



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

*microRNA circolanti in patologie  
neurodegenerative*

Relatore:  
Prof.ssa Fabiola Olivieri

Tesi di Laurea di:  
Riccardo Benaldi

Anno Accademico 2022-2023

## Sommario

1 INTRODUZIONE .....	3
1.1 I microRNA.....	3
1.2 Biogenesi dei microRNA.....	6
1.3 Funzione dei miRNA .....	9
1.4 I microRNA circolanti nelle vescicole extracellulari .....	10
1.5 I microRNA biomarcatori nella diagnosi e prognosi delle patologie.....	14
1.6 La malattia di Alzheimer.....	16
1.7 Epidemiologia.....	17
1.8 I marcatori circolanti dell'AD.....	19
2 Scopo del lavoro.....	22
3 MATERIALI E METODI.....	23
3.1 Arruolamento dei pazienti .....	23
3.2 Valutazione pazienti.....	23
3.3 Prelievo e conservazione.....	24
3.4 Isolamento di esosomi neuronali.....	25
3.5 Analisi quali-quantitativa di esosomi mediante Nanosight .....	25
3.6 Estrazione dell'RNA.....	26
3.7 Retrotrascrizione e Real-Time PCR.....	29
3.7.1 Fase di retrotrascrizione.....	30
3.7.2 Real-Time PCR .....	33
4 RISULTATI .....	41
5 Conclusioni .....	47
6 Ringraziamenti per la collaborazione allo svolgimento del progetto di tesi.....	50
7 Bibliografia .....	51

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 I microRNA

I microRNA (miRNA, miR) sono corte molecole di RNA non codificanti di circa 20-22 nucleotidi (nt) che sopprimono l'espressione genica sia inibendo la traduzione dell'RNA messaggero (mRNA) target in proteina sia promuovendo il clivaggio dell'mRNA. Da quando sono stati scoperti, è stata descritta una grande quantità di miRNA e sono stati compiuti progressi straordinari verso l'individuazione della loro funzione e del loro utilizzo nella ricerca e nella pratica clinica (Phuong T B Ho et al., 2022). Sebbene le vie di biogenesi dei miRNA siano simili nei diversi tipi di organismi, esistono alcune differenze tra piante e animali che richiedono uno studio diverso per quanto riguarda una delle due vie di biogenesi (Jesús García-López et al., 2013). Gli studi hanno dimostrato che i miRNA svolgono ruoli cruciali nella regolazione di un'ampia varietà di processi biologici, come il diverso destino cellulare, la morfogenesi, la plasticità sinaptica, l'apoptosi, lo splicing dell'mRNA, la metilazione del DNA, i ritmi circadiani, l'angiogenesi, il ciclo cellulare, e idealmente in tutti i processi fisiologici e biochimici che avvengono all'interno di una cellula e di un organismo.

Poiché i microRNA partecipano idealmente a tutti i processi cellulari, la loro importanza deriva dal fatto che un loro cambiamento di espressione è associato a diverse patologie umane, comprese quelle riguardanti il sistema nervoso centrale (SNC) (**Figura 1**). L'attività dei miRNA legata a disturbi neurologici/neurodegenerativi nel SNC ha acquisito un ruolo sempre più significativo negli ultimi anni (T P Nhung Nguyen et al., 2022).

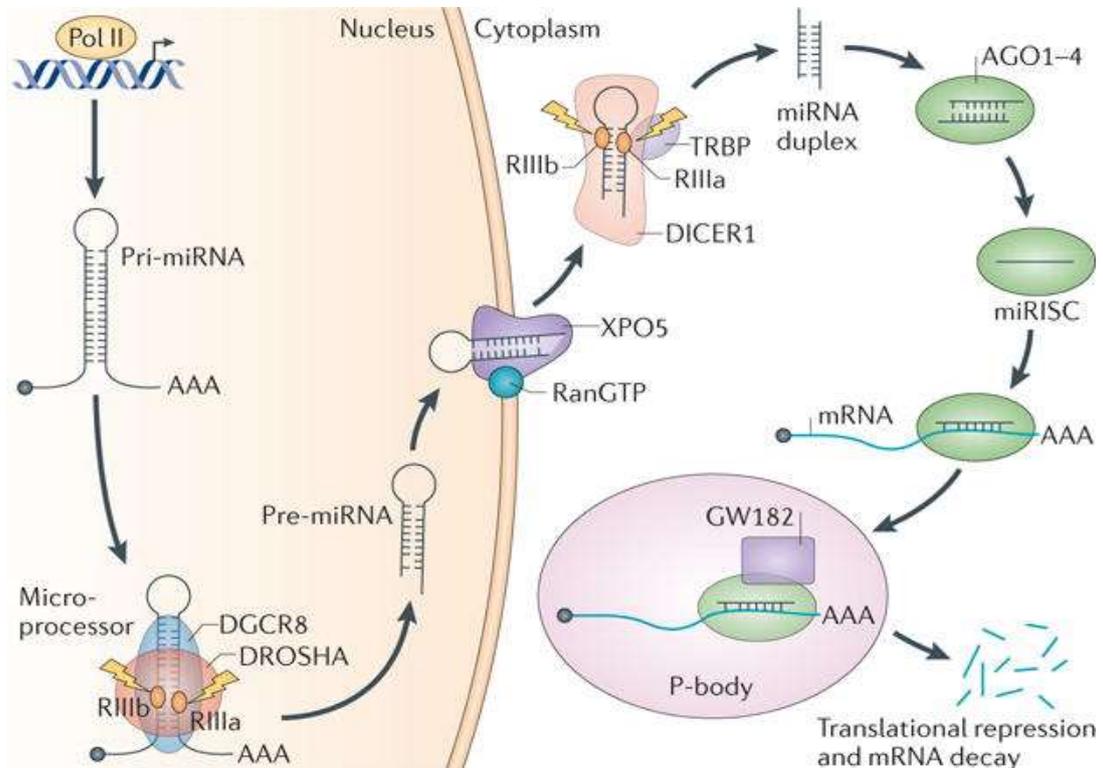


La scoperta dei miRNAs è da ricondursi all'attività di ricerca del biologo Victor Ambros e dei suoi colleghi Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum che nel *C. elegans* individuarono due trascritti del gene *lin-4*, uno di circa 22 nucleotidi (nt) e l'altro di circa 61 nucleotidi (nt) (Lee RC et al., 1993). Tali autori avanzarono l'ipotesi che il trascritto più lungo fosse ripiegato a formare una struttura a forcina (*stem loop*), come illustrato in **Figura 2**, e che esso, una volta opportunamente tagliato, desse origine al trascritto più corto. Si osservò successivamente come la sequenza del trascritto più corto fosse quasi completamente complementare alla sequenza 3' UTR (*UnTranslated Region*) del gene *lin-14*; fu inoltre dimostrato che l'appaiamento del microRNA di 22 nucleotidi (nt) prodotto da *lin-4* (**Figura 2, a sinistra**) regolava l'espressione del mRNA della proteina *lin-14* attraverso un processo di repressione traduzionale, tale per cui il livello della proteina *lin-14* era ridotto senza alterare la quantità del messaggero. Pertanto, il microRNA *lin-4* fu riconosciuto cruciale nell'insieme dei processi di regolazione genica e, nel caso specifico, essenziale per consentire il passaggio dal primo al secondo stadio larvale in *C. elegans*. Sempre in *C. elegans*, fu identificato un altro gene, più precisamente *let-7*, responsabile della trascrizione di un microRNA di circa 22 nucleotidi (nt) con funzione regolatoria (**Figura 2, a destra**), essenziale per il passaggio dallo stadio tardo larvale a quello adulto (Bartel DP., 2004). Il trascritto più corto di *lin-4* è ormai considerato il capostipite di questa ampia classe di elementi regolatori quali sono i microRNAs.



Un singolo pri-miRNA può produrre un singolo miRNA o contenere gruppi di due o più miRNA, elaborati da un trascritto primario comune. Tuttavia, questi lunghi pri-miRNA, vengono scissi dal Microprocessore, un complesso multiproteico che comprende l'enzima RNasi III di classe 2 DROSHA e il suo cofattore essenziale DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region 8*) umano, che lega l'RNA a doppio filamento (dsRNA). DROSHA contiene due domini RNase III, ognuno dei quali scinde un filamento del dsRNA andandosi a legare specificamente alla base delle strutture secondarie stem-loop contenute all'interno dei pri-miRNA per liberare circa 60-70 precursori miRNA a forma di forcina (pre-miRNA). Il microprocessore riconosce la giunzione dello stelo dell'RNA a singolo filamento (ssRNA) e la distanza dalla regione dell'ansa terminale e successivamente scinde in maniera specifica il dsRNA (composti da circa 11 paia di basi) dalla giunzione con il ssRNA che ha di fianco per produrre pre-miRNA a forma di forcina con una sporgenza all'estremità 3' di due nucleotidi (miRNA di gruppo I) o di un nucleotide (miRNA di gruppo II). I pre-miRNA vengono poi esportati dal nucleo al citoplasma dall'exportina 5 (XPO5) e ulteriormente processati da DICER1, un enzima RNasi III che misura le estremità 5' e 3' del pre-miRNA. Il legame di DICER1 con l'estremità del pre-miRNA posiziona i suoi due domini catalitici dell'RNasi III in modo che il clivaggio asimmetrico dello stelo del dsRNA, vicino alla sequenza terminale del loop, produca il duplex maturo di miRNA di circa 22 nucleotidi con sporgenze di due nucleotidi in 3'. DICER1 si associa alla proteina legante l'RNA reattiva alla transattivazione (TRBP; nota anche come TARBP2), che si lega al dsRNA. Sebbene non sia richiesto per l'elaborazione del pre-miRNA da parte di DICER1, TRBP migliora la precisione della scissione mediata da DICER1 di un sottoinsieme di pre-miRNA in modo dipendente dalla struttura e altera la selezione del filamento guida del miRNA innescando la formazione di isomiRNA, che sono un nucleotide più lunghi dei normali miRNA. TRBP

collega anche fisicamente DICER1 con le proteine Argonaute (AGO1, AGO2, AGO3 o AGO4) per partecipare all'assemblaggio del complesso di silenziamento indotto da miRNA (miRISC). Un filamento del miRNA maturo (il filamento guida) è legato da una proteina Argonauta e trattenuto nel miRISC per guidare il complesso, insieme ai membri della famiglia di proteine GW182, verso mRNA target complementari per il silenziamento genico post-trascrizionale. Ciò si verifica nei corpi di elaborazione (corpi P), che sono i fuochi citoplasmatici che sono indotti dal silenziamento e dal decadimento dell'mRNA ma non sono necessariamente richiesti per il silenziamento genico mediato dal miRNA (**Figura 3**) (Shuibin Lin et al., 2015).



