



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Dipartimento di Neuroscienze e Dipartimento di Biologia Sperimentale

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Corso di Dottorato in Neuroscienze

**STUDIO DI ASSOCIAZIONE CASO-CONTROLLO DI
ALCUNI GENI CANDIDATI NEL DISTURBO BIPOLARE IN
UN CAMPIONE SARDO**

Area 05 - Scienze Biologiche - SSD BIO/14 Farmacologia

Dottorando: *Dott. Alessio Squassina*

Coordinatore del Dottorato

Prof. Walter Fratta

Tutor

Prof.ssa Maria Del Zompo

Direttore della scuola:

Prof. Giovanni Biggio

XX° CICLO

2004-2007

INDICE

1. Introduzione	2
2. Neurobiologia del Disturbo Bipolare	4
2.1 Asse Ipotalamo-Pituitario-Surrenale (HPA).....	5
2.2 Neurotrasmettitori.....	5
2.2.1 Sistema Dopaminergico.....	6
2.2.2 Sistema Serotoninergico.....	9
2.3 Sistemi di trasduzione del segnale e dei ritmi circadiani.....	12
2.3.1 Sistemi di trasduzione del segnale.....	12
2.3.2 Sistema dei ritmi circadiani.....	23
3. Genetica del Disturbo Bipolare	26
4. Scopo dello Studio	34
5. Materiali e Metodi	35
5.1 Campione.....	35
5.2 Geni e Marker selezionati.....	36
5.3 Genotipizzazione e Gene expression.....	39
5.3.1 Estrazione dell'RNA e allestimento di una banca di cDNA.....	47
5.3.2 Real Time PCR.....	48
5.4 Statistica e Bioinformatica.....	51
6. Risultati	53
6.1 Geni del Sistema Dopaminergico.....	53
6.2 Geni del Sistema Serotoninergico.....	53
6.3 PDLIM5: associazione ed espressione.....	54
6.4 NR1D1.....	54
7. Discussione	55
8. Conclusioni	60
9. Appendice	61
10. Bibliografia	70

1. INTRODUZIONE

Nei sistemi classificativi dei disturbi mentali il Disturbo Bipolare (DB) rientra tra i disturbi dell'umore e indica un quadro clinico caratterizzato dalla ricorrenza di episodi affettivi maggiori di opposta polarità, che oscillano cioè da uno stato maniacale ad uno depressivo, accompagnati da alterazioni del pensiero e del comportamento. Chi risulta affetto da DB va incontro ad episodi di mania e di depressione che si alternano a periodi più o meno brevi di relativo benessere. Lo studio del *National Institute of Mental Health* (NIMH) "Epidemiologic Catchment Area" (ECA) ha rilevato, per il DB, una prevalenza nel corso della vita pari all'1,2 % con un'età media all'esordio di 18 anni per l'uomo e di 20 anni per la donna (Robins & Price RK., 1991). Secondo i criteri del *Research Diagnostic Criteria* (RDC) il DB è suddiviso in tre sottogruppi diagnostici: Disturbo Bipolare I (DB I), Disturbo Bipolare II (DB II) e Disturbo Schizoaffettivo prevalentemente affettivo.

Il DB I si caratterizza per la presenza di uno o più episodi depressivi con almeno un episodio di eccitamento maniacale, più raramente sono presenti esclusivamente fasi maniacali (mania unipolare).

Durante gli episodi depressivi il paziente presenta sintomi come apatia, letargia, disperazione, disturbi del sonno, rallentamento psico-motorio, deficit della memoria, riduzione delle capacità di concentrazione. Nel corso degli episodi di mania i pazienti presentano umore e autostima elevati, una minore necessità di sonno, abbondanza di energie e una aumentata produttività, comportamento bizzarro, delirio di grandezza, iperprodigalità, logorrea o "insalata di parole".

Il DB II si contraddistingue per l'alternanza di episodi depressivi maggiori e episodi ipomaniacali o per la presenza, accanto agli episodi depressivi, di ciclotimia o sintomi stabili di ipertimia. Vengono definiti ipomaniacali gli episodi espansivi meno gravi rispetto a quelli maniacali, in cui la persistente e marcata elevazione del tono dell'umore non si accompagna a sintomi psicotici e non è tale da compromettere in modo grave l'adattamento familiare, sociale e lavorativo.

Il disturbo schizoaffettivo, infine, consiste nella contemporanea presenza di alterazione dell'umore in senso depressivo e/o maniacale e di sintomi psicotici, quale delirio, allucinazioni e disturbi logico-formali del pensiero. A seconda della durata dei sintomi psicotici, si possono avere forme a prevalenza affettiva, schizofrenica o indeterminata.

Il decorso naturale del DB spesso porta a un progressivo deterioramento delle prestazioni dei soggetti affetti, con compromissione di una o più aree funzionali: perdita del posto di lavoro, interruzione dei rapporti interpersonali, abuso di sostanze, problemi legali, ospedalizzazioni e suicidio. La mortalità per suicidio tra i pazienti con DB è di circa 2-3 volte superiore rispetto alla popolazione generale (Culver JL et al., 2007).

2. NEUROBIOLOGIA DEL DISTURBO BIPOLARE

Seppure l'eziologia del DB non sia tuttora completamente nota, negli ultimi decenni sono stati fatti enormi progressi. L'insorgenza della patologia è determinata da una complessa interazione tra diversi sistemi biologici la cui funzionalità e/o morfologia risulta alterata. Le caratteristiche cliniche del DB comprendono alterazioni comportamentali, dei ritmi circadiani, della neurofisiologia del sonno, della regolazione neuroendocrina e biochimica nel cervello, nonché alterazioni volumetriche di differenti aree cerebrali (Ikonomov OC. et al., 1999; Manji HK. et al., 2000). L'idea che il DB potesse essere correlato ad alterazioni strutturali di alcune aree cerebrali nasce dalle osservazioni che lesioni del lobo frontale e/o temporale, causate da tumori, ictus o incidenti, determinano l'insorgenza di stati simil-maniacali (Cummings JL. & Mendez MF. 1984; Cummings JL. 1993).

Diversi studi di *neuroimaging*, condotti tramite tomografia computerizzata e risonanza magnetica, hanno messo in evidenza un volume maggiore dei ventricoli di pazienti bipolari rispetto a soggetti non affetti (Schlegel S. & Krtezschar K. 1987; Dewan MJ. et al., 1988; Strakowski SM. et al., 1993). Inoltre, è stato dimostrato che i soggetti bipolari hanno un volume minore del lobo frontale ed un volume maggiore del talamo, dei gangli della base, dell'ippocampo e dell'amigdala. Tali alterazioni volumetriche sono associate ad alterazioni dell'attività e del metabolismo di diversi sistemi biologici, come dimostrato da studi di *functional imaging* (Strakowski SM. et al., 2002).

Le alterazioni volumetriche sembrano, infatti, essere il risultato di una alterata attività di fattori neurotrofici, della neurotrasmissione e dei sistemi neuroendocrini.

2.1 ASSE IPOTALAMO-PITUITARIO-SURRENALE (HPA)

L'HPA consiste di un sistema di feedback che include l'ipotalamo e le ghiandole ipofisaria e surrenale. Gli ormoni che regolano l'HPA sono l'Ormone di Rilascio della Corticotropina (CRH), l'Arginina-Vasopressina (AVP), l'Ormone Adrenocorticotropo (ACTH) e il cortisolo. L'asse HPA è coinvolto nella risposta allo stress e alterazioni a carico di tale sistema sono state dimostrate essere implicate nel DB. Un'aumentata attività dell'asse HPA risulta associata agli stati maniacali e alla depressione (review in Manji HK. & Lenox RH., 2000).

2.2 NEUROTRASMETTITORI

Numerosi studi biochimici, di neuroimaging e postmortem hanno evidenziato il ruolo fondamentale di alterazioni a carico dei sistemi di neurotrasmettitori nel modulare l'insorgenza del DB. Seppure siano state riportate alterazioni a carico dei sistemi GABAergico e Glutamatergico (review in Benicio N et al., 2007), le prime teorie sulle possibili alterazioni della neurotrasmissione implicate nella patofisiologia del DB si sono sviluppate attorno ai sistemi mediati dalle amine biogene. Il network di interconnessioni neurotrasmettitoriali tra aree limbiche, striatali e fronto-corticali sembra, infatti, essere coinvolto nella patofisiologia del disturbo e i sistemi colinergico, catecolaminergico e serotoninergico costituiscono candidati d'elezione nello studio delle basi biologiche del DB (Manji HK et al., 2003).

2.2.1 SISTEMA DOPAMINERGICO

La dopamina è una amina biogena coinvolta nella regolazione di un gran numero di funzioni nervose: motorie, neuroendocrine, cognitive e comportamentali. I neuroni dopaminergici sono principalmente localizzati a livello del mesencefalo ventrale e sono distribuiti in tre gruppi a formare il nucleo retrobulbare, la substantia nigra e l'area ventro-tegmentale.

