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51, 783–786

Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C & Reenan R (2003). Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* 301, 832–836

Horai R., Asano M., Sudo K., Kanuka H., Suzuki M., Nishihara M., Takahashi M. and Iwakura Y. (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J. Exp. Med.* 187, 1463–1475.

Hoshino T, Nakaya T, Homan T, Tanaka K, Sugimoto Y, Araki W, Narita M, Narumiya S, Suzuki T, Mizushima T Involvement of prostaglandin E2 in production of amyloid-beta peptides both in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2007 Nov 9;282(45):32676-88. Epub 2007 Sep 2.

Houbaviy H.B et al. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA* 2005; 10, 1957-1966

Hsieh J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14: 461–469, 2004

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. Micro-RNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:16961–16966.

Inagaki S, Numata K, Kondo T, Tomita M, Yasuda K, Kanai A & Kageyama Y (2005). Identification and expression analysis of putative mRNA-like non-coding RNA in *Drosophila*. *Genes Cells* 10, 1163–1173.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals, evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267–1274.

Jander S., Schroeter M. and Stoll G. (2000) Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *J. Neuroimmunol.* 109, 181–187.

Jim P., Zarnescu DC., Cerman S., Nakamoto M., Mowrey J., Jongens TA., Nelson DL., Moses K., Warren ST. (2004). Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 7:113-117.

Jin P, Alisch RS & Warren ST (2004). RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6, 1048–1053.

Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y *et al.* (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7, 1167–1178.

Kapranov P, Drenkow J, Cheng J, Long J, Helt G, Dike S, Gingeras TR. Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res* 15: 987–997, 2005

Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick JS, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engstrom PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309: 1564–1566, 2005.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193.

- Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 360–365, 2004.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2005;6:376–385
- Kim V.N. et al. Genomics of microRNA. *Trends in genetics* 22(3), 165-173 (2006)
- Kim D. and Tsai L.H. Bridging Physiology and Pathology in AD. *Cell* 137, June 12, 2009
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 2007;129:1141–1151.
- Kitamura Y, Shimohama S, Koike H, Kakimura J, Matsuoka Y, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Taniguchi T. Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 27;254(3):582-6
- Klein ME, Impey S, Goodman RH. Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol* 15: 507–513, 2005.
- Kohr G, Melcher T & Seeburg PH (1998). Candidate editases for GluR channels in single neurons of rat hippocampus and cerebellum. *Neuropharmacology* **37**, 1411–1417
- Korneev S & O'Shea M (2005). Natural antisense RNAs in the nervous system. *Rev Neurosci* **16**, 213–222.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4044–4048.
- Lacroix, S., Feinstein, D. & Rivest, S. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol.* 8, 625–640 (1998).
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294, 853-858
- Lahiri D.K & Nall C. (1995) Promoter activity of the gene encoding the β -amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 32, 233-240

Lahiri D.K & Robakis N.K. (1991) The promoter activity of the gene encoding Alzheimer β -amyloid precursor protein (APP) is regulated by two block of upstream sequences. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 9, 253-257

Lahiri D.K Ge Y.W & Maloney B. Characterization of the APP proximal promoter and 5'-untranslated regions: identification of cell-type specific domains and implications in APP gene expression and Alzheimer's disease. 2005 *The FASEB Journal*

Lai E.C., Tomancak P., Williams R.W. and Rubin G.M. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol* 2003; 4:R42, 1-20

Lai F, Chen CX, Lee VM & Nishikura K (1997). Dramatic increase of the RNA editing for glutamate receptor subunits during terminal differentiation of clonal human neurons. *J Neurochem* **69**, 43–52.

Landthaler M. et al. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster and homolog are required for microRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 2004; 14, 2162-2167

Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., and Bartel D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294, 858-862

Laurencikiene J, Kallman AM, Fong N, Bentley DL & OhmanM (2006). RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO Rep* 7, 303–307.

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

Lee RC & Ambros V An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294, 862-864

Lee Y et al. The nuclear Rnase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425, 415-419

Lee Y et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23, 4051-4060

Lee, Y. et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532 (2006).

Lestrade L, Weber MJ. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 34: D158–162, 2006.