**Figura 3.** *Panoramica del processo di biogenesi dei miRNAs (Shuibin Lin et al., 2015).*

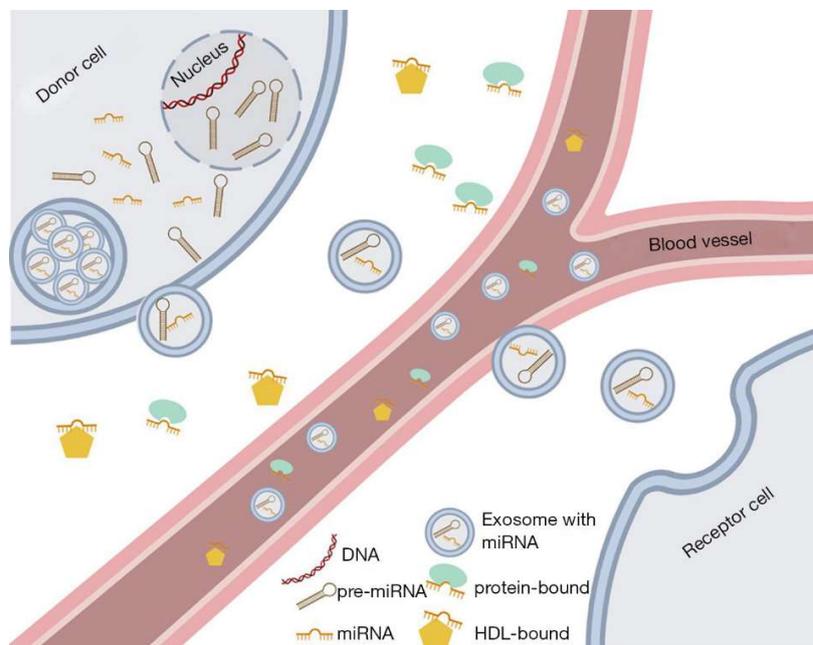
### **1.3 Funzione dei miRNA**

La principale funzione dei miRNA è quella di regolare l'espressione genica principalmente attraverso un meccanismo di impedimento di traduzione di mRNA target in proteine. Ogni microRNA maturo si assembla ad un gruppo di proteine a formare un complesso ribonucleoproteico che, a sua volta, silenzia l'espressione del gene relativo all'mRNA bersaglio, contenente sequenze complementari. I microRNA di origine animale sono generalmente complementari alla porzione 3' delle UTR (Xiu-Jie Wang et al., 2004). Negli animali, i microRNA si appaiano prevalentemente attraverso legami imperfetti, inibendo la traduzione delle proteine codificate dall'RNA messaggero bersaglio (William A.E., 2008). In maniera diversa, nelle piante, si prevede un appaiamento perfetto o quasi con l'RNA bersaglio, determinandone la degradazione (Moxon S. et al., 2008). Questo tipo di inibizione richiede solitamente il legame di più microRNA in diversi siti all'interno dell'RNA messaggero bersaglio. I microRNA parzialmente complementari possono inoltre velocizzare la deadenilazione, determinando la degradazione dell'RNA messaggero (Eulalio A. et al., 2009). I microRNA possono occasionalmente causare anche la metilazione del promotore del DNA agendo così sulla trascrizione a livello dei geni bersaglio (Tan Y. et al., 2009; Hawkins P.G. and Morris K.V., 2008).

## 1.4 I microRNA circolanti nelle vescicole extracellulari

Nei primi anni della loro scoperta i microRNA sono stati studiati principalmente all'interno delle cellule e dei tessuti, in modo da analizzarne i livelli e i meccanismi d'azione. Solo in seguito, si è scoperta la presenza di miRNA anche nei liquidi biologici e ciò ha suscitato un grande interesse per il loro potenziale uso come biomarcatori.

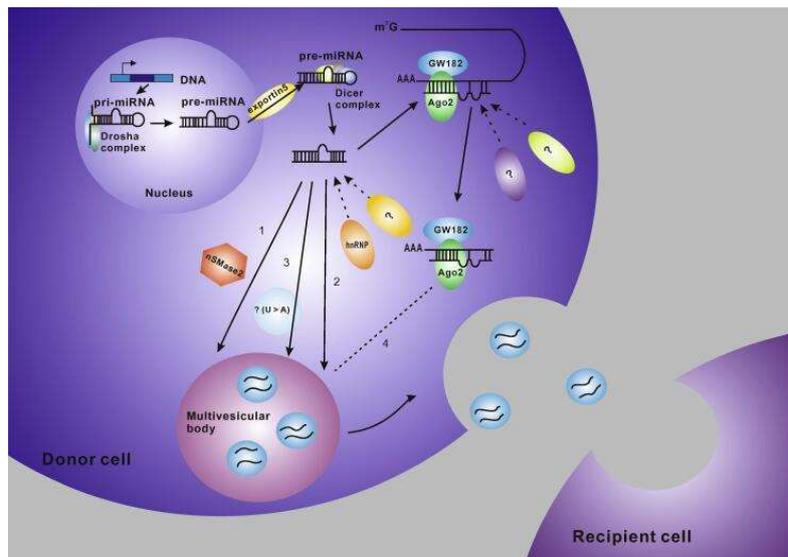
I microRNA che migrano fuori dalle cellule ed entrano nei fluidi corporei vengono chiamati microRNA circolanti. È stato dimostrato che circa il 90% dei miRNA circolanti forma complessi con proteine, tra cui Ago2 (proteina argonaute 2), NPM 1 (nucleofosmina 1) e lipoproteine ad alta densità (HDL). Il restante 10% dei miRNA circolanti viene secreto negli esosomi, una forma di microvescicole derivate da endosomi che si fondono con la membrana plasmatica (**Figura 4**).



**Figura 4.** *Panoramica schematica dei complessi circolanti di miRNA (Foessel I et al., 2019).*

Gli esosomi, vescicole di diametro compreso fra 40 e 100 nm, sono presenti in quasi tutti i fluidi biologici. Sono rilasciati dalla maggior parte dei tipi di cellule nello spazio extracellulare dopo la fusione con la membrana plasmatica. Oltre alle proteine, recentemente sono stati identificati vari acidi nucleici nel lume esosomiale, inclusi mRNA, microRNAs e altri RNA non codificanti (ncRNA). L'esosoma che contiene i miRNA, o l'RNA in generale, può entrare nelle cellule vicine o lontane per endocitosi, ossia attraverso la fusione diretta con la membrana cellulare o mediante l'interazione con recettori specifici sulla superficie cellulare e influenzare gli mRNA bersaglio.

La scoperta della loro funzione nello scambio genetico tra le cellule ha portato una crescente attenzione agli esosomi (Jian Zhang et al., 2015). L'impacchettamento nell'esosoma o la formazione di un complesso con le proteine è necessario per proteggere i miRNA dalla digestione delle RNasi (enzimi di digestione ribonucleasi dell'RNA) nei fluidi corporei.



**Figura 2.1** Il meccanismo di smistamento dei microRNA esosomali (Jian Zhang et al., 2015).

I microRNAs non sono impacchettati in modo casuale all'interno degli esosomi, ma esistono dei sistemi di *sorting* non ancora ben definiti. Le cellule d'origine attiveranno un meccanismo di selezione per veicolare specifici miRNA intracellulari negli esosomi. Sulla base della letteratura, sono stati evidenziati 4 potenziali percorsi per il sorting dei miRNA negli esosomi (Jian Zhang et al., 2015):

- 1) **pathway che dipendono dalla sfingomielinasi neurale 2 (nSMase2).** nSMase2 è stata la prima molecola ad essere correlata con la secrezione dei miRNA negli esosomi. L'espressione di nSMase2 correla con il numero di miRNA esosomali (Kosaka et al., 2013).

2) **pathway dipendenti da hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins).**

hnRNPA2B1 sumoilata potrebbe essere in grado di riconoscere il motivo GGAG in posizione 3' sulla sequenza dei miRNA (che sembrerebbe contenere segnali critici per la secrezione del microRNA) e guidare l'impacchettamento di specifici miRNA negli esosomi. Allo stesso modo, altre due proteine della famiglia hnRNP, hnRNPA1 e hnRNPC, potrebbero legare i miRNA esosomali, ed essere coinvolte nel sorting dei miRNA (VillarroyaBeltri et al., 2013). Inoltre, un pathway simile sembrerebbe coinvolgere un segnale, sempre al 3' del miR, composta da più U (Uracile) in sequenza che indirizzerebbe il microrNA verso la compartimentalizzazione nella vescicola e quindi alla secrezione.

3) **pathway dipendenti dalla sequenza al 3'-terminale del miRNA.** I miRNA con

l'estremità 3' uridilata sono stati trovati di preferenza negli esosomi mentre miRNA con l'estremità 3' adenilata sembrano essere prevalenti all'interno delle cellule (Koppers-Lalic et al., 2014). Queste osservazioni suggerirebbero come le sequenze terminali in posizione 3' dei miRNA potrebbe contenere una sequenza chiave per il sorting dei miRNA negli esosomi.

4) **pathway dipendenti da miRISC.** I miRNA maturi interagiscono con le proteine a

formare il complesso chiamato miRISC. I componenti principali di miRISC includono miRNA, mRNA target, GW182 (famiglia di proteine che interagisce con le proteine

Ago) e Ago2. La proteina Ago-2 nell'uomo si lega alle basi U (Uracile) o A (Adenina) all'estremità 5' dei miRNA.

I miRNA esosomiali, invece, potrebbero reprimere l'espressione genica in siti distanti attraverso un meccanismo simile ai miRNA intracellulari o potrebbero anche fungere da ligando per attivare o sopprimere il sistema immunitario. Ad esempio, il miRNA-21 e il miRNA-29a possono esercitare le loro funzioni sulle cellule immunitarie venendo veicolati tramite esosomi e legarsi ulteriormente e attivare TLR8 che si traduce nell'attivazione della via di segnalazione NFκB. Il miR-21 esosomiale, rilasciato dalle cellule tumorali, innesca TLR8 e NF-κB per attivare i monociti che a loro volta rilasciano il miRNA-155 esosomiale (Phuong T B Ho et al., 2022).

## **1.5 I microRNA biomarcatori nella diagnosi e prognosi delle patologie**

La valutazione di nuovi biomarcatori per la pratica clinica richiede protocolli preanalitici, analitici e post-analitici standardizzati volti a fornire misurazioni precise, riproducibili e coerenti, a basso costo e in tempi ragionevoli, attraverso il controllo di tutte le variabili che possono introdurre distorsioni nella rilevazione del biomarcatore (tipo di campione, sua manipolazione, metodo per la sua misurazione). La fase preanalitica prevede la gestione di tutti i fattori soggettivi (età, sesso, abitudini di vita, patologie acute e croniche, farmaci) che possono influenzare il livello di concentrazione/espressione dell'analita, e le variabili associate al campione che possono influire sulla sua misurazione. La fase analitica, invece, fa riferimento al metodo/piattaforma di misurazione. Infine, la fase post-analitica è relativa a tutte le procedure che portano all'associazione dell'output analitico al soggetto da cui è stato

prelevato il campione (Bottani M. et al., 2020). Prove significative si sono accumulate negli ultimi anni, mostrando un ruolo fondamentale dei microRNA nello sviluppo di molte malattie. In particolare, nel cancro, le aberrazioni nei livelli di espressione del microRNA sono state collegate all'insorgenza e alla progressione di vari tipi di cancro (Bertoli G. et al., 2015). I microRNA circolanti sono considerati biomarcatori promettenti per molte patologie umane poiché soddisfano molti dei criteri per essere un biomarcatore preferibile, tra cui elevata specificità, facile accessibilità e sensibilità. I microRNA sono presenti in molti fluidi biologici dove sono altamente stabili, ed inoltre, possono essere facilmente estratti da, ad esempio, sangue o altre biopsie liquide; hanno anche un'elevata specificità per i tipi di tessuto o cellule come, ad esempio, il miRNA-122-5p che è altamente arricchito nel fegato o il miRNA-140 che è selettivo per la cartilagine. Questa caratteristica aumenta la possibilità di utilizzare miRNA specifici per determinare l'inizio e la progressione di una malattia. La sensibilità dei miRNA è stata dimostrata ed i loro livelli possono variare in base alla progressione della malattia o alla risposta alla terapia. Con questi vantaggi, attraverso quest'ultimi si riesce a fornire un metodo non invasivo per diagnosi accurate, prognosi della progressione della malattia, per guidare e valutare la risposta al trattamento.

Le potenzialità dei miRNA circolanti quali biomarcatori per il cancro sono note dal 2008, in relazione al linfoma diffuso a grandi cellule B. Da allora, la loro presunta utilità come biomarcatori è stata proposta per numerose patologie umane, tra cui anche le malattie neurodegenerative.