Dalla substantia nigra fibre ascendenti si portano allo striato dove esercitano un controllo sulle funzioni motorie; una degenerazione di queste fibre si associa al morbo di Parkinson. Dall'area ventro-tegmentale i neuroni proiettano al sistema limbico e alla corteccia e sono coinvolti nel controllo delle funzioni emozionali, motivazionali, comportamentali e di gratificazione; alterazioni a questo livello si associano a diversi disturbi psichiatrici (Egan MF. et al., 1997; Swanson J. et al., 1998).

La dopamina è anche coinvolta nel controllo di aree visive e di associazione, nei processi di apprendimento e nelle disfunzioni mnesiche (Lidow MS. et al., 1998).

La dopamina è sintetizzata a partire dalla tirosina grazie all'azione sequenziale degli enzimi, tirosina idrossilasi (TH), con la produzione dell'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) e dalla DOPA-decarbossilasi che la converte a dopamina. Nei terminali nervosi dopaminergici è quindi immagazzinata in vescicole e rilasciata con un meccanismo di esocitosi Ca^{2+} dipendente. La dopamina rilasciata nello spazio intersinaptico va a legarsi con i propri recettori.

I recettori dopaminergici vengono distinti in due famiglie in base sia alle omologie di sequenza che al profilo farmacologico: quella dei D1, comprendente i recettori D1 e

D5, e quella dei D2 comprendente i recettori D2, D3, e D4, tutti accoppiati a proteine G. I recettori della famiglia D1 sono accoppiati ad una proteina Gs (stimolatorie), quelli della famiglia D2 ad una proteina Gi/Go (inibitorie). La famiglia D1 stimola la sintesi del secondo messaggero Adenosinmonofosfato Ciclico (AMPC) mentre la famiglia D2 ne inibisce la sintesi.

Dopo l'interazione recettoriale, la dopamina viene rapidamente eliminata attraverso due principali meccanismi: catabolismo e ricaptazione.

Le principali vie di degradazione delle catecolamine sono rappresentate dalla deaminazione ossidativa ad opera delle Monoamino-ossidasi (MAO), e dalla metilazione ad opera delle Catecol-O-metiltransferasi (COMT). Inoltre, le catecolamine sono metabolizzate dalle sulfotransferasi. Sia la MAO che la COMT sono ampiamente distribuite in tutto l'organismo, compreso l'encefalo. Esistono differenze nella localizzazione dei due enzimi: mentre la MAO è associata principalmente con la superficie esterna mitocondriale, la COMT è localizzata in gran parte nel citoplasma.

Nell'uomo vi sono numerose evidenze biochimiche e cliniche a favore del coinvolgimento della dopamina nella sintomatologia della depressione e della mania. Nei pazienti depressi sono stati rilevati livelli di acido omovanillico (HVA), metabolita della dopamina, nel liquido cefalorachidiano significativamente più bassi rispetto a quelli di soggetti normali (Manji HK. & Potter W. 1997).

Una delle più valide evidenze cliniche è l'alta incidenza di depressione nei pazienti affetti da morbo di Parkinson nei quali la somministrazione di L-DOPA determina un miglioramento della sintomatologia affettiva che precede quella dei sintomi motori

(Larmande P. et al., 1993; Scappa S. et al., 1993). Questo farebbe presupporre che la dopamina migliori il tono dell'umore indipendentemente dall'effetto positivo svolto sulle performance motorie.

Agenti con attività sul sistema dopaminergico come la L-DOPA, l'amfetamina e la bromocriptina, possono indurre mania.

Il trattamento con farmaci antidepressivi triciclici o con inibitori delle monoamino-ossidasi, oltre che migliorare il tono dell'umore nei pazienti depressi, può determinare episodi di mania o un peggioramento della sintomatologia psicotica negli schizofrenici; al contrario, farmaci che agiscono bloccando i recettori dopaminergici hanno un effetto di tipo antimaniacale e, quando somministrati per lungo tempo, possono determinare l'insorgenza di una sintomatologia depressiva (review in Manji HK. & Lenox RH. 2000).

Recentemente, alcuni autori hanno riportato un aumento dell'affinità per i ligandi del Trasportatore Vesciolare delle Monoamine (VMAT2) in pazienti affetti da DB I, fornendo maggiori evidenze a riguardo delle alterazioni a carico della concentrazione delle monoamine nei pazienti affetti da DB (Zubieta JK. et al., 2000; Zucker M. et al., 2001)

2.2.2 SISTEMA SEROTONINERGICO

La serotonina (5-HT) è una amina biogena localizzata per il 90% nelle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale, nelle piastrine e in quantità significativa a livello di SNC dove svolge un'attività prevalentemente di tipo inibitorio ed è concentrata nei nuclei del rafe, in stretta connessione con il sistema noradrenergico che origina dal locus coeruleus.

La 5-HT è coinvolta in un ampio spettro di funzioni quali: sonno, appetito, attività sessuale, umore, sensibilità al dolore ed è in grado di influenzare vari sistemi fisiologici quali: cardiovascolare, respiratorio, termoregolatore ed endocrino.

Nei neuroni serotoninergici la 5-HT viene sintetizzata a partire dal triptofano ad opera della triptofano-idrossilasi (TPH), successiva decarbossilazione e conseguente immagazzinamento nelle vescicole sinaptiche.

La liberazione fisiologica della 5-HT dai terminali nervosi avviene per esocitosi Ca^{2+} -dipendente delle vescicole sinaptiche. Lo spegnimento del segnale serotoninergico avviene per ricaptazione della 5-HT da parte del trasportatore di membrana (SERT).

Attualmente, sono stati caratterizzate 7 famiglie di recettori serotoninergici, sia da un punto di vista farmacologico che molecolare.

La famiglia 5-HT1 comprende i recettori 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E e 5-HT1F, che sono accoppiati a proteine Gi (inibitorie), la cui attivazione determina una riduzione dei livelli di AMPc. La famiglia 5-HT2 comprende i recettori 5-HT2A, 5-HT2B e 5-HT2C, accoppiati a proteine Gq/G11 che producono un aumento dell'idrolisi dei fosfatidil-inositoli (proteine G attivatrici).

La terza famiglia comprende solo il recettore 5-HT₃, che è l'unico tra i recettori serotonergici ad essere associato ad un canale ionico.

I recettori 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆, e 5-HT₇ sono prevalentemente accoppiati a proteine G_s e sono responsabili dell'aumento della concentrazione intracellulare di AMPc.

Secondo l'ipotesi serotonergica l'insorgenza del DB potrebbe essere determinata da una alterazione del livello e dell'attività della serotonina nel sistema nervoso centrale.

Una elevata attività del sistema potrebbe essere correlata alla sintomatologia maniacale, mentre una ridotta attività alla disforia; in accordo con questa ipotesi si pensa che la depressione possa essere il risultato di un livello costantemente ridotto nella trasmissione serotonergica (Shastry BS. 2005). Un contributo significativo all'ipotesi serotonergica deriva dall'osservazione che alcuni farmaci ad attività antidepressiva di nuova generazione, quali gli inibitori selettivi della serotonina (SSRI), interferiscono con l'attività del trasportatore della serotonina (SERT), che promuove il reuptake del neurotrasmettitore dallo spazio sinaptico (Mahmood T. & Silvestone T. 2001). L'ipotesi attualmente più accreditata nel modello serotonergico, ipotizza che l'efficacia antidepressiva degli SSRI sia legata ad una serie di cambiamenti adattativi che si producono a livello neuronale nel lungo termine a seguito della cronica inibizione del reuptake del neurotrasmettitore. In particolare, sembra importante, oltre la *down regulation* dei recettori 5-HT₂, la desensitizzazione degli autorecettori somatodendritici 5-HT_{1A} che controllano, attraverso un'inibizione del neurone serotonergico, il rilascio di neurotrasmettitore

nelle aree bersaglio (corteccia, ippocampo, ecc). Questo porterebbe ad un conseguente aumento di serotonina extracellulare a livello terminale.

L'ipotesi che il deficit della funzione serotoninergica centrale predisponga a patologie affettive è stata confermata da numerose osservazioni tra le quali una ridotta concentrazione nel liquor di acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA), il principale metabolita della serotonina, nei pazienti bipolari, specialmente nei pazienti aggressivi e in quelli che hanno tentato il suicidio (Manji HG. & Lenox RH. 2000).

Studi condotti utilizzando la Tomografia ad Emissione di Fotone Singolo (SPECT) hanno dimostrato la presenza di un livello ridotto di diversi recettori della 5-HT in alcune aree cerebrali di pazienti affetti da depressione maggiore (Staley JK. et al., 1998). Inoltre, i dati riportati in uno studio di Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), dimostrano una riduzione della capacità del recettore 5-HT_{1A} di legare i suoi ligandi nel rafe e nell'ippocampo di pazienti affetti, evidenziando una ipofunzionalità a carico di alcuni elementi del sistema serotoninergico (Drevets WC. 1999).

2.3 SISTEMI DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE E DEI RITMI CIRCADIANI

La scoperta dell'efficacia del litio (Li) nel migliorare la sintomatologia del DB, riportata per la prima volta nel 1949 da Cade J. (Cade JF. 1949), ha dato inizio ad una fervida ricerca allo scopo di comprenderne i principi del meccanismo d'azione, consentendo di ipotizzare ed identificare nuovi sistemi coinvolti nell'insorgenza della malattia.