Leung, A.K., Calabrese, J.M., and Sharp, P.A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18125–18130.

Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, Fligelman ZY, Shoshan A, Pollock SR, Sztybel D, Olshansky M, Rechavi G, Jantsch MF. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol* 22: 1001–1005, 2004.

Li S., Fu H., Wang Y., Tie Y., Xing R., Zhu J., Sun Z., Wei L., and Zheng X. MicroRNA-101 Regulates Expression of the v-fos FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS) Oncogene in Human Hepatocellular Carcinoma *HEPATOLOGY*, Vol. 49, No. 4, 2009

Li X, Carthew RW: A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 2005, 123:1267-1277.

Li Y., Liu L., Kang J., Sheng J. G., Barger S. W., Mrak R. E. and Griffin W. S. (2000) Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *J. Neurosci.* 20, 149–155.

Licastro F., Veglia F., Chiappelli M., Grimaldi L. M. and Masliah E. (2004) A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 1017–1022.

Lim L.P., Lau N.C., Weinstein E.G., Abdelhakim A., Yekta S., Rhoades M.W., Burge C.B. and Bartel D.P. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Dev.* 2003a; 17, 991-1008

Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B. and Bartel D.P. Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003b; 299, 1540

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769–773

Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7, 1161–1166.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719–723.

Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ: Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 234(1):211-215.

Lue LF, Rydel R, Brigham EF, et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001;35:72-79.

- Lugli G., Larson J., Martone ME., Jones Y., Smalheiser NR. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem* 94:896-905.
- Lukiw WJ, 2007a RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18:297–300.
- Lukiw WJ, Bazan NG. Cyclooxygenase 2 RNA message abundance, stability, and hypervariability in sporadic Alzheimer neocortex. *J Neurosci Res.* 1997 Dec 15;50(6):937-45.
- Lukiw WJ, Pogue AI (2007b) Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* 101:1265–1269.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA: Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:9667-9672.
- Maas S, Rich A & Nishikura K (2003). A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J Biol Chem* 278, 1391–1394.
- Macrae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V. & Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 512–517 (2008).
- Makeyev EV., Zhang J., Carrasco MA., Maniatis T. (2007). The microRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27:435-448.
- Maniataki, E. & Mourelatos, Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* 19, 2979–2990 (2005).
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that micro-RNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2006;
- Martin, B.K et al. Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *Arch. Neurol.* 2008,65, 896–905
- Martinez, J., and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoesterproducing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18, 975–980.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007;317:1764–1767.

- Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Reports* 2: 986–991, 2001.
- Mattick JS. Challenging the dogma: the hidden layer of nonprotein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* 25: 930–939, 2003.
- Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 5: 316–323, 2004.
- Mattick JS, Gagen MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Mol Biol Evol* 18: 1611–1630, 2001.
- Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 14: R121–132, 2005.
- Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15: R17–29, 2006
- Mbella EG, Bertrand S, Huez G, Octave JN. A GG nucleotide sequence of the 3' untranslated region of amyloid precursor protein mRNA plays a key role in the regulation of translation and the binding of proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20(13):4572–9.
- McGuinness MC, Powers JM, Bias WB, Schmeckpeper BJ, Segal AH, Gowda VC, Wesselingh SL, Berger J, Griffin DE, Smith KD: Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997, 75 (1-2):174-182.
- Mehler M.F., Mattick J.S. (2007). Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, function diversification, and neurological disease. *Physiol Rev.* 87:799-823
- Mercer T.R., Dinger M.E., Sunken S.M., Mehler M.F., and Mattick J.S.. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain 716–721 *PNAS* 2008 vol. 105 no. 2
- Meier UT. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma* 114: 1–14, 2005.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197.
- Meister, G. et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr. Biol.* 15, 2149–2155 (2005).
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA *et al.* (2000). Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9, 1415–1423.
- Millar JK, James R, Brandon NJ & Thomson PA (2004). DISC1 and DISC2: discovering and dissecting molecular mechanisms underlying psychiatric illness. *Ann Med* 36, 367–378.