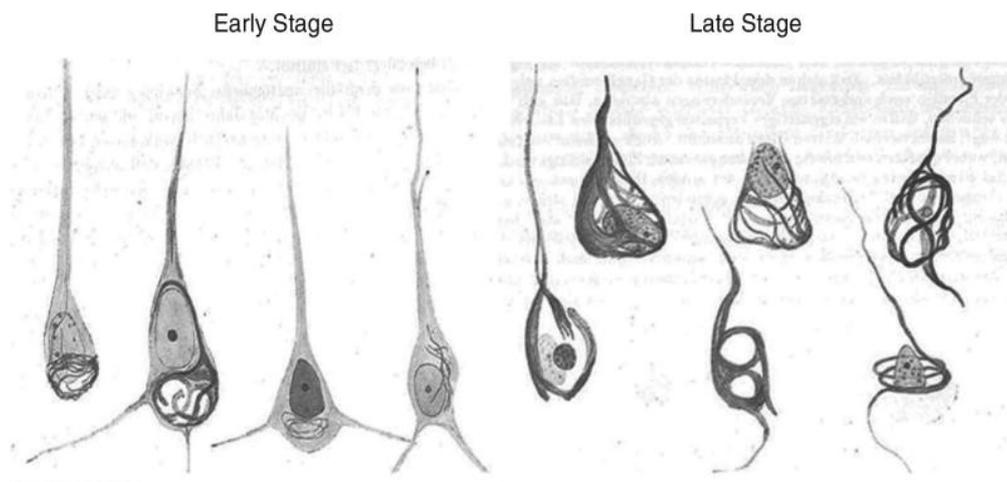
## 1.6 La malattia di Alzheimer

Nel 1907, Aloysius "Alöis" Alzheimer descrisse accuratamente i sintomi di una donna di 51 anni, Auguste Deter, che era sotto la sua cura presso il manicomio statale di Francoforte, in Germania. La descrizione di Alzheimer di tali sintomi è quasi certamente la prima caratterizzazione neuropsicologica della malattia:

*“La sua memoria è gravemente compromessa. Se le vengono mostrati degli oggetti, li nomina correttamente, ma quasi subito dopo ha dimenticato tutto. Durante la lettura di un test, salta da una riga all'altra o legge scrivendo le parole singolarmente o rendendole prive di significato attraverso la pronuncia. Nello scrivere ripete molte volte sillabe separate, ne omette altre e rapidamente crolla completamente. Nel parlare usa riempimenti e alcune espressioni parafrasate (“versa-latte” invece di tazza); a volte è ovvio che non può andare avanti. Chiaramente, non capisce certe domande. Non ricorda l'uso di alcuni oggetti”.*

Quando Auguste Deter morì, Alzheimer usò l'allora nuova tecnica istologica di colorazione con argento per esaminare il suo cervello al microscopio. Quando lo fece, osservò le placche neuritiche, i grovigli neurofibrillari e l'angiopatia amiloide che sarebbero diventati i segni distintivi della malattia che ora porta il suo nome (**Figura 5**). Il mentore del dott. Alzheimer, Emil Kraepelin alla Munich Medical School gli ha giustamente attribuito il merito di aver descritto la malattia coniato il termine “malattia di Alzheimer” nel suo Handbook of Psychiatry (Kraepelin, 1910). Dal 1911, la comunità medica utilizzò le

rappresentazioni della malattia di Alzheimer per diagnosticare pazienti sia in Europa che negli Stati Uniti (Mark W Bondi et al., 2017).

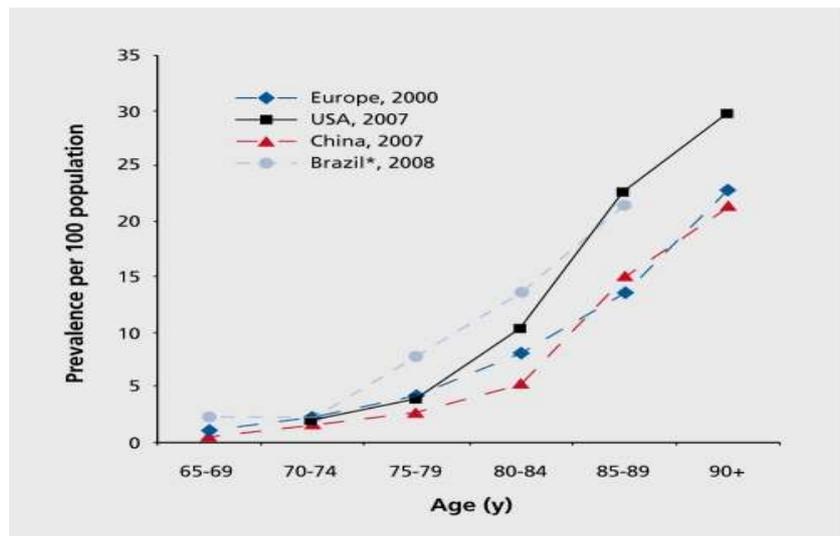


**Figura 5.** Schizzi dei preparati istologici di Auguste Deter, 1911. (Mark W Bondi et al., 2017)

## 1.7 Epidemiologia

I dati aggregati di studi basati sulla popolazione in Europa suggeriscono che la prevalenza standardizzata per età nelle persone di età superiore ai 65 anni è del 6,4% per la demenza e del 4,4% per l'AD (*Alzheimer Disease*). Negli Stati Uniti, lo studio di un campione rappresentativo nazionale di persone di età >70 anni ha prodotto una prevalenza di AD del 9,7%. In tutto il mondo, la prevalenza globale della demenza è stata stimata al 3,9% nelle persone di età superiore ai 60 anni, con una prevalenza regionale dell'1,6% in Africa, del

4,0% nelle regioni della Cina e del Pacifico occidentale, del 4,6% in America Latina, del 5,4% nelle regioni occidentali Europa e il 6,4% in Nord America. Più di 25 milioni di persone nel mondo sono attualmente affette da demenza, la maggior parte soffre di AD, con circa 5 milioni di nuovi casi che si verificano ogni anno. Si prevede che il numero di persone affette da demenza raddoppierà ogni 20 anni. Nonostante i diversi criteri di inclusione, diverse metanalisi e sondaggi a livello nazionale hanno prodotto una prevalenza di AD all'incirca simile per età tra le regioni (**Figura 6**).



**Figura 6.** Prevalenza specifica per età della malattia di Alzheimer (per 100 abitanti) in continenti e paesi (Chengxuan Qiu et al., 2009)

La prevalenza specifica per età dell'AD quasi raddoppia ogni 5 anni dopo i 65 anni. Tra le nazioni sviluppate, circa 1 anziano su 10 (65+ anni) è affetto da un certo grado di demenza,

mentre più di un terzo delle persone molto anziane (oltre gli 85 anni) può avere sintomi e segni correlati alla demenza. Esiste un modello simile di sottotipi di demenza in tutto il mondo, con AD e demenza vascolare, le due forme più comuni di demenza, che rappresentano rispettivamente dal 50% al 70% e dal 15% al 25% di tutti i casi di demenza.

La ricerca epidemiologica sulla demenza e l'AD nei paesi a basso e medio reddito ha attirato molta attenzione negli ultimi anni. Una revisione sistematica ha stimato che la prevalenza complessiva dell'AD nei paesi in via di sviluppo fosse del 3,4%. Il tasso di incidenza aggregato di AD tra le persone di età superiore ai 65 anni in Europa era di 19,4 per 1000 anni-persona ed aumenta quasi esponenzialmente con l'aumentare dell'età fino a 85 anni di età. Tuttavia, rimane incerto se l'incidenza continui ad aumentare, anche in età più avanzate, o raggiunga un plateau a una certa età; questo è rilevante per prevedere il peso della malattia e per comprenderne l'eziologia. Ad esempio, un costante aumento esponenziale, con l'avanzare dell'età, dell'incidenza dell'Alzheimer suggerisce che l'AD è una conseguenza inevitabile dell'invecchiamento, mentre una convergenza o un declino a una certa età può suggerire che le persone molto anziane possono avere una vulnerabilità ridotta, forse a causa di fattori genetici o fattori ambientali (Chengxuan Qiu et al., 2009).

## **1.8 I marcatori circolanti dell'AD**

Secondo l'ipotesi più accreditata, l'evento patogenetico chiave responsabile della degenerazione dei neuroni e delle modificazioni morfologiche, funzionali e cognitive caratteristiche dell'AD è l'eccessiva formazione o accumulo di peptidi amiloidogenetici, derivati dalla proteolisi di una glicoproteina transmembrana, presente in tutte le cellule, ma

prevalentemente nei neuroni, chiamata amyloid precursor protein (APP). Il processamento di APP, ad opera di due proteasi, secretasi, che agiscono in sequenza, viene distinto in via amiloidogena e in via non-amiloidogena, a seconda che risulti o meno nella produzione del peptide A $\beta$ . L'A $\beta$  è prodotta dal taglio proteolitico del precursore dell'APP da parte delle secretasi beta e gamma (BACE1), coinvolte nella via amiloidogena. L'azione di queste due secretasi porta alla formazione dei peptidi A $\beta$  di 37-43 aminoacidi, di cui l'A $\beta$ 42 è il più tossico. La A $\beta$  nel tessuto cerebrale esiste in diversi stati di aggregazione, monomeri, dimeri e oligomeri ad alto peso molecolare; l'ulteriore aggregazione di questi ultimi genera le protofibrille ed infine le fibrille che sono alla base della formazione delle placche. Il livello di espressione di A $\beta$  è strettamente correlato al livello di espressione di APP e BACE.

Nonostante l'associazione dimostrata fra placche di Beta amiloide e AD, va detto che tali placche sono presenti sia nel cervello di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer, che in soggetti anziani sani. Alcuni microRNA sono stati associati alla modulazione della proteina APP. I miR-101, miR-20a e miR-17 sono regolatori negativi di APP e l'espressione sbilanciata di questi miRNA svolge un ruolo importante nella progressione dell'AD. Nel siero e nella corteccia frontale dei pazienti affetti da AD, l'espressione di miR-149, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-15b, miR-16, miR-124, miR-29c e miR-374b-5p è risultata significativamente ridotta rispetto a quella dei controlli sani. Al contrario, l'espressione dell'mRNA di BACE1 era opposta. I miR-149, miR-34a-5p, miR-16, miR-29c e miR-374b-5p sono stati confermati come bersaglio di BACE1 per svolgere un ruolo di resistenza diretta all'AD. Anche alcuni miRNA circolanti nel plasma sono stati associati alla malattia, quali miR-545-3p, -301a-3p, -191-5p, -142-3p, -15b-5p, let-7g-5p e let-7d-5p).

Un altro marcatore di AD si osserva all'interno dei neuroni: proteina Tau fosforilata, proteina coinvolta nella stabilizzazione dei microtubuli dell'assone, che una volta fosforilata non esercita più la sua funzione portando così alla degenerazione neuronale.

Il marcatore genetico più noto di AD è la variante APOE4 del gene APOE. La variante APOE4 è il fattore di rischio genetico più significativo per la malattia di Alzheimer sporadica (sAD). L'APOE4 ha un impatto multidimensionale sulla patogenesi dell'AD, compresa la disregolazione dei lipidi e delle lipoproteine, come i livelli plasmatici di APOE (Leonardo Guzman-Martinez et al., 2019). Va sottolineato che l'applicabilità dei microRNAs come strumento diagnostico ad uso clinico per l'AD necessita chiaramente di un'estesa validazione e follow-up in coorti molto ampie di pazienti. Ciò è di estrema importanza, considerando che l'AD è una patologia molto eterogenea con quadri clinici spesso sovrapponibili ad altre malattie, accompagnata frequentemente a comorbidità (diabete mellito, patologie cardiovascolari o tumori).