Tali sistemi comprendono elementi sia pre che post recettoriali di diversi sistemi di neurotrasmissione e coinvolgono i sistemi intracellulari di trasduzione del segnale. Alterazioni a carico di uno o più elementi del sistema possono determinare un malfunzionamento dell'intera cascata di reazioni ed una degenerazione dei processi biologici ad essa correlati.

Inoltre, in letteratura sono riportate numerose evidenze a favore di un coinvolgimento di modificazioni a carico del sistema dei ritmi circadiani nell'insorgenza del DB (Wehr T. et al., 1983; Bunney W. et al., 2000).

2.3.1 SISTEMA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Nell'ultimo decennio sono state fornite numerose evidenze a favore di un possibile coinvolgimento dei sistemi di trasduzione del segnale nella patogenesi del DB.

Come accennato in precedenza, gli studi volti alla comprensione del meccanismo d'azione del litio hanno consentito di ipotizzare ed identificare nuovi elementi la cui funzionalità alterata sembra essere coinvolta nel complesso sistema di mutamenti biologici alla base del disturbo.

In questo paragrafo ci dedicheremo in particolare ai meccanismi di trasduzione correlati ai recettori accoppiati alle proteine G.

Via del Fosfatidilinositolo e Proteine G

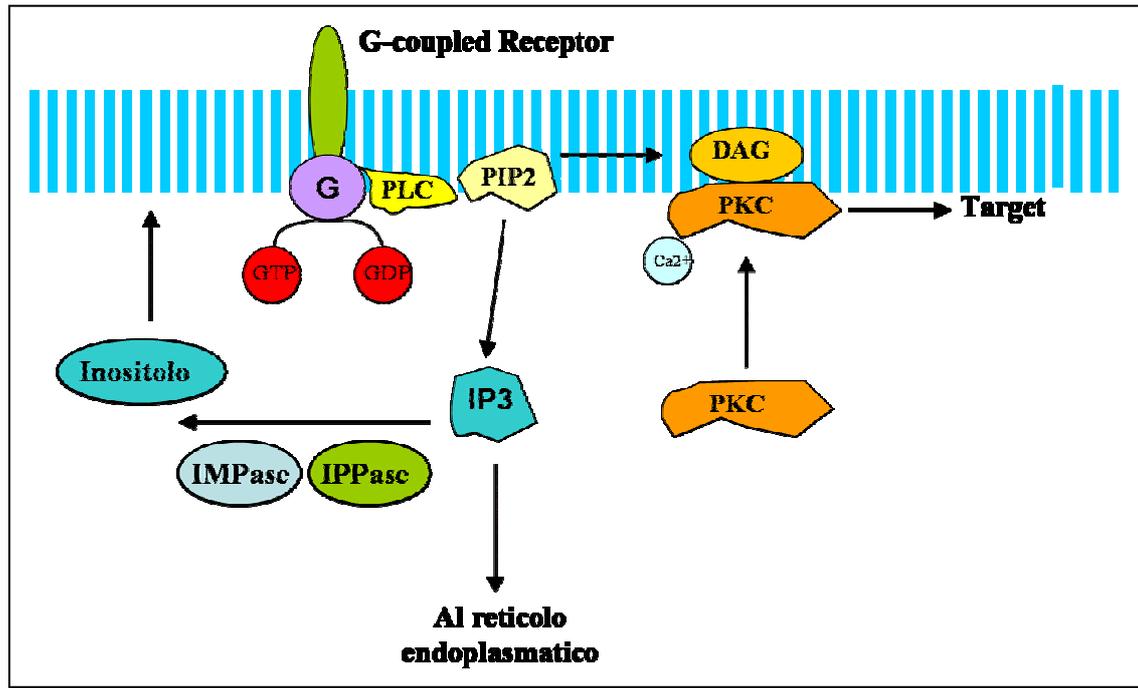
I fosfatidilinositoli sono componenti di membrana appartenenti al gruppo dei fosfolipidi e sono coinvolti nel meccanismo di risposta cellulare mediato da una serie di recettori tra cui i muscarinici M1, M3, M5, gli adrenergici α 1 e α 2, la famiglia di recettori serotonergici 5-HT2 e i recettori glutamatergici mGluR (Metabotropic Glutamate Receptor). L'attivazione di questi recettori regola l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana, mediata dalle proteine G.

Le proteine G sono GTPasi (Guanosina Trifosfato) trimeriche, costituite cioè da tre subunità proteiche: α , β e γ . Le subunità vengono divise generalmente in subunità α e complesso $\beta\gamma$, agendo quest'ultimo come un'unità. Esistono quattro classi di proteine G: Gs, che attivano la Adenilato Ciclasi (AC), quindi la sintesi di AMPc; Gi, che inibiscono la AC; Gq che attivano le fosfolipasi (PL); G12 e G13 ad attività sconosciuta.

L'attivazione di una proteina Gq induce l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP2) da parte della Fosfolipasi (PLC; PLD) con produzione di Diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3).

L'attivazione di una proteina G inibitoria determinerà invece la soppressione di questa via.

Figura 1. Sistema di trasduzione del segnale mediato da IP3 e DAG.



L'IP3 si lega ad un recettore specifico localizzato sul reticolo endoplasmatico dove stimola il rilascio di calcio nel comparto intracellulare, mentre il DAG attiva la Protein Chinasi C (PKC). L'IP3 è in parte riconvertito ad inositolo monofosfato per azione degli enzimi Inositolo Monofosfatasi (IMPase) e Inositolo Polifosfato Fosfatasi (IPPase). I segnali mediati da questa via sono coinvolti nella divisione cellulare, nella secrezione e eccitabilità neuronale e nella neurotrasmissione.

L'ipotesi di un coinvolgimento di questa via nell'eziopatogenesi del DB origina dall'evidenza che il litio inibisce gli enzimi IMPase e IPPase con conseguente riduzione della disponibilità e attività dell'inositolo nel lobo frontale del cervello di pazienti in terapia (Moore GJ. et al., 1999).

Per quanto riguarda le proteine G, diversi autori hanno riportato un aumento dei livelli della subunità G α nella corteccia frontale, temporale e occipitale in studi

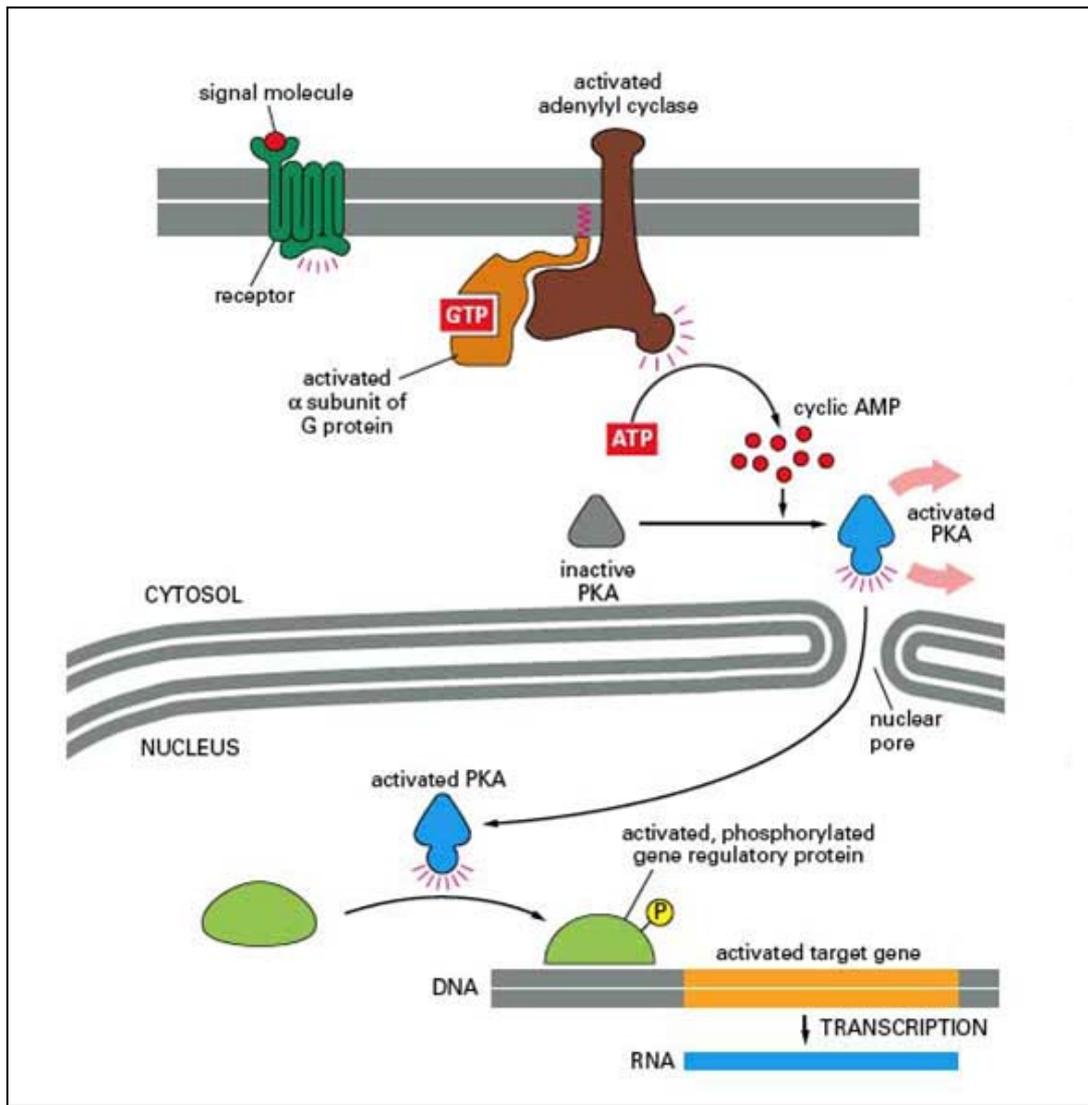
postmortem di pazienti bipolari (Young LT. et al., 1993, Warsh JJ. et al., 2000; Friedman E. & Wang HY. 1996). Gli stessi risultati sono stati ottenuti in studi condotti su diverse linee cellulari periferiche di pazienti affetti (Chen G. et al., 1999; Wang JF. et al., 1997; Warsh JJ. et al., 2000).