- Min K. J., Jou I. and Joe E. (2003) Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 969–974.
- Molenaar G. J., Berkenbosch F., van Dam A. M. and Lugard C. M. (1993) Distribution of interleukin 1 beta immunoreactivity within the porcine hypothalamus. *Brain Res.* 608, 169–174.
- Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, Markesbery WR, Marnett LJ, Roberts LJ 2nd, Morrow JD Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology.* 1999 Oct 22;53(7):1495-8
- Morse DP, Aruscavage PJ & Bass BL (2002). RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7906–7911.
- Nelson P.T., Wang W-X., Rajeev B. W. (2007). MicroRNAs (mRNAs) in Neurodegenerative Disease. *Brain Pathology*
- Nguyen, M. D., Julien, J. P. & Rivest, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature Rev. Neurosci.* 3, 216–227 (2002).
- Niwa, R. et al. (2008) The expression of the Alzheimer's amyloid precursor protein-like gene is regulated by developmental timing microRNAs and their targets in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 315, 418–425
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2006; 13:1108–1114
- Nukina, N., and Ihara, Y. (1986). One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 1541–1544
- O'Connor JJ, Coogan AN: Actions of the pro-inflammatory cytokine IL-1 beta on central synaptic transmission. *Exp Physiol* 1999, 84(4):601-614.
- Ohler U., Yekta S., Lim L.P., Bartel D.P. and Burge C.B. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA* 2004
- Oka A, Takashima S. Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurones and axons. *Neuroreport.* 1997 Mar 24;8(5):1161-4
- Okamura K. , Hagen J.W., Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007;130:89–100

- Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. (2006). LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 372:137-141
- Olsen PH, Ambros V: The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999, 216:671-680.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663–666.
- Parker, J.S., and Barford, D. (2006). Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem. Sci.* 31, 622–630.
- Pasquinelli A.E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;408, 86-89
- Patel, N. et al. (2008) MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol. Neurodegener.* 3, 10
- Paupard MC, O'Connell MA, Gerber AP & Zukin RS (2000). Patterns of developmental expression of the RNA editing enzyme rADAR2. *Neuroscience* **95**, 869–879.
- Pearson V. L., Rothwell N. J. and Toulmond S. (1999) Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia* 25, 311–323.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA: Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006, 21:533-542
- Pfeffer S. et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2, 269-276
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005;309:1573–1576
- Pollwein P. et al. The expression of the amyloid precursor protein (APP) is regulated by two GC-elements in the promoter. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 63-68
- Pollwein P. (1993) Overlapping binding sites of two different transcription factors in the promoter of the human gene for the Alzheimer amyloid precursor protei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 637-647
- Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R., and Sisodia, S.S. (1998). *Annu. Rev. Genet.* 32, 461–493.

Quan, N., Whiteside, M. & Herkenham, M. Time course and localization patterns of interleukin-1 β mRNA expression in the brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83, 281–293 (1997).

Quan, N., Whiteside, M., Kim, L. & Herkenham, M. Induction of inhibitory factor γ Ba mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: an in situ hybridization histochemistry study in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 10985–10990 (1997)

Quitschke WW et al. (1996) The initiator element and proximal upstream sequence affect transcriptional activity and start site selection in the amyloid β -proteins precursor promoter. *J. Biol Chem*, 271, 22231-22239

Rajagopalan L. E., Westmark C. J., Jarzembowski J. A., and Malter J. S. (1998) hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 3418–3423.

Rajagopalan L.E. and Malter J.E. Growth Factor-Mediated Stabilization of Amyloid Precursor Protein mRNA Is Mediated by a Conserved 29-Nucleotide Sequence in the 3'-Untranslated Region. *J. Neurochem.*, Vol. 74, No. 1, 2000

Ramachandran, V. & Chen, X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321, 1490–1492 (2008)

Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, Okunishi R, Fukuda S, Ru K, Frith MC, Gongora MM, Grimmond SM, Hume DA, Hayashizaki Y, Mattick JS. Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res* 16: 11–19, 2006.

Redlich, F. (1898). Uber miliare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jarbucher fur Psychiatrie und Neurologie* 1898, 17.