## 2 Scopo del lavoro

Le demenze ed in particolare la Malattia di Alzheimer sono state oggetto di un'intensa ricerca negli ultimi anni, non solo per le dimensioni epidemiologiche della malattia, ma anche perché in assenza di un chiaro meccanismo patogenetico è difficile sviluppare terapie efficaci. Ovviamente non conoscendo i possibili fattori predisponenti non sono ancora disponibili approcci preventivi mirati. In questo paradossale contesto di incertezze sui meccanismi patogenetici dell'AD e della sua progressione, diventa fondamentale condurre studi innovativi mirati a valutare il potere predittivo/diagnostico e prognostico di nuovi markers molecolari. Negli ultimi decenni, numerosi studi scientifici hanno dimostrato che le analisi di microRNA e le vescicole extracellulari possono fornire informazioni utili alla diagnosi e alla caratterizzazione della malattia di Alzheimer.

Per tale motivo, lo scopo di questa tesi è quello di:

- Individuare dei microRNA che possono essere coinvolti nella malattia di Alzheimer
- Valutare l'espressione dei microRNA di interesse nel plasma di soggetti affetti da Alzheimer con diverso grado di deterioramento cognitivo valutato tramite test neuropsicologico Mini-Mental State Examination (MMSE)
- Analizzare l'espressione dei microRNA nelle vescicole extracellulari CD171-positive di derivazione neuronale
- Correlare l'espressione plasmatica con quella vescicolare al fine di individuare il campione biologico più informativo per lo studio dei microRNA nell'ambito dell'AD.

## **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Arruolamento dei pazienti**

Sono stati selezionati 25 soggetti appartenenti a tre gruppi: soggetti sani non affetti da demenza, pazienti con demenza di Alzheimer con medio deterioramento cognitivo (AD mild) e pazienti con grave deterioramento cognitivo (AD severe). I pazienti sono stati reclutati presso la Clinica di Neurologia dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (INRCA) di Ancona. Lo studio è stato svolto in collaborazione con il Centro di Neurobiologia dell'Invecchiamento e la Clinica di Neurologia dell'INRCA.

### **3.2 Valutazione pazienti**

Su tutti i soggetti arruolati nello studio è stata effettuata la valutazione cognitiva e comportamentale utilizzando il seguente parametro:

- Analisi del grado di deficit cognitivo, misurato con MMSE (Mini-Mental State Examination).

L' MMSE è stato pubblicato per la prima volta nel 1975 come appendice a un articolo scritto da F. Folstein, Susan Folstein e Paul R. McHugh, nel prestigioso Journal of Psychiatric Research. In letteratura e sui documenti medici viene spesso indicato come Test di Folstein, MMSE, MMS o, in Italia, Test Mini Mental Status. L' MMSE è un test ampiamente utilizzato nella pratica clinica per la valutazione delle funzioni cognitive dei soggetti anziani. È un test di facile e rapida somministrazione, è attendibile nel determinare il grado del deficit cognitivo e nel monitorarne la progressione in condizioni di demenza. È composto da 30 items, in parte

verbali, in parte di performance, che esplorano l'orientamento spazio-temporale, la memoria a breve termine, l'attenzione, il calcolo mentale, il linguaggio nelle componenti di comprensione, ripetizione, denominazione, lettura e scrittura, e la aprassia costruttiva. Il punteggio totale è compreso tra un minimo di 0 ed un massimo di 30 punti. Un punteggio uguale o inferiore a 18 è indice di una grave compromissione delle abilità cognitive; un punteggio compreso tra i 18 ed i 24 è indice di una compromissione da moderata a lieve; un punteggio pari a 25 è considerato borderline; da 26 a 30 è indice di normalità cognitiva.

Le indicazioni sono comunque orientative essendo presenti fattori confondenti legati all'età ed alla scolarità del soggetto. Presenta un forte effetto "soffitto": la maggior parte dei soggetti cognitivamente normali ottiene il punteggio maggiore. Anche persone con un iniziale deterioramento cognitivo, ma con un'alta scolarizzazione possono ottenere un punteggio elevato.

### **3.3 Prelievo e conservazione**

Per i soggetti di cui è stato analizzato il plasma è stato raccolto un campione di sangue venoso periferico non coagulato in provette sterili (Venoject, Terumo Europe, NV) contenenti EDTA come anticoagulante. È stata condotta un'opportuna centrifugazione secondo il protocollo standard. Ogni campione è stato conservato alla temperatura di -80°C. Prima del loro utilizzo, i campioni erano opportunamente scongelati a temperatura ambiente, quindi sottoposti a centrifugazione per 10 minuti a 10.000 rpm in centrifuga refrigerata (4°C). Infine, venivano trasferiti in provette RNAsi-free, ponendo particolare attenzione nell'evitare il prelievo di eventuali detriti presenti.

### **3.4 Isolamento di esosomi neuronali**

Per isolare gli esosomi di origine neuronale dal plasma abbiamo utilizzato una procedura messa a punto da Fiandaca (Fiandaca et al., 2015).

Gli esosomi totali vengono inizialmente isolati da 700  $\mu$ l di plasma attraverso un kit di separazione e poi immunoprecipitati con un anticorpo biotinilato capace di riconoscere il marcatore neuronale di superficie L1CAM (CD171) (eBio5G3-5G3, Thermo Fisher Scientific).

### **3.5 Analisi quali-quantitativa di esosomi mediante Nanosight**

Per la caratterizzazione degli esosomi è stato utilizzato il Malvern NanoSight LM10, uno strumento che fornisce una rapida ed accurata analisi della distribuzione e concentrazione di tutti i tipi di nanoparticelle.

Il Malvern NanoSight LM10 utilizza la tecnologia del Nanoparticle tracking Analysis (NTA, analisi per il monitoraggio delle nanoparticelle), che sfruttando le proprietà sia del light scattering che del moto browniano, permette di ottenere la distribuzione dimensionale e la misura della concentrazione di particelle in sospensione liquida.

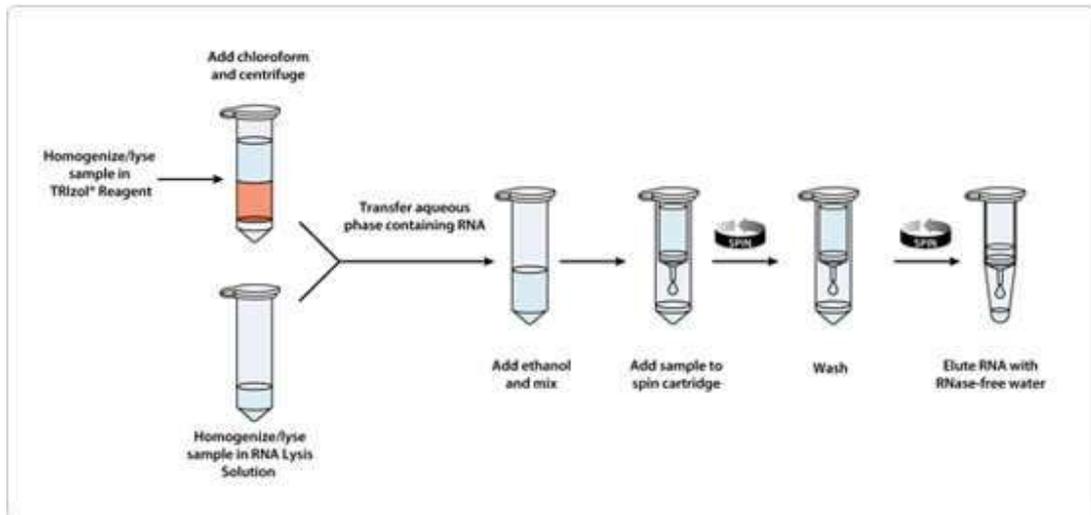
Un campione viene illuminato da un raggio laser e le variazioni d'intensità della luce diffusa dal campione vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento delle particelle all'origine dello scattering.

A parità di temperatura e di viscosità le particelle “piccole” si muovono rapidamente creando delle variazioni rapide dell’intensità di scattering, mentre le particelle “grandi” si muovono più lentamente creando delle variazioni d’intensità lente.

Le particelle in sospensione che si trovano sul percorso sono visualizzate tramite un microscopio 20x su cui è montata una telecamera che ogni 30 frame al secondo, cattura un video delle particelle che si muovono con moto browniano.

### **3.6 Estrazione dell’RNA.**

L’RNA totale è stato estratto utilizzando il kit commerciale Total Rna Purification kit acquistato dalla ditta Norgen Biotech Corporation, Canada. Tale Kit consente di purificare in modo relativamente rapido l’RNA proveniente da vari tipi di materiali biologico, ivi inclusi campioni tissutali, colture cellulari, sangue, batteri, lieviti, funghi, piante e virus ed è in grado di estrarre tutti i tipi di RNA quindi, nel caso specifico del plasma, anche i microRNA presenti in circolo. La metodologia impiegata dal kit sfrutta una colonna cromatografica con una resina di proprietà della Norgen, capace di leggere l’RNA in base alla concentrazione ionica. I preparati ottenuti sono privi di altre componenti cellulari come le proteine e, quindi, si evita l’utilizzo successivo di sostanze tossiche quali il fenolo ed il cloroformio. La metodica include diversi step (**Figura 7**).



**Figura 7.** Steps dell'estrazione con colonnine in spin.

#### *Preparazione del lisato.*

L'RNA è stato estratto a partire da 100 µl di plasma e 200 µl di esosomi neuronali. Dopo la centrifugazione in centrifuga refrigerata (4°C) per 10 minuti a 10000 r.p.m. (vedi paragrafo 3.3.), si aggiungevano 300 µl della soluzione di lisi, contenente sali di guanidina, e si procedeva con il vortexare ciascun campione per 15 secondi. Al duplice fine di assicurare l'avvenuto e corretto processo di estrazione e purificazione dell'RNA ed avere una sequenza necessaria per la successiva normalizzazione, venivano dispensati 3 µl del *cel*-miRNA-39. Ad ogni campione si aggiungevano quindi 400 µl di etanolo 95-100%, per favorire il successivo legame dell'RNA al filtro della colonnina; si vortexava per altri 10 secondi o per più tempo fino a che la soluzione non appariva completamente limpida.

#### *Legame dell'RNA alla colonnina.*

La colonnina di purificazione veniva assemblata con la provetta di raccolta fornita nel kit. Tutto il volume della soluzione precedente, pari a circa 800 µl veniva dispensato nella colonnina e si andava a centrifugare a 6000 r.p.m. per 1 minuto; ciò consente all'RNA di aderire alla resina della colonnina. Il materiale recuperato nella provetta di raccolta era eliminato. Se nella colonnina vi fosse stato ancora un po' di soluzione si sarebbe ripetuto la centrifugazione alla stessa velocità fino ad esaurimento della nostra mix contenente il campione.

#### *Lavaggio della colonnina.*

Si eseguivano tre lavaggi della colonnina utilizzando 400 µl di etanolo 96-100% centrifugando più volte a 6000 r.p.m. per 1 minuto. Al fine di eliminare tutti i residui si effettuava un'ulteriore centrifugazione a 13000 r.p.m. per 2 minuti in modo tale che la resina si asciugava.