Via della Adenilcicali (AC)

In questa via di trasduzione del segnale il legame di un neurotrasmettitore o un ormone allo specifico recettore accoppiato alle proteine G determina l'attivazione o l'inibizione della AC, deputata alla conversione dell'ATP Adenosina Trifosfato (ATP) in AMPc.

Nel caso di un recettore accoppiato ad una proteina Gi/Go (adrenergici α_2 , dopaminergici D2, D3, D4, oppioidi μ , κ , δ , cannabinoidi CB1 e CB2, serotoninergici 5-HT1) la AC viene inibita e si ha una riduzione della sintesi di AMPc, mentre nel caso di un recettore accoppiato alle proteine Gs (adrenergici β_1 , β_2 , β_3 , dopaminergici D1, D5, serotoninergici 5HT 4, 5HT 6 e 5HT 7) la AC viene attivata e si ha un aumento della sintesi di AMPc.

Figura 2. Sistema di trasduzione del segnale mediato dall'AMPc.



L'AMPc attiva la Protein Chinasi A (PKA) fosforilandola; la PKA regola a sua volta diversi target tra cui canali ionici, elementi del citoscheletro, fattori di trascrizione e diversi enzimi. Uno dei target della PKA nel SNC è il *AMPc Response Element-Binding* (CREB), un fattore di trascrizione che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione di geni che codificano per elementi coinvolti nella plasticità neuronale.

Uno dei geni attivati dal CREB è il *BDNF* (Brain Derived Neurotrophic Factor), che codifica per l'omonima proteina implicata nella specializzazione e sopravvivenza neuronale, nella crescita e plasticità sinaptica. L'AMPC, così come il CREB, interviene su un numero elevato di target. Ad oggi, gli studi sulla relazione tra le funzioni recettoriali e post-recettoriali correlate all'AMPC e i disturbi dell'umore sono limitati a strategie di ricerca indirette (Wang H. et al., 1997).

L'ipotesi del coinvolgimento della via mediata dall'AMPC nel DB è supportata dall'evidenza che il litio svolge un'azione inibitoria sulla AC, determinando una riduzione della AMPC sintetizzato in risposta ad uno stimolo (Quiroz AJ. et al., 1999).

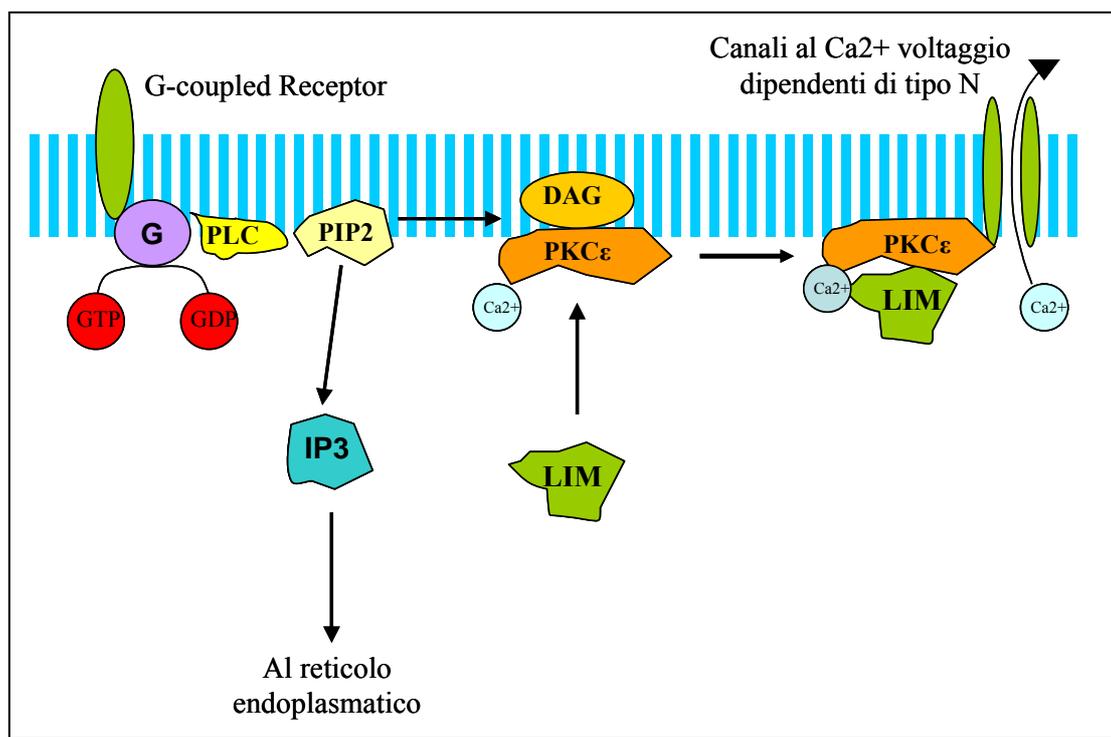
Protein Chinasi C (PKC)

La famiglia delle PKC è costituita da circa 12 isoforme localizzate a livello pre e postsinaptico e largamente espresse nel cervello. La PKC media i meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori muscarinici M1, M3 e M5, i recettori adrenergici $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e la famiglia di recettori serotonergici 5-HT2. L'attivazione della PKC tramite fosforilazione da parte del DAG dà inizio ad una cascata di risposte cellulari che sono coinvolte nella neurotrasmissione, nella divisione cellulare, nei trasporti di membrana e nella regolazione dell'espressione genica.

Ogni isoforma della PKC è caratterizzata da un proprio target ed è responsabile della mediazione di una risposta specifica. Recentemente, Maeno-Hikichi e colleghi (2003) hanno dimostrato che la modulazione dell'attività neuronale dei canali al Ca^{2+} avviene in modo specifico. Tale specificità è resa possibile dalla *adaptor protein* LIM (PDZ and LIM domain protein 5), una proteina che lega e trasporta selettivamente

l'isoforma PKC ϵ al suo target, i canali al calcio voltaggio dipendenti di tipo N (N-type Ca $^{2+}$).

Figura 3. *Interazione del LIM con la PKC*



Questi canali sono specificamente espressi negli assoni e sono concentrati nei *presynaptic buttons*, aree della membrana deputate alla fusione e riciclo delle vescicole sinaptiche che contengono i neurotrasmettitori.

La PKC ϵ è particolarmente espressa nell'ippocampo, nella corteccia, nel talamo e nell'ipotalamo.

Il MARCKS (Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate) è uno dei substrati della PKC. Questa proteina forma, nel citoplasma, un complesso con la calmodulina e lega i filamenti di actina alla membrana plasmatica. La calmodulina è una proteina

Ca²⁺ dipendente che traduce le variazioni di concentrazione del Ca²⁺ intracellulare in modificazioni chimiche e fisiologiche della cellula. Il MARCKS è implicato nella modulazione di processi che regolano la plasticità neuronale e la neurotrasmissione. Il MARCKS quindi traduce le risposte ad uno stimolo neurotrasmettitoriale in modifiche cellulari a lungo termine. E' stato dimostrato che l'attivazione della PKC da parte dei recettori muscarinici, determina una inibizione del MARKCS poiché ne consente la traslocazione dalla membrana al citosol, dove non può interagire con i suoi substrati (Watson DG. & Lenox RH; 1996).

Numerosi studi hanno riportato una alterata attività della PKC in pazienti affetti da DB. E' stato dimostrato che l'attività della PKC e la sua traslocazione dal citosol alla membrana risultano aumentate in soggetti bipolari (Wand HY. et al., 1993; Hahn C.G & Friedman E. 1999; Wang HY. & Friedman E. 2001).