Reenan RA. The RNA world meets behavior: A \rightarrow I pre-mRNA editing in animals. *Trends Genet* 2001,**17**, 53–56

Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Bettinger J.C., Pasquinelli A.E., Rougvie A.E., Horvitz H.R. and Ruvkun G. (2000). The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 340–349.

Rivest, S., Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(6): p.429-39

Robb, G. B. & Rana, T. M. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol. Cell* 2007; 26, 523–537

Rodriguez A., Griffith-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res*, 14: 1902-1910.

Rogaev EI. Small RNAs in human brain development and disorders. *Biochemistry* 70: 1404–1407, 2005.

Rogers J.T., Leiter L.M., McPhee J., Cahill C.M., Zhan S.S., Potter H, and Nilsson L.N.G. Translation of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein mRNA Is Up-regulated by Interleukin-1 through 5'-Untranslated Region Sequences 1999 *J.Biol. Chem.* Vol. 274, No. 10, 6421–6431,

Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001;39:333-340.

Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 2007;82:235-246

Rogelj B, Giese KP. Expression and function of brain specific small RNAs. *Rev Neurosci* 15: 185–198, 2004.

Romano A., Serafino A., Krasnowska E., Ciotti M.T., Calissano P., Ruberti F., Galli C. Neuronal fibrillogenesis: amyloid ifbrils from primary neuronal cultures impair long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 2003; 147, 73-82

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448:83–86

Saini H.K., Griffiths-Jones S., and Enright A.J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *PNAS* 2007, vol. 104, no. 45, 17719–17724

Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J. & Furneaux, H. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J. Biol. Chem.* 282, 32773–32779 (2007).

Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, Sauer F. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to Ultrabithorax. *Science* 311: 1118–1123, 2006

Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82, 323–330.

Schaefer A., O'Carroll D., Tan CL., Hillman D., Sugimori M., Llinas R., Greengard P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *Jem* 204:1553-1558.

Shafteel S. S., Kyrkanides S., Olschowka J. A., Miller J. N., Johnson R. E. and O'Banion M. K. (2007) Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* 117, 1595–1604.

Shafteel S.S., Griffin W.S.T. & O'Banion M.K. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation* 2008, 5:7

Schipper, H.M. et al. (2008) MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regulation and Systems Biology* 1, 263–27

Schneider H, F. Pitossi, D. Balschun, A. Wagner, A. Del Rey, & H. O. Besedovsky. A neuromodulatory role of interleukin-1b in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 7778–7783, 1998

Schottky, J. (1932). Uber prasenile Verblodungen. *Gesamte Neurol. Psych.* 140, 333–397.

Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208 (2003).

Schwarz, D.S., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex Is a Mg(2+)-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* 14, 787–791.

Schratt GM., Tuebing F., Nigh EA., Kane CG., Sabatini ME., Kiebler GM., Greenberg ME. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283-289

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol* 2002; 243:215–225.

Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1054-61.

Sethupathy P., Megraw M., Hatzigeorgiou AG. (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat. Methods* 3:881-886.

Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 184–190, 2003.

- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, Weinstock GM, Wilson RK, Gibbs RA, Kent WJ, Miller W, Haussler D. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, yeast genomes. *Genome Res* 15: 1034–1050, 2005.
- Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U. Analysis of intronic conserved elements indicates that functional complexity might represent a major source of negative selection on non-coding sequences. *Hum Mol Genet* 14: 2533–2546, 2005.
- Small D. H. (2004) Do acetylcholinesterase inhibitors boost synaptic scaling in Alzheimer's disease? *Trends Neurosci.* 27, 245–249.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434–1437
- Soulet D & Rivest S. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol.* 8, 508–518 2008
- Srinivasan D., Yen J.H., Joseph D.J., & Friedman W. Cell Type-Specific Interleukin-1beta Signaling in the CNS *The Journal of Neuroscience*, July 21, 2004 • 24(29):6482– 6488
- Strillacci A., Griffoni C., Sansone P., Paterini P., Piazzini G., Lazzarini G., Spisni E., Pantaleo M.A., Biasco G., Tomasi V. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental Cell Research* 315 (2009) 1439–1447
- Strittmatter, W. J. et al. Apolipoprotein E: highavidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 1977–1981 (1993).
- Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays.* 29: 288–299, 2007.
- Taniura H, Sng JC, Yoneda Y. Histone modifications in status epilepticus induced by kainate. *Histol Histopathol* 21: 785–791, 2006.
- Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V, Corsmit E, De Pooter T, van Duijn CM, De Deyn PP, Van Broeckhoven C. Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 2006 Jun;78(6):936-46. Epub 2006 Apr 10.
- Theuns J. & Van Broeckoven C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implication for susceptibility. *Human Mol Gen*, 2000, Vol.9, no 16, 2383-2394
- Thinakaran G. & Koo E.H. 2008 Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function *J Biol Chem* 283, 44, 29615-29619

- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P. D. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377–1380 (2004).
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Roth, M. (1968). Observations on the brains of non-demented old people. *J. Neurol. Sci.* 7, 331–356.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.* 11, 205–242.
- Tonkin LA, Saccomanno L, Morse DP, Brodigan T, Krause M & Bass BL (2002). RNA editing by ADARs is important for normal behavior in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 21, 6025–6035.
- Valente L & Nishikura K (2005). ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 79, 299–338.
- Van Bogaert, L., and Maert, M. (1940). De Smedt. (1940). Sur les formes familiales precoces de la maladie d'Alzheimer. *Monatschr Psychiatrie* 102, 249.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999 Oct 22;286(5440):735-41.
- Vasudevan S, Steitz JA: AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 2007, 128:1105-1118.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007, 318:1931-1934
- Vela JM, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Almazan G, Guaza C: Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2002, 20(3):489-502.
- Vinogradov AE. “Genome design” model: evidence from conserved intronic sequence in human-mouse comparison. *Genome Res* 16: 347–354, 2006.
- Visvanathan S., Lee B., Lee JW., Lee S., Lee K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21:744-749.

Vo N., Klein ME., Varlamova O., Keller DM., Yamamoto T., Goodman RH., Impey S. (2005). A c-AMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:16426-16431.

Vostov A.A. et al. (1995) USF binds to the APB α sequence in the promoter of the amyloid β -protein precursor gene. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2734-2741

Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 2007;21:1857–1862.

Wang, W.X. et al. (2008) The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of b-site amyloid precursor proteincleaving enzyme 1. *J. Neurosci.* 28, 1213–1223

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562, 2002.

- Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 19: 207–216, 2003.
- Wayman GA., Davare M., Ando H., Fortin D., Varlamova O., Cheng HYM., Marks D., Obrietan K., Soderling TR., Goodman RH., Impey S. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *PNAS* 105:9093-9098
- Westmark P.R., Shin H.C., Westmark C.J., Soltaninassab S.R., Reinke E.K., Malter J.S. Decoy mRNAs reduce β -amyloid precursor protein mRNA in neuronal cells. *Neurobiology of Aging* 27 (2006) 787–796
- Winter J. Jung S., Keller S., Gragory R.I., Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *nature cell biol* 2009; 11, 228-234
- Wood, J.G., Mirra, S.S., Pollock, N.J., and Binder, L.I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4040–4043.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. 1999 Apr 8;398(6727):513-7.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:4034–4039
- Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Med.* 12, 1005–1015 (2006)
- Xie X et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434, 338-345
- Yi R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNA and short hairpin RNAs. *Genes and Dev.* 2003; 17, 3011-3016
- Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996;382:685-691.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* 19, 405–419.

Zaidi, S. H. E., Denman, R., and Malter, J. S. Multiple Proteins Interact at a Unique Element in the 3' Untranslated Region of Amyloid Precursor Protein mRNA (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24000- 24006

Zaidi, S. H. E. and Malter, J. S. Amyloid Precursor Protein mRNA Stability Is Controlled by a 29-Base Element in the 3' Untranslated Region (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24007-24013

Zaidi, S.H.E. and Malter, J.S. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 17292–17298.

Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309: 1519–1524, 2005.

Zhao ML, Kim MO, Morgello S, Lee SC: Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol* 2001, 115(1-2):182-191.

Zhao Y. et al. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436, 214-220