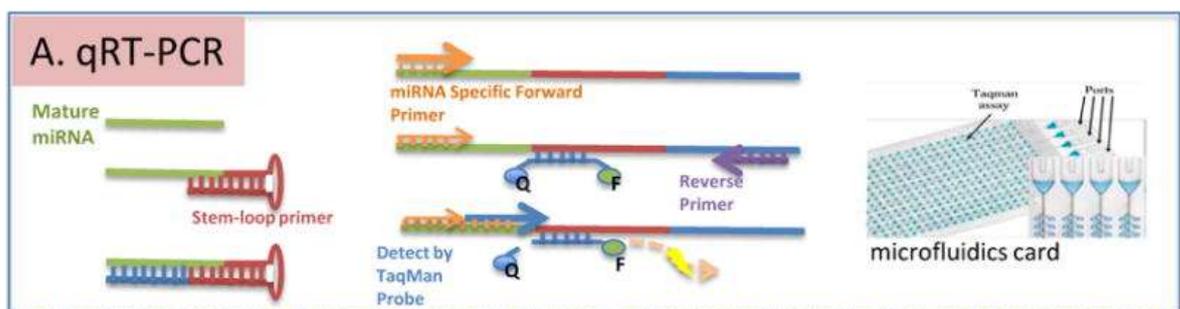
#### *Eluizione dell'RNA.*

La colonnina veniva quindi trasferita nella *elution tube* da 1,7 ml fornita nel kit. L'RNA trattenuto sulla resina della colonnina veniva recuperato attraverso l'aggiunta di 50 µl di soluzione di eluizione (RNA elution solution A), avendo cura di versare il volume al centro della resina, evitando di disperderlo nelle pareti della colonnina. Veniva effettuata una prima centrifugazione a 2000 r.p.m. per 2 minuti ed una seconda ultima a 13000 r.p.m. per 1 minuto. Grazie alla soluzione di eluizione, l'RNA si staccava dalla resina della colonnina e veniva

raccolto nella *elution tube*. La colonnina veniva buttata e l'*elution tube* con l'RNA totale estratto era conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7 Retrotrascrizione e Real-Time PCR

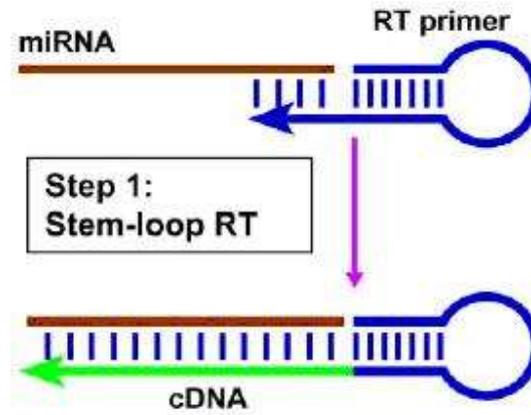
L'analisi dell'espressione dei microRNA nei campioni è stata condotta mediante Real-Time PCR quantitativa (qRT-PCR). Inizialmente le sequenze sono state sottoposte ad un processo di retrotrascrizione, utilizzando come innesco gli oligonucleotidi con una coda a forcina specifici per ogni singolo microRNA (Stem-loop primer). Essi consentono la retrotrascrizione solo dei microRNA maturi, ma non dei precursori dato che quest'ultimi presentano una struttura secondaria più complessa. Le sequenze di cDNA (Complementary DNA) ottenute sono state successivamente sottoposte a qRT-PCR, una tecnica che permette l'identificazione di specifici microRNA presenti nel campione e la valutazione della loro espressione in rapporto a quella di un normalizzatore appositamente scelto (Figura 8).



**Figura 8.** *Rappresentazione schematica della qRT-PCR. Le sequenze di microRNAs maturi vengono inizialmente retrotrascritte e poi sottoposte a Real-Time PCR (Pritchard CC Et al., 2012).*

### 3.7.1 Fase di retrotrascrizione

La retrotrascrizione (Reverse Transcription RT) permette di ottenere molecole di cDNA a partire da RNA a singolo filamento. Il cDNA è una sequenza di DNA a singolo filamento complementare all'RNA d'interesse. Sono necessari diversi reagenti: H<sub>2</sub>O, dNTPs, buffer contenente ioni Mg<sup>2+</sup>, enzima Trascrittasi Inversa e primers. Il processo avviene grazie all'enzima Trascrittasi Inversa, identificato nei retrovirus e utilizzato dagli stessi per la loro replicazione all'interno delle cellule infettate. È una DNA-polimerasi RNA-dipendente, perché in grado di sintetizzare DNA dallo stampo di RNA: in particolare catalizza la formazione del legame fosfodiesterico tra il gruppo 3'-OH dello zucchero Deossiribosio ed il fosfato 5' del dNTP da aggiungere alla catena, in direzione 5'→3'. Come qualsiasi DNA-polimerasi, necessita di un innesco di polimerizzazione che viene fornito dai primers. Il kit dell'Applied Biosystem prevede l'utilizzo di primers a stem-loop, ovvero con una struttura a forcina, che sono target specifici, in modo da retrotrascrivere solo la sequenza d'interesse (Applied, Biosystems. TaqMan MicroRNA Assays - Protocol. 2005.) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Retrotrascrizione con stem-loop primer

Innanzitutto, si preparano diverse mix di reagenti, in base ai microRNA da studiare. Si utilizzano provette da 0,2  $\mu$ l. Segue, nella **Tabella 1**, il protocollo per l'allestimento di RTmix, riferito ad un campione:

H2O	0,73 $\mu$ l
Buffer (1:10)	1 $\mu$ l
dNTPs (1:10)	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor (1:10)	1,26 $\mu$ l
Primer	2 $\mu$ l
Reverse Transcriptase	0,67 $\mu$ l

**Tabella 1.** Reagenti interessati nella retrotrascrizione per 1 campione

Tutti i reagenti necessari sono mantenuti alla temperatura di -20°C. L'H<sub>2</sub>O deve essere prima autoclavata e filtrata con lo scopo di evitare possibili contaminazioni. I dNTPs, come riportato in tabella, devono essere diluiti 1:10 a partire dalla soluzione madre di 100 mM. Allo stesso modo anche gli inibitori delle RNasi. Mentre per i dNTPs è possibile preparare una soluzione diluita da utilizzare per diverse reazioni, gli inibitori vanno diluiti di volta in volta per evitare che i cicli di congelamento/scongelo possano ridurre l'efficienza. Quest'ultimo reagente è di fondamentale importanza per la reazione in quanto protegge i microRNA dall'azione delle RNasi.

In primo luogo, vengono quindi preparate tante mix quanti sono i microRNA da analizzare. Si prepara sempre un quantitativo della mix superiore rispetto al numero effettivo di campioni da analizzare, per evitare problemi di dispensazione.

Concluse le preparazioni delle mix, si centrifugano e si procede con l'allestimento finale di

mix e campione: utilizzando sempre provette da 0,2 µl, il volume totale finale da ottenere per la reazione è di 10 µl, dei quali 6,66 µl di mix e 3,34 µl di RNA estratto, precedentemente scongelato e centrifugato. La miscela di mix e campione viene infine centrifugata (Eppendorf 5415C Centrifuge) e posta nei pozzetti del termociclatore PTC200 Peltier Thermal Cycler. Viene impostato il seguente protocollo di reazione, che prevede 3 cicli:

- 1. 16 °C per 30 minuti**
- 2. 42 °C per 30 minuti**
- 3. 85 °C per 5 minuti**

Durante la preparazione, campioni e reagenti devono essere mantenuti in ghiaccio per

ridurre l'attività dell'RNasi. È importante seguire scrupolosamente tutte le indicazioni riportate.

Terminati i cicli, il termociclature rimane a 4°C. Una volta scaricate le provette dalla macchina, vanno tempestivamente poste a 4°C o in ghiaccio per procedere con la successiva Real-Time PCR. A questo punto le provette contengono cDNA (Chen C Et al., 2005).

### 3.7.2 *Real-Time PCR*

La Real-Time PCR (qPCR) è una PCR che permette di quantificare il cDNA presente nel campione durante l'amplificazione dello stesso. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, complementari alla sequenza d'interesse, che emettono un segnale durante la reazione a catena della polimerasi. Tale segnale fluorescente viene trasformato in valore numerico da un software collegato al lettore ottico interno al termociclature, e così rilevato. L'intensità di fluorescenza viene monitorata continuamente e risulta direttamente proporzionale al cDNA e, conseguentemente, all'RNA di partenza.

Anche in questa fase, campioni e reagenti vanno mantenuti sempre in ghiaccio e manipolati con materiale dedicato. Importante è dividere gli ambienti del laboratorio per lo svolgimento delle diverse fasi, a partire dall'estrazione, retrotrascrizione, fino all'allestimento della Real-Time: tutto ciò per evitare qualsiasi contaminazione crociata. Inizialmente si procede con l'allestimento delle mix, anche in questo caso tante quanti sono i miRNA da analizzare. Ogni campione viene studiato in doppio; inoltre, si considera sempre un volume superiore rispetto al numero di campioni per i possibili problemi di dispensazione.

La mix per la Real-Time prevede un numero minore di reagenti rispetto alla retrotrascrizione (**Tabella 2**).

H2O	1,84 $\mu$ l
Mix Real-Time	5 $\mu$ l
Sonda	0,5 $\mu$ l

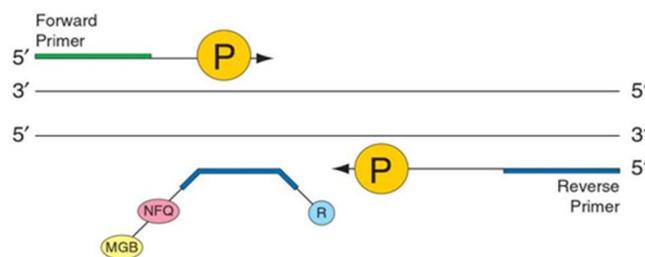
**Tabella 2.** *Reagenti interessati nella Real-Time per un campione.*

La Mix Real-Time è fornita già pronta come 2X TaqMan Universal Master Mix; le sonde utilizzate sono di tipo TaqMan.

Una volta pronte, le mix vengono centrifugate e dispensate in strip costituite da quattro pozzetti da 0,1  $\mu$ l. Anche in questo caso, il volume finale totale deve essere di 10  $\mu$ l: si dispensano 7,34  $\mu$ l di mix e 2,66  $\mu$ l di campione retrotrascritto cDNA, fatto correre in doppio, come già detto. Le eppendorf vengono poi chiuse con appositi tappi: in questa fase è importante segnare il verso delle provette, per evitare di scambiare i campioni. A questo punto possono essere poste nella macchina Rotor-Gene Q Qiagen, mantenendo la giusta posizione e bilanciando tutti i campioni, poiché la macchina funge anche da centrifuga. Si seleziona il seguente protocollo di amplificazione:

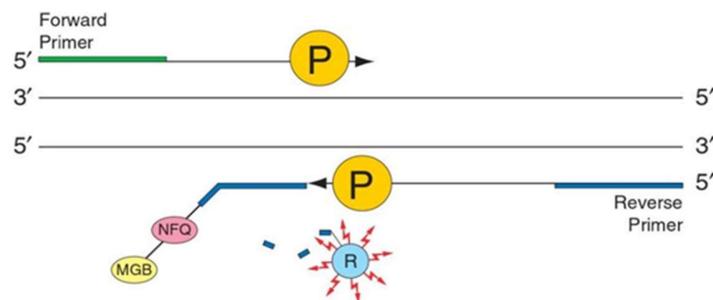
1. 95°C per 10 minuti
2. 95°C per 15 secondi
3. 60°C per 1 minuto

Gli ultimi due passaggi vengono ripetuti per 40 cicli. Le sonde TaqMan da aggiungere alla mix di Real-Time sono marcate con due fluorocromi, il reporter ed il quencher. Il reporter emette fluorescenza ed è legato all'estremità 5' dell'oligonucleotide; il quencher, legato all'estremità 3', spegne la rilevazione di fluorescenza emessa dal reporter quando si trova nelle sue vicinanze. Quindi, finché la sonda è unita e i due fluorocromi vicini, non si avrà emissione di fluorescenza. Durante l'amplificazione la TaqMan si lega specificatamente alla sequenza complementare tra i siti dei primer forward e reverse, come presentato in **Figura 10**.