Anche per quanto riguarda la PKC gli studi condotti allo scopo di identificare i meccanismi d'azione del litio hanno fornito suggerimenti ed informazioni fondamentali circa il suo possibile coinvolgimento nell'insorgenza del DB (Manji HK. & Lenox RH., 2000a).

Diversi studi condotti su ratti hanno dimostrato che il litio determina una riduzione dell'attività e della traslocazione dal citosol alla membrana della PKC nei neuroni ippocampali (Manji H.K. & Lenox RH. 1999; Manji HK. et al.,1993; Chen G. et al., 2000). Inoltre, il litio è responsabile della riduzione dell'espressione di due isoforme della PKC, la PKC α e la PKC ϵ , nei neuroni della corteccia prefrontale e dell'ippocampo di ratti trattati (Manji HK & Lenox RH. 2000b).

Una riduzione dell'attività e della traslocazione della PKC è stata riportata anche in uno studio condotto su piastrine di pazienti bipolari (Hahn CG. et al., 2005).

In uno studio recente, Zerate e colleghi (2007) hanno riportato l'efficacia del Tamoxifene, un inibitore diretto della PKC, nel migliorare i sintomi maniacali in pazienti bipolari. Queste evidenze supportano il ruolo chiave dell'aumentata attività della PKC nel DB.

Abbiamo precedentemente introdotto il ruolo fondamentale del Ca^{2+} nel modulare le risposte intracellulari. Gli ioni calcio sono responsabili della regolazione del rilascio dei neurotrasmettitori, dell'eccitabilità neuronale e di diversi eventi neuroplastici a lungo termine. Alcuni studi riportano un aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare sia basale che in risposta ad uno stimolo in piastrine, linfociti e neuroni di pazienti affetti da DB (Dubovsky S. et al., 1992; Li P. et al., 2000).

La regolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare è tuttavia estremamente complessa e le alterazioni riscontrate in pazienti bipolari potrebbero essere dovute a modificazioni che si verificano a vari livelli, sia a monte che a valle.

Glicogeno Sintasi Chinasi 3 (GSK3)

La GSK3 è una serina/treonina chinasi coinvolta in un elevato numero di meccanismi intracellulari tra cui plasticità neuronale, apoptosi, espressione genica e regolazione dei ritmi circadiani.

Sono state identificate due isoforme dell'enzima, la GSK3- α e la GSK3- β , che presentano un elevato grado di omologia nel dominio della chinasi ma che differiscono all'estremità N terminale, con differenze anche nella loro attività. Sono

noti circa 40 substrati attivati dalla GSK3 tramite fosforilazione. Affinché una molecola possa costituire un substrato per la GSK3, deve essere preventivamente fosforilata da un'altra chinasi.

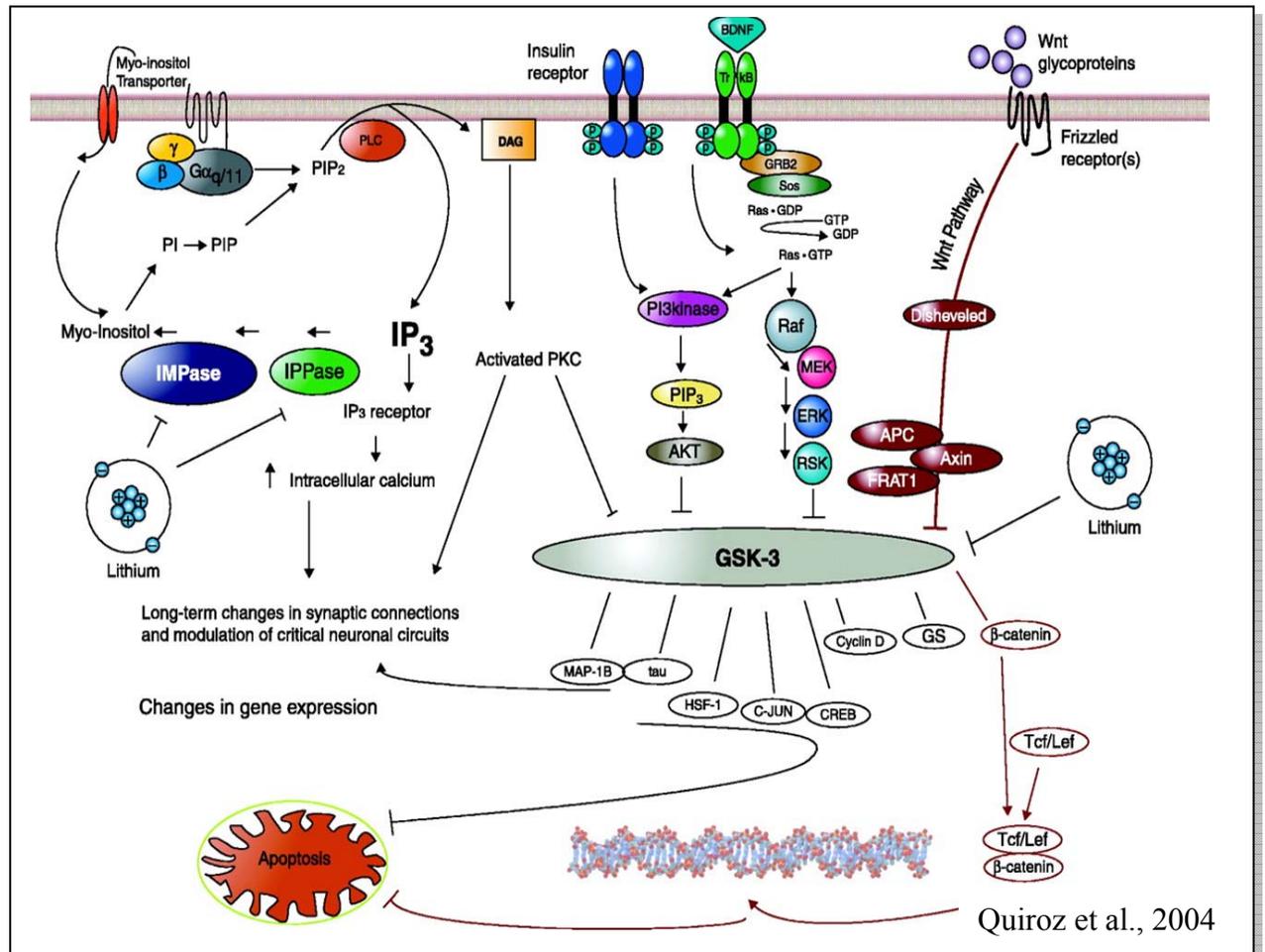
La GSK3 è a sua volta substrato di un elevato numero di messaggeri cellulari (tra cui PKC, PKA, elementi delle cascate di trasduzione della Wnt e delle neurotrofine) che ne modulano l'attività inibendola e di conseguenza modificano la catena di reazioni che avvengono a valle. L'attività della GSK3 viene regolata tramite la sua inibizione attraverso le seguenti vie: fosforilazione del residuo N-terminale di serina, modificazione della localizzazione a livello subcellulare e variazione dello stato di fosforilazione dei substrati.

L'ipotesi di un coinvolgimento della GSK3 nell'eziopatogenesi del DB si è sviluppata in seguito alle evidenze dell'azione inibitoria che il litio esercita su questo enzima. Recentemente è stato evidenziato che i recettori serotoninergici attivano una via di trasmissione che confluisce sulla GSK3.

Sembra, infatti, che la serotonina inibisca, tramite la cascata di secondi messaggeri, la GSK3 e che la ipofunzionalità serotoninergica (ipotesi serotoninergica della depressione) possa portare ad un aumentata attività della GSK3.

Tuttavia, considerato il numero elevato di fattori che agiscono sulla GSK3, non è stato finora chiarito attraverso quale via la serotonina interagisce con questa chinasi (Jope RS. & Roh MS. 2006).

Figura 4. Sistemi di trasduzione del segnale che confluiscono sulla GSK3 e suoi substrati.



2.3.2 SISTEMA DEI RITMI CIRCADIANI

Il sistema circadiano è responsabile della corretta organizzazione temporale di una serie di stati quali il ciclo di sonno/veglia, la temperatura corporea, i livelli ormonali, la cognizione, l'attenzione e l'umore. L'orologio molecolare è localizzato nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo e consiste di una catena di elementi di trascrizione inseriti in un sistema di feedback che si ripete ciclicamente nell'arco delle 24h (Reppert SM. & Weaver DR. 2001).