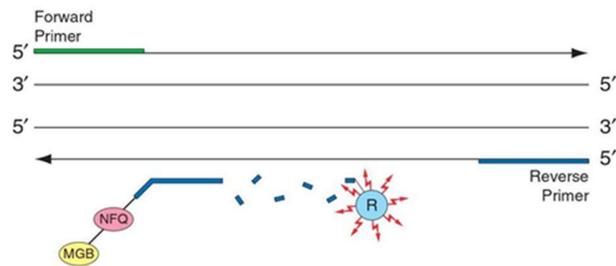
**Figura 10.** Polimerizzazione da parte della DNA polimerasi e sonda TaqMan legata alla sequenza complementare. NFQ: quencher, MGB: minor groove binder, R: reporter, P: DNA polimerasi.

Durante il processo di polimerizzazione, la DNA polimerasi, contenuta all'interno della Mix Real-Time, si lega al frammento di DNA da amplificare. Nel caso in cui si trovi ancorata al filamento di DNA d'interesse (e solo in tal caso), la sonda viene rotta con attività 5'→3' esonucleasica: in questo modo il quencher ed il reporter si separano e quest'ultimo è libero di emettere fluorescenza, che viene rilevata dalla macchina (**Figura 11**).



**Figura 11.** La DNA polimerasi rompe la sonda ed il reporter è libero di emettere fluorescenza. NFQ: quencher, MGB: minor groove binder, R: reporter, P: DNA polimerasi.

Ad ogni ciclo si avrà un aumento esponenziale della fluorescenza, direttamente proporzionale alla quantità di prodotto. L'aumento del segnale fluorescente si ha solo nei casi in cui la sequenza target sia complementare ed amplificata: così amplificazioni non specifiche non sono rilevate (**Figura 12**).

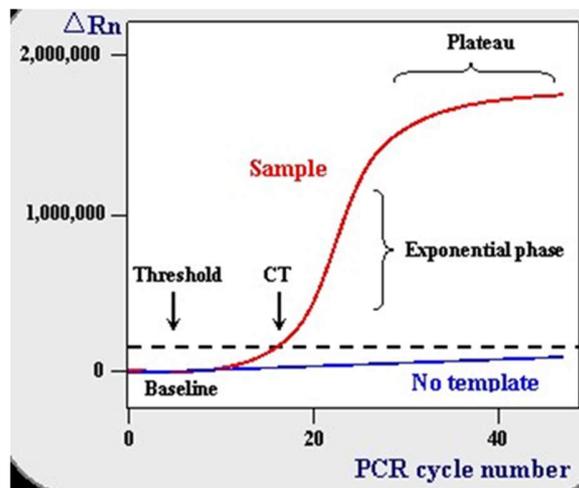


**Figura 12.** Completamento della polimerizzazione. *NFQ*: quencher, *MGB*: minor groove binder, *R*: reporter.

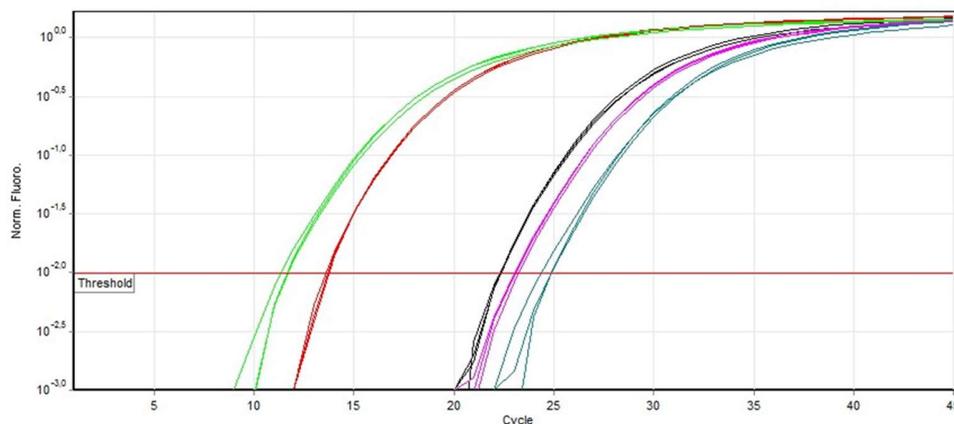
La corsa completa dura circa 80/90 minuti. È possibile valutare i risultati conclusivi a fine corsa oppure durante il processo di amplificazione stesso: la fluorescenza viene emessa in tempo reale e la macchina legge il segnale alla fine di ogni ciclo. Ogni campione è rappresentato da una curva di amplificazione con andamento sigmoide. I primi cicli, in cui non è misurabile la variazione nel segnale di fluorescenza, definiscono la linea base (baseline) della curva. Un aumento di fluorescenza oltre la linea base indica il rilevamento del prodotto in fase di accumulo. Un secondo parametro importante è la linea soglia (Threshold), parallela alla linea base. Questa deve tagliare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale: viene scelta dall'operatore e varia per ogni seduta. Infatti, nella fase esponenziale è possibile misurare la quantità di amplificato, proporzionale al numero di cicli, con resa teorica al 100%.

Il Ct, ciclo soglia o threshold cycle è il numero del ciclo in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea soglia ed è un indicatore fedele della quantità

iniziale di RNA. Si trova a circa 2/3 della retta e rappresenta il ciclo a cui si rileva una fluorescenza che supera il segnale di fondo. Dopo la fase esponenziale si ha la fase di plateau, poiché il processo di amplificazione è limitato dalla quantità di primers, dall'attività dell'enzima e dal reannealing dei filamenti, e la resa diminuisce. Valutando il valore dei Ct di ogni campione si ricava la concentrazione iniziale di RNA secondo una proporzionalità inversa (Heid CA. Et al., 1996) (Chen C. Et al., 2011). Le curva di amplificazione di una Real-Time PCR possono essere rappresentate in scala lineare (**Figura 13**) o in scala logaritmica (**Figura 14**).



**Figura 13.** Fasi di amplificazione di una Real-Time PCR in scala lineare



**Figura 14.** Curve logaritmiche di amplificazione Real-Time PCR

La quantificazione può essere effettuata in diversi modi.

- Quantificazione assoluta: si basa sulla costruzione di una curva standard di campioni a concentrazione nota saggiati nelle medesime condizioni dei campioni che cerchiamo. La curva mette in relazione i Ct con le copie iniziali di campione. Vengono in questo modo calcolate le concentrazioni iniziali di cDNA dei campioni sconosciuti tramite interpolazione dei loro Ct con la curva standard.

- Quantificazione relativa: si confrontano i valori di Ct dei miR d'interesse con i Ct di miRNA definiti normalizzatori. Durante la stessa corsa di Real-Time PCR, i miRNA d'interesse ed il miRNA normalizzatore vengono amplificati nelle medesime condizioni.

Ad oggi non sono ancora stati descritti normalizzatori standardizzati per i miRNA (78). Inoltre, alcuni di questi controlli endogeni vengono comunque degradati attraverso meccanismi poco chiari. Per questo, con lo scopo di ottenere risultati accurati e riproducibili, l'espressione relativa dei miRNA d'interesse è effettuata utilizzando un normalizzatore

sintetico, esogeno, che viene aggiunto durante le prime fasi dell'estrazione: il microRNA di *Caenorhabditis elegans*, il cel-mir-39. Per normalizzare il Ct ottenuto a fine corsa si calcola il  $\Delta Ct$ : per ogni campione si sottrae al Ct del miR d'interesse quello del normalizzatore. Dal  $\Delta Ct$  si ricava l'espressione relativa (Relative

$-\Delta Ct$  Expression) =2.

Questo valore assegna un dato numerico adimensionale, ad indicare i livelli di espressione del microRNA d'interesse normalizzati in ogni campione. È possibile, inoltre, confrontare il valore di un campione con il valore di un campione di controllo,

$-\Delta\Delta Ct$  tramite il  $\Delta\Delta Ct$  e calcolando il Fold Change (X-fold) =2. Ciò indica l'aumento o la diminuzione di espressione del miR nel campione rispetto a quello di controllo (Livak KJ e Schmittgen TD., 2001) (Benes V e Castoldi M., 2010).

## 4 RISULTATI

Le caratteristiche dei pazienti arruolati in questo studio sono riassunte in **Tabella 3**. Sono stati inclusi 25 soggetti in totale, suddivisi in 5 soggetti sani di controllo (CTR), e 20 pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) con media (10) ed elevata (10) severità dal punto di vista neurocognitivo.

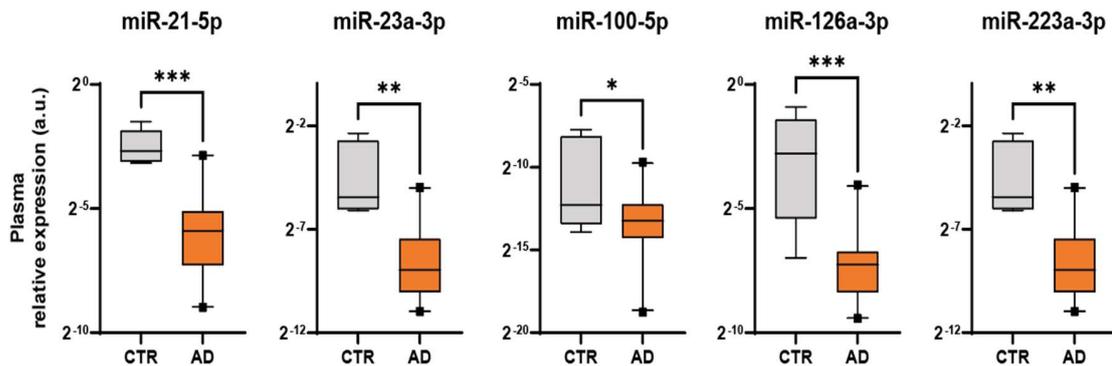
	CTR (n=5)	AD – severe (n=10)	AD – mild (n=10)
<b>Età (anni)</b>	69.2 (6.0)	74.3 (3.68)	74.3(1.80)
<b>Sesso (n, %)</b>	2 (40%)	5 (50%)	5 (50%)
<b>MMSE</b>	28.9 (1.4)	22.1 (1.2)	13.1 (1.7)

*Tabella 3 mostra le caratteristiche prese in considerazione per il*

Sono stati selezionati alcuni microRNA, in base a dati di letteratura prodotti sia del nostro laboratorio che di altri gruppi di ricerca. In particolare, i miR-23a-3p, miR-223a-3p e miR-100 sono stati selezionati perché associati in precedenza alla patologia di Alzheimer (Serpente et al. 2020). I miR-21-5p e miR-126a-3p, definiti “*inflammamiR*”, sono stati selezionati in quanto la loro espressione è modulata negli stati infiammatori, ed erano stati precedentemente associati alla malattia di Alzheimer dal gruppo di ricerca che ha collaborato a questo lavoro di tesi (Giuliani et al. 2021).