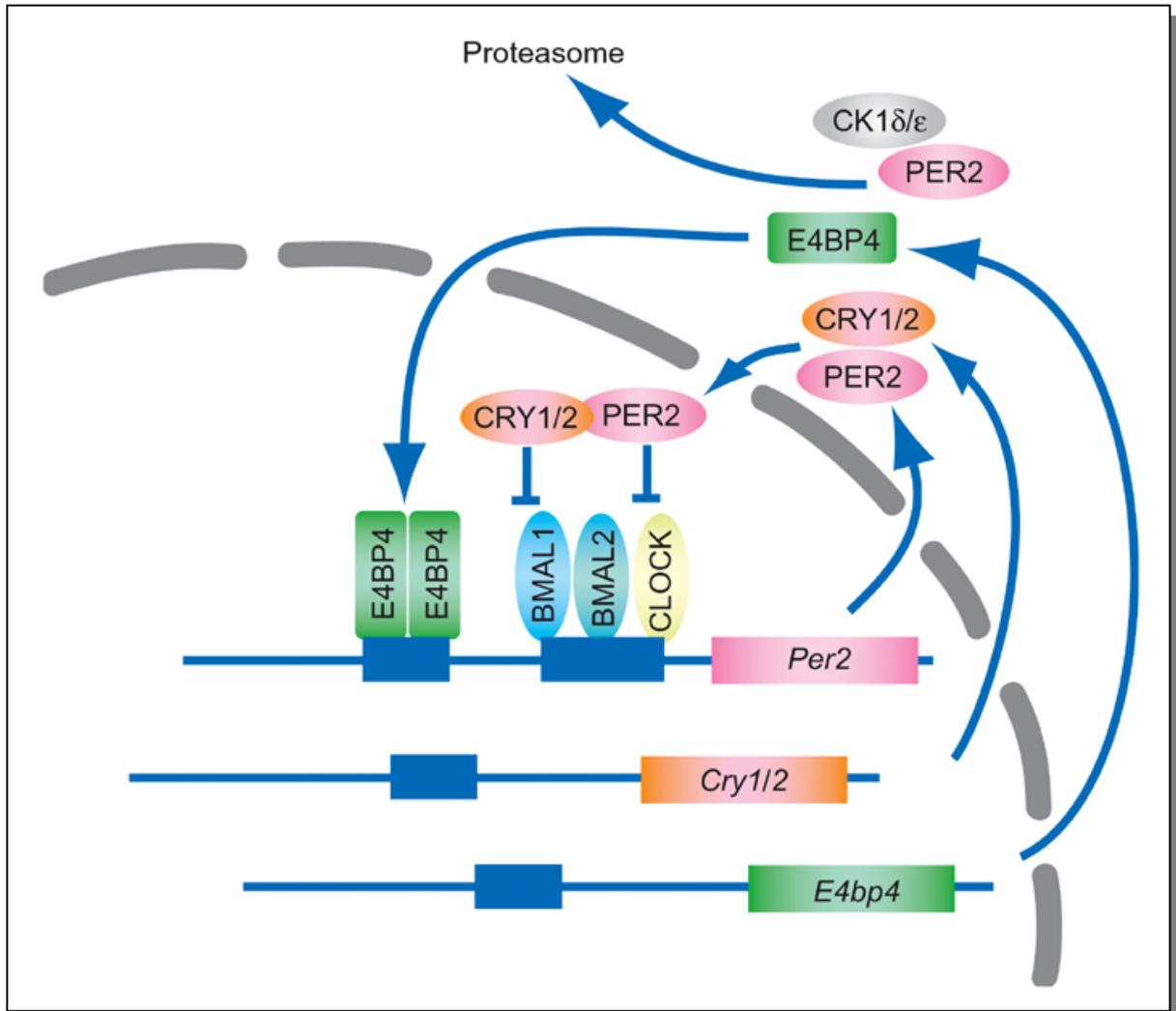
Il principale attivatore trascrizionale è rappresentato dal dimero costituito dalle proteine *Circadian Locomotor Output Kaput Protein* (CLOCK) e *Brain and Muscle ARNT-like Protein 1* (BMAL1). Questo complesso si lega alle sequenze *E-box* (GC-box coinvolte nella regolazione della trascrizione) del promotore di molti geni tra cui il *Per* e il *Cry*.

Le proteine PER e CRY vengono tradotte nel citoplasma e fosforilate dalla *Casein Kinase 1* (CK1) e dalla GSK3- β , con conseguente alterazione della loro stabilità e capacità di attraversare il nucleo (Harms E. et al., 2003; Kurabayashi N. et al., 2006).

Una volta entrate nel nucleo, queste proteine reprimono l'azione del dimero CLOCK/BMAL1, originando un feedback negativo. Inoltre, esiste un ciclo adiacente in cui il dimero CLOCK/BMAL1 attiva la trascrizione dei geni *Rev-erba* e *Rora* (Guillaumond F. et al., 2005).

Una volta tradotte, le omonime proteine si legano al promotore del gene *Bmall* e ne regolano la trascrizione. Il *Rev-erba* (recettore nucleare orfano) inibisce la trascrizione del *Bmall* durante la notte ed è responsabile di una espressione ritmica del gene.

Figura 5. Rappresentazione schematica degli elementi coinvolti nella regolazione dei ritmi circadiani



Il *Rev-erba* rappresenta dunque il legame tra i cicli positivi e quelli negativi dell'orologio circadiano. Recentemente, Yin e colleghi (2006) hanno dimostrato che la mancata degradazione di *Rev-erba* è sufficiente a prevenire l'insorgenza delle ciclicità della trascrizione e funzionalità dei geni del sistema circadiano.

E' ormai noto che nei pazienti affetti da DB si verificano alterazioni a carico dei ritmi circadiani. In essi, infatti, si riscontrano alterazioni della durata del sonno REM, dei livelli ormonali, della pressione sanguigna, delle pulsazioni, dei livelli plasmatici di

melatonina e cortisolo e del ritmo di variazione della temperatura durante le 24h. Tali valori ritornano normali dopo trattamento con antidepressivi o stabilizzanti dell'umore (Boivin DB. 2000; Bunney, W. E., & Bunney, B.G. 2000; Lenox RH. et al., 2002). Una delle evidenze del coinvolgimento dei ritmi circadiani nell'insorgenza dei disturbi dell'umore è data dal fatto che la depressione è più frequente in aree del pianeta con periodi di scarso soleggiamento prolungati nel tempo. Inoltre, il Disturbo Affettivo Stagionale (SAD), uno dei più comuni disturbi dell'umore che colpisce il 2-5% della popolazione mondiale, si presenta esclusivamente nei mesi invernali, quando la durata del soleggiamento è ridotta (Magnusson A. & Boivin D., 2003).

Sotto l'aspetto neurochimico, è stato dimostrato che la regolazione dei livelli, rilascio e sintesi di neurotrasmettitori coinvolti nell'insorgenza del DB quali serotonina, noradrenalina e dopamina, segue un ritmo circadiano (Weiner N. et al., 1992; Barassin S. et al., 2002; Castaneda TR. et al., 2004; Malek ZS. et al., 2005). Anche la regolazione dell'attività dei recettori di questi neurotrasmettitori segue un ritmo circadiano, ma il modo attraverso il quale questi sistemi vengono regolati in maniera ciclica non è tuttora noto.

Una ulteriore evidenza a favore del coinvolgimento degli elementi che costituiscono il sistema circadiano nel DB è fornita dal meccanismo d'azione del litio. Il litio, infatti, è un inibitore diretto della GSK3, che svolge una funzione di attivazione del *Rev-erba* con conseguente interruzione della ciclicità del sistema di feedback (Yin L. et al., 2006). L'inibizione della GSK3 consente la degradazione del *Rev-erba* e dunque l'espressione del gene *Bmall*.

3. GENETICA DEL DISTURBO BIPOLARE

Il DB è una malattia complessa in cui più fattori genetici, situati in loci indipendenti, agiscono in maniera additiva contribuendo alla suscettibilità alla malattia, e la loro espressione fenotipica è modulata da fattori ambientali. Studi condotti su famiglie, gemelli e adottivi forniscono evidenze consistenti di un forte contributo genetico nella predisposizione al DB. E' stato calcolato che il rischio di insorgenza della malattia durante la vita è strettamente correlato alla percentuale di condivisione del materiale genetico tra un soggetto affetto ed uno non affetto. Il gemello omozigote di un soggetto affetto ha un rischio di insorgenza del 40-70%, mentre un parente di I grado ha un rischio del 5-10% ed un soggetto non imparentato dello 0.5-1.5% (Craddock N. & Jones I., 1999). Un passo importante nell'individuazione e nella localizzazione di una componente genetica che contribuisca alla suscettibilità per una patologia, è la dimostrazione della presenza di linkage o di associazione tra la patologia e un marker genetico. Un marker genetico è un segmento ereditabile di DNA che corrisponde ad un locus genetico ben definito ed è polimorfico, ossia è presente nella popolazione generale in diverse forme (alleli), con una frequenza $\geq 1\%$. Gli studi di linkage valutano la cosegregazione del marker e della malattia all'interno di famiglie e danno un'indicazione sull'eventuale associazione fisica tra il locus marker e il locus malattia.

Il DB non sembra essere associato ad aberrazioni cromosomiche, anche se alcuni autori riportano che i soggetti con la trisomia 21 sono meno suscettibili alla mania rispetto a soggetti della popolazione generale (Craddock N. & Owen M., 1994). Questo dato è conforme a quanto riportato da alcuni studi di linkage in cui è stata

riportata la presenza di geni di suscettibilità per il DB sul cromosoma 21 (Straub RE. et al., 1994; Detera-Wadleigh SD. et al., 1996; Detera-Wadleigh SD. et al., 1997; Smyth C. et al., 1997).

Un numero consistente di studi ha riportato la presenza di linkage tra il DB e diverse aree cromosomiche: 2p, 4p, 4q, 6q, 8q, 10q, 11p, 12q, 13q, 14q, 16p, 16q, 18p, 18q, 21q, 22q e Xq (Kato T. et al., 2005; Hayden EP. et al., 2006). Recentemente, diversi studi di genome-wide scan hanno identificato altri loci di suscettibilità o confermato dati precedentemente riportati per le regioni cromosomiche 1p, 8q24, 4q32, 2p12 e 13q12 (McInnis MG. et al., 2003 ; Curtis D. et al., 2003).

Tabella 1. *Alcune regioni cromosomiche in Linkage con il DB*

Cromosoma	Regioni Cromosomica	Referenze
1	1q31-32	Detera-Wadleigh et al., 1999
	1q42	Millar et al., 2004
2	2p13-16	Liu et al., 2003
4	4p16-p14	Blackwood et al., 1996 Detera-Wadleigh et al., 1999
	4q35	Adams et al., 1998 Badenhop et al., 2003
5	5q32	Ohtsuki et al., 2002
6	6p	Ginns et al., 1996
	6q	Dick et al., 2003
7	7q34	Liu et al., 2003 Detera-Wadleigh et al., 1997; 1999
	8	8q24.21
Dick et al., 2003		
McInnis et al., 2003a		
9	9q34.3	Segurado et al., 2003
10	10p12	McInnis et al., 2003b Foroud et al., 2000
	10q24	Cichon et al., 2001 Liu et al., 2003
	10q11.21-q22.1	Segurado et al., 2003
11	11p13-15	Sklar et al., 2002
	11q22.2-22.3	Massat et al., 2002
12	12q24	Morisette et al., 1999
13	13q32	Liu et al., 1999 Badner & Gershon. 2002
	13q31	Potash et al., 2003
	13q14.11	Baum AE. et al., 2007
16	16p13.3	Itokawa et al., 2003
17	17q11	Dick et al., 2003
		Collier et al., 1996
18	18q22-23	Berrettini et al., 1994 Detera-Wadleigh et al., 1999 Garner et al., 2001
	18p11-q12.3	Segurado et al., 2003
21	21q22	Straub et al., 1994
22	22q12	Badner & Gershon. 2002 Potash et al., 2003
X	Xp22.1	McInnis et al., 1999
	Xp24-q27.1	Pekkarinen et al., 1995
	Xp11.3	Zandi et al., 2003
	Xq28	Bocchetta et al., 1999

Gli studi di linkage e genome scan vengono solitamente condotti su un numero di marcatori limitato allo scopo di fornire una informazione relativa a grandi aree del genoma o all'intero genoma. Il *fine mapping*, utilizzando una mappa di marcatori più densa, consente invece di analizzare in modo più definito le regioni cromosomiche in linkage con la malattia e di identificare in modo più circoscritto le regioni che vengono definite “punti caldi”, zone cioè che mostrano un linkage più stretto con il disturbo. Tali studi hanno fornito maggiori informazioni su diverse aree cromosomiche in linkage con il DB e confermato i dati riportati dalla letteratura precedente per loci quali il 3q29, 5q31-33 e 18q22-23 (Schosser A. et al., 2004; Hong KS. Et al., 2004). Una volta identificati i “punti caldi” è necessario stabilire se e quali geni possono essere localizzati all'interno o nelle vicinanze di tali aree.

Gli studi di associazione con geni candidati rappresentano solitamente una tappa successiva e i geni vengono selezionati in funzione sia dei risultati degli studi di linkage sia considerando la funzione biologica degli elementi per cui codificano.

Uno studio di associazione valuta la presenza di Linkage Disequilibrium (LD) tra un marcatore genetico, localizzato in un gene candidato, e la malattia in campioni di soggetti non imparentati (caso-controllo) o in campioni di famiglie costituite solitamente da un probando ed i suoi genitori (triadi). Due marker, siano essi entrambi genetici o un marker genetico ed il marker malattia, si dicono in LD quando si presentano insieme in uno stesso individuo più frequentemente di quanto ci si attenderebbe per caso. La presenza di LD indica dunque una cosegregazione dei due marker e, nel caso di un marker genetico e del marker malattia, questo indica la

presenza di associazione del polimorfismo studiato con un aumentato rischio di insorgenza della malattia.

Un numero notevole di studi ha valutato l'associazione tra marcatori localizzati nella sequenza di geni candidati ed il DB riportando spesso risultati contrastanti.

Tabella 2: *Geni candidati che sono stati recentemente riportati associati con il disturbo bipolare*

Gene	Regione cromosomica	Funzioni/note	Referenze
PERIOD3	1p36.23	Ritmi circadiani	Nievergelt CM. et al., 2005
RGS4	1q23.3	Regolatore delle proteine G	Cordiero Q. et al., 2005 Falin MD. et al., 2005
DISC1	1q42.1	Migrazione Neuronale	Thomson PA. et al., 2005a
PDLIM5	4q22	Adaptor Protein (PKC/canali Ca ²⁺)	Kato T. et al., 2005
DRD1	5q35.1	Recettore dopaminergico D1	Severino G. et al., 2005 Dimitrzak-Weglarz M. et al., 2006
GRM4	6p21.3	recettore glutamatergico metabotropico 4	Falin MD. et al., 2005
GRM3	7q21.1-q21.2	recettore glutamatergico metabotropico 3	Falin MD. et al., 2005
NRG1	8p21-p12	Neuregulina 1	Green EK. et al., 2005
ARNTL (Bmal1)	11p15	Ritmi circadiani	Nievergelt CM. et al., 2005 Mansour HA. et al., 2006
HTR3B	11q23.1	Recettore Serotoninergico 3B	Frank B. et al., 2004
hSERT	17q11.1-12	Trasportatore della Serotonina	Faraone SV., 2005
TIMELESS	12q12-q13	Ritmi circadiani	Mansour HA. et al., 2006
Citron	12q24	Protein Chinasi 21 (Serina/Treonina)	Lyons-Warren A et al., 2005
PIK3C3	18q12.3	Fosfatidilinositolo Chinasi 3C3	Stopkova P. et al., 2004
DGKH	13q14.11	Diaciglicerolo Chinasi ε	Baum AE. et al., 2007
GPR50	Xq28	Recettore 50 accoppiato alle proteine G	Thomson PA. et al., 2005b

La maggior parte degli studi si è finora dedicata all'analisi dei geni codificanti per elementi del sistema serotonergico e dopaminergico.

Per quanto riguarda il sistema dopaminergico, tutti i recettori finora noti sono stati oggetto di studi di associazione con il DB, ma con risultati spesso discordanti. Il gene che codifica per il recettore D3, localizzato sul cromosoma 3q13.3, è di particolare interesse poiché è quasi esclusivamente espresso nelle aree limbiche, regioni che sono coinvolte nel controllo delle emozioni. Seppure alcuni autori abbiano riportato associazione positiva per questo gene, una recente metanalisi non conferma questo dato (Elvidge G. et al., 2001). Inoltre, diversi autori hanno evidenziato associazione per i geni codificanti per i recettori DRD1, DRD2, DRD4, e per il trasportatore della dopamina DAT (Muglia P. et al., 2002; Massat I. et al., 2002; Greenwood T.A. et al., 2001; Severino G. et al., 2005). Tuttavia, studi successivi non hanno replicato il risultato (review in Kato et al., 2007).

Il gene che codifica per l'enzima Tirosina Idrossilasi (TH) è stato studiato da diversi autori e, mentre nel lavoro di Leboyer e colleghi (1990) è stata riportata una associazione con il DB, una metanalisi successiva non ha confermato il risultato (Turecki G. et al., 1997).

Anche la COMT è stata analizzata in diversi studi e una recente metanalisi ha riportato associazione significativa con il DB (Craddock N. et al., 2001).

Infine, due recenti metanalisi hanno confermato l'associazione tra un microsatellite localizzato nella sequenza del gene che codifica per la MAO ed il DB (Furlong R.A. et al., 1999; Preisig M. et al., 2000).

Per quanto riguarda il sistema serotoninergico, il gene codificante per il trasportatore della serotonina (*hSERT*), localizzato sul cromosoma 17q11.1-12, è stato oggetto di numerosi studi di associazione. I polimorfismi che sono stati maggiormente valutati per una associazione con il DB sono il 5-HTTVNTR, una VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) localizzata nell'introne 2, e il 5-HTTLPR, una inserzione/delezione di 44bp localizzata nella regione del promotore. Seppure i risultati su differenti popolazioni siano talvolta discordi, un numero consistente di lavori riporta associazione con il DB per entrambi i polimorfismi (Furlong RA. et al., 1998; Craddock N. et al., 2001 ; Anguelova M. et al., 2003; Lasky-Su JA. et al., 2005; Cho HJ. et al., 2005).