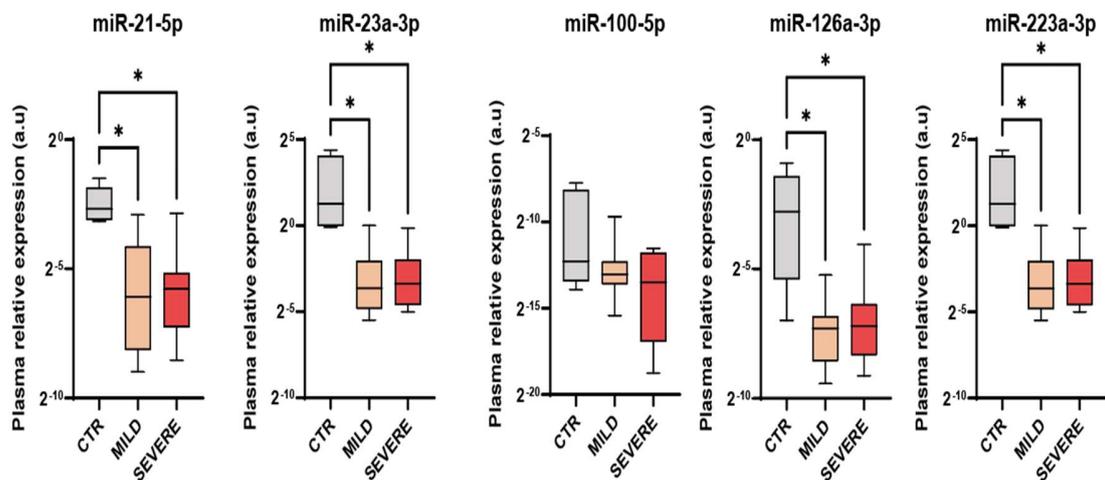
Dopo aver constatato tramite test di Shapiro-Wilk che la distribuzione dell’espressione dei microRNA non era normale, abbiamo proseguito le successive analisi utilizzando test statistici non parametrici. L’espressione relativa dei 5 microRNA presi in considerazione

nello studio è riportata in **Figura 15**, dove è possibile constatare che tutti e 5 i miRNAs sono risultati significativamente meno espressi nei soggetti AD rispetto ai controlli.



**Figure 15:** Espressione relativa dei microRNA circolanti valutata tramite Real Time PCR. CTR: soggetti sani; AD: soggetti affetti da Alzheimer. Test statistico applicato: U di Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

A questo punto siamo andati a vedere se ci fosse una differenza significativa di espressione dei microRNA circolanti plasmatici tra i soggetti AD suddivisi in due gruppi: AD con una patologia più severa (n=10) o meno severa (n=10) in termini di deterioramento cognitivo valutato tramite MMSE. I risultati sono mostrati in **Figura 16**. Possiamo vedere che nessun microRNA riesce a discriminare tra forme lievi (MILD) e forme più severe (SEVERE) della patologia, ma estremamente interessante è il fatto che 4 dei 5 microRNA presi in esame (miR-21-5p, miR23a-3p, miR-126-3p e miR-223a-3p) sono in grado di rilevare la presenza di un decadimento cognitivo anche lieve.

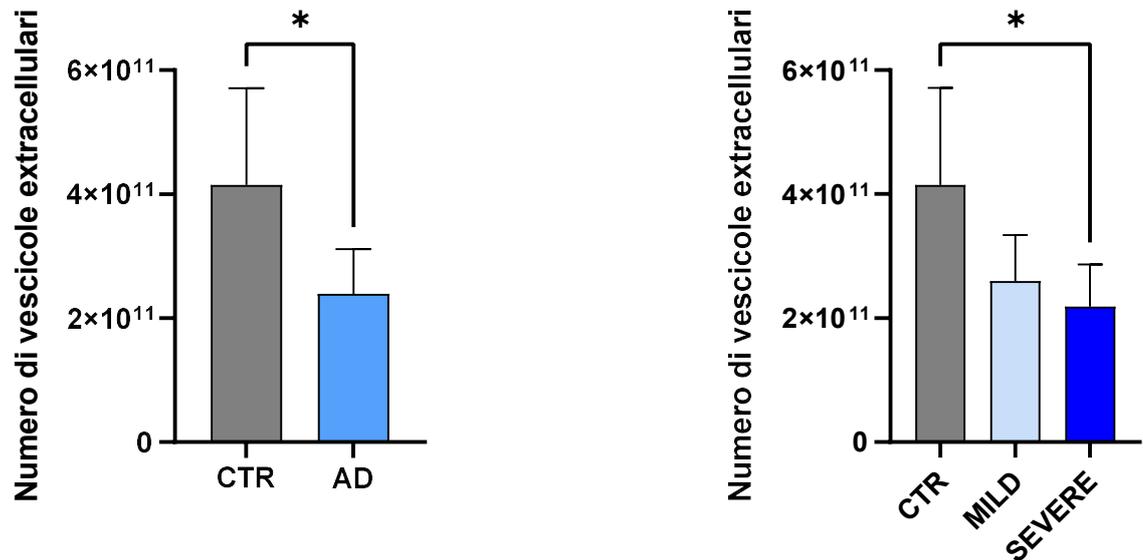


**Figure 16:** Espressione relativa (in arbitrary unit, a.u.) dei microRNA circolanti valutata tramite Real Time PCR. cel-miR-39 è stato utilizzato come normalizzatore dell'efficienza di estrazione. Test statistico applicato: Kruskal-Wallis con confronti post-hoc secondo Dunn. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Poiché numerosi recenti studi hanno mostrato che i microRNA presenti nel plasma vengono rilasciati dalle cellule incapsulati all'interno di vescicole extracellulari, siamo andati a vedere se i microRNA presi in esame nel nostro studio fossero presenti all'interno di vescicole specificamente rilasciate da cellule neuronali. Per questo, abbiamo isolato le vescicole extracellulari con marcatore CD171 presenti nel plasma dei campioni arruolati. CD171 (anche nota con il nome L1CAM) è una proteina transmembrana di adesione neuronale, particolarmente abbondante nelle cellule del sistema nervoso.

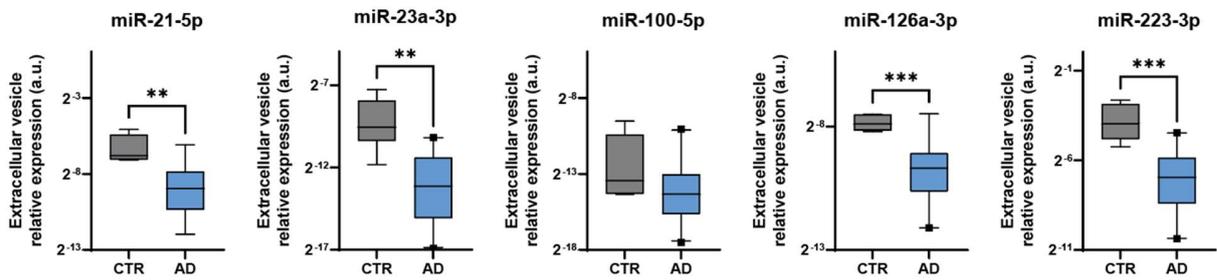
Prima di tutto abbiamo confrontato il numero di vescicole neuronali CD171 positive in controlli sani e pazienti con AD (**Figura 17A e 17B**). Abbiamo osservato come i pazienti AD presentassero una quantità inferiore rispetto ai CTR di vescicole positive per CD171 estratte a partire da 700  $\mu$ l di plasma. Separando i soggetti con Alzheimer in base al MMSE

in MILD e SEVERE abbiamo constatato come il numero di vescicole ridotto sia presente nei pazienti con AD SEVERE.



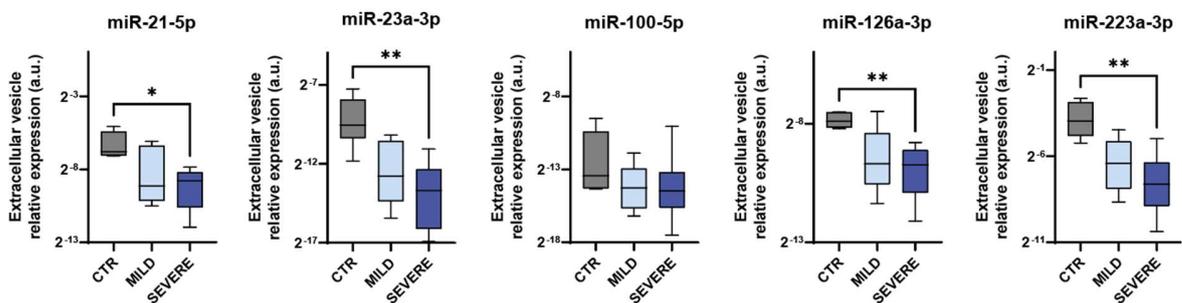
**Figure 17:** numero di vescicole extracellulari CD171 positive ricavate a partire da 500  $\mu$ l di plasma di ciascun soggetto. (A) Differenza tra soggetti CTR e AD. Test statistico: U di Mann-Whitney.  $*p < 0.05$ . (B) Differenza tra soggetti CTR e AD suddivisi in MILD e SEVERE. Test statistico: Kruskal-Wallis con confronti post-hoc secondo Dunn.  $*p < 0.05$ .

A questo punto abbiamo valutato l'espressione dei microRNA nelle vescicole CD171 positive. L'espressione dei miRNAs nelle vescicole riflette quella dei miRNAs nel plasma, ad eccezione del miR-100-5p (Figura 15 e Figura 18).



**Figure 18:** *Espressione relativa (in arbitrary unit, a.u.) dei microRNA circolanti nelle vescicole extracellulari CD171-positive valutata tramite Real Time PCR. cel-miR-39 è stato utilizzato come normalizzatore dell'efficienza di estrazione. CTR: soggetti sani; AD: soggetti affetti da Alzheimer. Test statistico applicato: U di Mann-Whitney. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$*

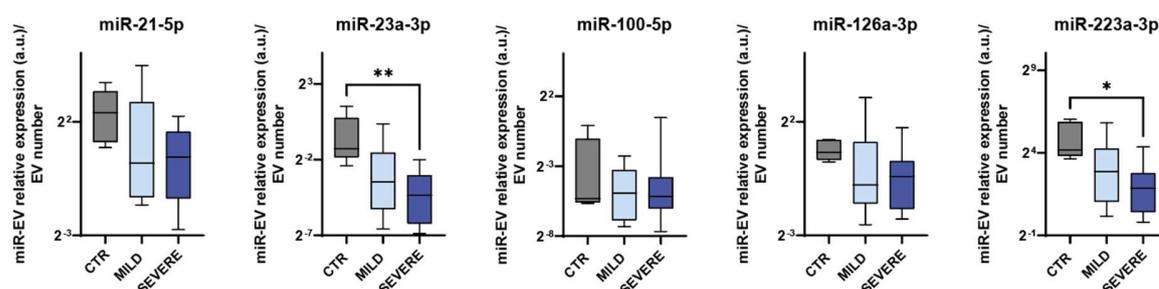
Andando a valutare l'espressione dei microRNA delle vescicole separando i pazienti AD in MILD e SEVERE, vediamo che una differenza significativa si osserva tra i CTR e i soggetti AD-SEVERE per i miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-126a-3p e miR-223-3p (Figura 19). Al contrario di quanto avviene nel plasma, in questo caso i miR non discriminano tra i CTR e i soggetti MILD, suggerendo che parte dei microRNA saggiati nel plasma, possano viaggiare al di fuori delle vescicole CD171-positive.



**Figure 19:** *Espressione relativa (in arbitrary unit, a.u.) dei microRNA circolanti nelle vescicole extracellulari CD171-positive valutata tramite Real Time PCR. cel-miR-39 è stato utilizzato come normalizzatore dell'efficienza di estrazione. Test statistico applicato: Kruskal-Wallis con confronti post-hoc secondo Dunn. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .*

Oltre alla normalizzazione dell'efficienza di estrazione dell'RNA, abbiamo normalizzato l'espressione dei microRNA anche per il numero di vescicole, analizzate mediante la tecnologia nota come Nanoparticles Tracking Analysis (NTA).

Normalizzando l'espressione dei miRNAs per il numero di vescicole contenute in ciascun campione le uniche differenze che restano significative riguardano il miR-23a-3p e il miR-223a-3p (**Figura 20**). Possiamo pertanto affermare che, almeno in parte, i ridotti livelli circolanti di questi due microRNA osservati nei soggetti affetti da AD possano essere attribuiti ad un ridotto caricamento nelle vescicole extracellulari (EV) da parte dei neuroni.



**Figura 20:** Espressione relativa (in arbitrary unit, a.u.) dei microRNA circolanti nelle vescicole extracellulari CD171-positive valutata tramite Real Time PCR. cel-miR-39 è stato utilizzato come normalizzatore dell'efficienza di estrazione. L'espressione è stata normalizzata per il numero di vescicole extracellulari. Test statistico applicato: Kruskal-Wallis con confronti post-hoc secondo Dunn. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 5 Conclusioni

La Malattia di Alzheimer è la prima causa di demenza nella popolazione anziana in Italia e negli altri paesi sviluppati. Si tratta di una patologia cronico-degenerativa, i cui sintomi progrediscono nel tempo, diventando talmente gravi nel giro di alcuni anni dalla diagnosi da interferire con le attività quotidiane e portando il paziente ad un grave grado di disabilità.

La diagnosi, anche in fase precoce, viene oggi effettuata grazie all'utilizzo di biomarcatori liquorali e di imaging, che sono però costosi e invasivi ed il cui utilizzo resta quindi limitato a pochi centri di secondo livello sul territorio nazionale. Per questi motivi è indispensabile identificare marcatori meno invasivi, quali potrebbero essere marcatori presenti nel sangue periferico, che consentano quindi, con un semplice prelievo, di avere informazioni sulla popolazione a rischio, nell'ottica di individuare i soggetti che debbano eseguire indagini ulteriori e monitoraggi continui.

In quest'ottica i microRNA circolanti nel plasma, eventualmente contenuti all'interno di vescicole extracellulari, potrebbero rappresentare un valido strumento. Gli esosomi sono nanovesicole di 30-100 nm di diametro che trasportano al loro interno materiale biologico funzionalmente attivo come DNA, proteine, mRNA e miRNA e sono quindi in grado di trasmettere specifici segnali da una cellula di origine alle cellule circostanti nel microambiente ma anche ad organi a distanza, circolando attraverso il torrente circolatorio e linfatico. Sempre più interesse è volto allo studio del ruolo degli esosomi in condizioni fisiologiche e patologiche. Essendo prodotti da tutti i tipi cellulari, gli esosomi si ritrovano in tutti i fluidi biologici. Inoltre, una volta prodotti, presentano sulla loro superficie dei marcatori specifici, che ne identificano la provenienza cellulare.

Dopo aver separato dal plasma gli esosomi neuronali in base al marcatore di superficie CD171 abbiamo osservato come i pazienti AD presentassero una quantità significativamente inferiore di esosomi di derivazione neuronale rispetto ai CTR. Separando i soggetti con Alzheimer in base al MMSE in MILD e SEVERE cognitive impairment, abbiamo constatato come il numero di esosomi neuronali ridotto sia presente nei pazienti con AD SEVERE. Si tratta di un dato innovativo, che potrebbe essere legato alla riduzione del numero di neuroni nei pazienti con AD, soprattutto in quelli con deterioramento cognitivo severo. L'AD, infatti, è una malattia neurodegenerativa progressiva caratterizzata dalla perdita di funzione e morte delle cellule neuronali in diverse aree del cervello, con conseguente perdita della funzione cognitiva.

Analizzando 5 miRNA, miR-21-5p, miR23a-3p, miR-100-5p, miR-126-3p e miR-223a-3p selezionati in base a dati di letteratura per essere miRNA associati all'AD, sia su plasma che su esosomi di origine neuronale, abbiamo potuto effettuare osservazioni innovative ed interessanti. Tutti i 5 miRNA analizzati erano significativamente meno espressi nel plasma dei pazienti AD rispetto al plasma dei soggetti sani (CTR). Quando i pazienti affetti da AD sono stati raggruppati in base al livello del decadimento cognitivo, abbiamo osservato che nessun microRNA riusciva a discriminare tra forme lievi (MILD) e forme più severe (SEVERE) della patologia. È però emerso come dato estremamente interessante il fatto che 4 dei 5 microRNA presi in esame, quali il miR-21-5p, miR23a-3p, miR-126-3p e miR-223a-3p, erano in grado di rilevare la presenza di un decadimento cognitivo lieve. Al contrario di quanto osservato nel plasma, nelle vescicole neuronali i miRNA non discriminavano tra i CTR e i soggetti MILD, suggerendo che parte dei microRNA analizzabili nel plasma, possano viaggiare al di fuori delle vescicole CD171-positive.

Abbiamo infine normalizzato l'espressione dei microRNA per il numero di vescicole, contando gli esosomi con tecnologia NTA. Le differenze di espressione fra AD e CTR sani si sono confermate essere significative solo per il miR-23a-3p e per il miR-223a-3p. Potremmo quindi affermare che, almeno in parte, i ridotti livelli circolanti di questi due microRNA osservati nei soggetti affetti da AD possano essere attribuiti ad un ridotto caricamento degli stessi miRNA nelle vescicole extracellulari (EV) prodotte dai neuroni.

Il fatto che il miR-21-5p e il miR-126-3p siano ridotti nelle vescicole dei pazienti AD rispetto ai CTR, ma dopo normalizzazione per il numero di vescicole non si osservi più una differenza significativa, indica probabilmente che tali miRNA sono ridotti nell'AD probabilmente a causa del minor rilascio di vescicole di origine neurologica osservato negli AD.

Possiamo quindi concludere che entrambi gli approcci di normalizzazione andrebbero effettuati perché in grado di dare informazioni complementari e che si integrano. La quantificazione degli esosomi nei singoli campioni è comunque da consigliare se si vogliono fare confronti di espressione di microRNA caricati dentro le vescicole extracellulari.

Le conclusioni presentate in questo lavoro di tesi, dovranno essere confermate su un campione più ampio di pazienti AD e controlli sani, in esperimenti futuri.

## **6 Ringraziamenti per la collaborazione allo svolgimento del progetto di tesi**

Si ringraziano:

- la Clinica di Neurologia dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (INRCA) di Ancona.

-la Prof.ssa Patrizia Ambrogini del dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università "Carlo Bo" di Urbino.

-la Prof.ssa Maria Cristina Albertini del dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università "Carlo Bo" di Urbino.

-il Prof. Michele Guescini, del dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università "Carlo Bo" di Urbino.

## 7 Bibliografia

- Applied, Biosystems. TaqMan MicroRNA Assays - Protocol. 2005.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297
- Benes V e Castoldi M. 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods. 50: 244-249
- Bertoli G., Claudia Cava, e Isabella Castiglioni. 2015. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. Theranostics 5: 1122-1143

- Bottani M., Giuseppe Banfi e Giovanni Lombardi. 2020. The Clinical Potential of Circulating miRNAs as Biomarkers: Present and Future Applications for Diagnosis and Prognosis of Age-Associated Bone Diseases. *Biomolecules* 10: 589
- Chen C. Et al. 2011. Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. *Methods Mol Biol.* 687: 113-134
- Chen, C, et al. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33: 179
- Chengxuan Qiu, Miia Kivipelto, Eva von Strauss. 2009. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neuroscience* 11: 111-128
- Eulalio Ana, Eric Huntzinger, Tadashi Nishihara, Jan Rehwinkel, Maria Fauser, Elisa Izaurralde. 2009. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15: 21-32
- Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL, Goetzl EJ. 2015. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* 11: 600-607

- Foessel I, Kotzbeck P, Obermayer-Pietsch B. 2019. MicroRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. *Journal of Laboratory and Precision Medicine* 4: 2
- Giuliani A., Simona Gaetani, Giulia Sorgentoni, Silvia Agarbati, Maristella Laggetta, Giulia Maticchione, Mirko Gobbi, Tommaso Rossi, Roberta Galeazzi, Gina Piccinini, Giuseppe Pelliccioni, Anna Rita Bonfigli, Antonio Domenico Procopio, Maria Cristina Albertini, Jacopo Sabbatinelli, Fabiola Olivieri and Francesca Fazioli. 2021. Circulating InflammamiRs as Potential Biomarkers of Cognitive Impairment in Patients Affected by Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 13: 647015
- Hawkins P.G. and Morris K.V. 2008. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 7: 602-607
- Heid, CA. Et al. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994
- Jesús García-López, Miguel A Brieño-Enríquez, Jesús Del Mazo. 2013. MicroRNA biogenesis and variability. *Biomol Concepts* 4: 367-380
- Jian Zhang, Sha Li, Lu Li, Meng Li, Chongye Guo, Jun Yao, Shuangli Mi. 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13: 17-24

- Koppers-Lalic D., Michael Hackenberg, Irene V Bijnsdorp, Monique A J van Eijndhoven, Payman Sadek, Daud Sie, Nicoletta Zini, Jaap M Middeldorp, Bauke Ylstra, Renee X de Menezes, Thomas Würdinger, Gerrit A Meijer, D Michiel Pegtel. 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 8: 1649-1658
- Kosaka N., Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Naomi Tominaga, Takeshi Katsuda, Takahiro Ochiya. 2013. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet.* 4: 173
- Leonardo Guzman-Martinez, Ricardo B Maccioni, Gonzalo A Farías, Patricio Fuentes, Leonardo P Navarrete. 2019. Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 16: 518-528
- Mark W Bondi, Emily C Edmonds, David P Salmon. 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Society* 23: 818-831
- Method. Livak, KJ e Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods.* 25: 402-408

- Moxon Simon, Runchun Jing, Gyorgy Szittyá, Frank Schwach, Rachel L Rusholme Pilcher, Vincent Moulton, Tamas Dalmay. 2008. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Res.* 18: 1602-1609
- Phuong T B Ho, Ian M Clark, Linh T T Le. 2022. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sciences* 23: 7167
- Pritchard CC, Heather H Cheng, Muneesh Tewari. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13: 358-369
- R C Lee, R L Feinbaum, V Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854
- Maria Serpente, Chiara Fenoglio, Marianna D'Anca, Marina Arcaro, Federica Sorrentino, Caterina Visconte, Andrea Arigh, Giorgio G Fumagalli, Laura Porretti, Alessandra Cattaneo, Miriam Ciani, Roberta Zanardini, Luisa Benussi, Roberta Ghidoni, Elio Scarpini, Daniela Galimberti. 2020. MiRNA Profiling in Plasma Neural-Derived Small Extracellular Vesicles from Patients with Alzheimer's Disease. *Cells.* 9: 1443

- Shuibin Lin, Richard I Gregory. 2015. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 321-333
- T P Nhung Nguyen, Mandeep Kumar, Ernesto Fedele, Giambattista Bonanno, Tiziana Bonifacino. 2022. MicroRNA Alteration, Application as Biomarkers, and Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sciences* 23: 4718
- Tan Yuliang, Bo Zhang, Tao Wu, Geir Skogerbø, Xiaopeng Zhu, Xiangqian Guo, Shunmin He, Runsheng Chen. 2009. Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by noncoding RNAs in human breast cancer cells. *BMC Mol. Biol.* 10: 12
- Villarroya-Beltri C., Cristina Gutiérrez-Vázquez , Fátima Sánchez-Cabo, Daniel Pérez-Hernández, Jesús Vázquez, Noa Martín-Cofreces, Dannys Jorge Martínez-Herrera, Alberto Pascual-Montano, María Mittelbrunn, Francisco Sánchez-Madrid. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 4: 2980
- William A.E. 2008. Functional aspect of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life* 65: 545-562

- Xiu-Jie Wang, José L Reyes, Nam-Hai Chua, Terry Gaasterland. 2004. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biology* 5: R65