La maggior parte degli studi sui recettori serotoninergici ha analizzato il polimorfismo T102C del gene per il recettore 5-HT_{2A}, localizzato sul cromosoma 13q14-21. Nonostante alcuni autori abbiano evidenziato una associazione per questo polimorfismo, tale risultato non è stato confermato dai dati riportati in due recenti metanalisi (Craddock N. et al., 2001; Anguelova M. et al., 2003).

Nell'esone 2 del gene codificante per il recettore serotoninergico 5-HT_{2C} è presente una mutazione funzionale a singola base (G/C) responsabile della sostituzione al codone 23 di un residuo di Serina con uno di Cisteina. Recentemente, è stato dimostrato che la variante Ser23 è responsabile di una maggiore attività del recettore rispetto alla variante Cys23 (Okada M. et al., 2004). Nel lavoro di Gutierrez e colleghi (1996), è stata riportata associazione tra il l'allele Ser23 e il DB ma soltanto nelle femmine affette.

I geni codificanti per elementi della cascata dei secondi messaggeri non sono stati ampiamente analizzati in studi di associazione con il DB. Recentemente, in uno studio di genome-wide scan, condotto su due campioni caso-controllo indipendenti di origine europea, è stata riportata associazione per il gene Diacylglycerol Kinase ϵ (DGKH), che codifica per l'omonimo enzima deputato alla metabolizzazione del DAG (Baum AE. et al., 2007).

Come descritto in precedenza, il LIM è una proteina chiave nel modulare l'interazione della PKC ϵ con i suoi substrati. Il gene codificante per il LIM (*PDLIM5*) è localizzato nella regione 4q22. Recentemente, Iwamoto e colleghi (2004a) hanno riportato una maggiore espressione del gene nella corteccia prefrontale di soggetti affetti da DB. In uno studio successivo, il *PDLIM5* è risultato espresso in quantità significativamente minore nei linfoblasti dei pazienti affetti rispetto ai controlli (Iwamoto et al., 2004b). Lo stesso gruppo ha inoltre riportato associazione tra due SNP (Single Nucleotide Polymorphism), localizzati nella regione 5' del gene, e il DB (Kato et al., 2005).

L'associazione tra i *clock genes* del sistema circadiano ed il DB è stata valutata in diversi studi. Uno SNP localizzato nella regione in 3' del gene *Clock* è risultato associato al DB (Benedetti et al., 2003). Lo stesso SNP è stato riportato essere associato ad una maggiore insonnia e ad una ridotta necessità di sonno in pazienti bipolari (Serretti et al., 2003). Infine, in due recenti studi, gli aplotipi costituiti da alcuni SNP dei geni *Bmal1* e *Per3* sono stati associati con il DB (Nievergelt et al., 2003; Mansour et al., 2003).

4. SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio si propone di valutare l'associazione tra alcuni geni candidati e il DB in un campione sardo costituito da 299 pazienti affetti e 300 controlli sani.

A tale scopo sono stati selezionati diversi polimorfismi nella sequenza dei geni codificanti per elementi dei sistemi serotoninergico, dopaminergico, di trasduzione del segnale e dei ritmi circadiani. Inoltre, per quanto riguarda il gene codificante per la proteina LIM, abbiamo condotto uno studio di espressione in un sottocampione costituito da 30 pazienti affetti da DB e 15 controlli.

5. MATERIALI E METODI

5.1 CAMPIONE

Il campione è costituito da 299 pazienti affetti da DB e 300 controlli volontari sani, sardi da almeno quattro generazioni (Tabella 3). I pazienti sono stati reclutati presso il Centro di Psicofarmacologia Clinica, sezione di Farmacologia Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Cagliari e presso i Centri di Salute Mentale dislocati in varie aree della Sardegna. La diagnosi è stata fatta in accordo con i *Research Diagnostic Criteria* (RDC). Le notizie cliniche sono state ottenute attraverso l'intervista diretta del paziente e standardizzate seguendo la *Schedule for Affective Disorder and Schizophrenia-Lifetime Version* (SADS-L) (Endicott J. & Spitzer RL., 1978). Le notizie cliniche sono state completate, la dove possibile, attraverso la consultazione delle cartelle cliniche e dei ricoveri. L'età d'insorgenza è stata valutata come l'età alla quale si è verificato un episodio diagnosticato di tipo maniacale, ipomaniacale, depressivo o psicotico secondo i criteri dell'RDC.

Sulla base dei dati clinici a disposizione le diagnosi dei pazienti sono state validate in cieco da un esperto clinico in accordo con l'RDC. Tutti i pazienti che avevano discendenti non sardi all'interno delle quattro generazioni sono stati a priori esclusi dallo studio. Tutti i controlli sono di origine sarda e non assumevano terapia farmacologica per disturbi psichiatrici.

A tutti i soggetti partecipanti è stato chiesto di firmare il consenso informato e sono stati prelevati 10 ml di sangue da una vena dell'avambraccio per l'estrazione del

DNA e per l'allestimento delle Linee Cellulari Linfoblastoidi. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

5.2 GENI E MARKER SELEZIONATI

Gene	Locus	dbSNP	Mutazione	Posizione	Polimorfismo
DRD1	5q35.1	-	T/C	-800bp	RFLP/HaeIII
		-	A/G	-48bp	RFLP/DdeI
		-	T/C	1403bp	RFLP/Bps
DRD2	11q22-q23	-	C/T	esone 6	RFLP/NcoI
		-	T/C	3'-UTR	RFLP/Taq1A
DRD3	3q13.3	-	A/G	esone 1	RFLP/BalI
DRD4	11p15.5	-	48bp	esone 3	VNTR
DAT	5p15.3	-	40bp	3'-UTR	VNTR
HTR2A	13q14-q21	-	T/C	esone 2	RFLP/MspI
HTR2C	Xq24	-	C/G	68bp	RFLP/NlaIII
hSERT	17q11.2	-	44bp	promotore	ins/del
PDLIM5	4q22	rs10008257	A/G	promotore	SNP
		rs2433320	A/G	promotore	SNP
		rs2433322	A/G	introne 2	SNP
NR1D1	17q21.1	rs12941497	A/G	introne 1	SNP
		rs939347	A/G	5'-UTR	SNP

dbSNP = codice dello SNP reperibile in "The Single Nucleotide Polymorphism database"
www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/

DRD1

Sono stati genotipizzati tre polimorfismi a singola base (SNP): lo SNP -800T/C, localizzato 800 *base pair* (bp) a monte del codone di start, lo SNP -48A/G localizzato a 48bp a monte del codone di start e lo SNP 1403T/C, situato a 1403bp a valle del codone di start. Tutte le mutazioni sono silenti, non determinano cioè una sostituzione amminoacidica nella proteina.

DRD2

Sono stati analizzati due SNP: il polimorfismo C/T (NcoI), localizzato nell'esone 6, e il polimorfismo T/C (TaqIA) localizzato in 3'-UTR, 10 Kb a valle del DRD2. Entrambe le mutazioni sono silenti e danno origine ad un sito di taglio per uno specifico enzima di restrizione.

DRD3

La mutazione a singola base (A/G) nell'esone 1 è responsabile di una sostituzione di un residuo di Serina con uno di Glicina nella parte extracellulare N-terminale del recettore. E' stato dimostrato che l'omozigosi Gly/Gly è responsabile di una maggiore affinità dei ligandi specifici per il recettore DRD3 (Lundstrom K. et al., 1996). Tale sostituzione genera un sito di taglio per l'enzima di restrizione *MscI*.

DRD4

Il polimorfismo analizzato è una VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) di 48bp, localizzata nell'esone 3.

DAT

Il polimorfismo analizzato è una VNTR di 40bp, con un numero di copie che va da 3 a 11, localizzata in 3'-UTR.

hSERT

Il polimorfismo 5-HTTLPR è un'inserzione/delezione di 44bp localizzata nella regione del promotore. La variante lunga (inserzione) è associata ad un'espressione del gene maggiore di 3 volte rispetto alla variante corta (delezione) (Heils A. et al., 1996).

HTR2C

Il polimorfismo è una mutazione funzionale a singola base (G/C) responsabile della sostituzione al codone 23 di un residuo di Serina con uno di Cisteina. Tale sostituzione genera un sito di taglio per l'enzima di restrizione *NlaIII*.

HTR2A

Il polimorfismo T102C è una mutazione silente a singola base, localizzata nell'esone 2. Tale sostituzione genera un sito di taglio per l'enzima di restrizione *MspI*.

PDLIM5

Gli SNP rs10008257 (SNP1) e rs2433320 (SNP2) sono localizzati nella regione del promotore mentre lo SNP rs2433322 (SNP 3) è localizzato nel secondo introne. Le mutazioni sono tutte silenti.

NR1D1

Lo SNP rs12941497 (SNP1) è localizzato nell'introne 1 mentre lo SNP rs939347 (SNP2) è localizzato in 5'-UTR. Entrambe le mutazioni sono silenti.

5.3 GENOTIPIZZAZIONE E GENE EXPRESSION

Il DNA genomico è stato estratto sia da sangue venoso che da Linee Cellulari Linfoblastoidi (LCL) mediante precipitazione salina (Miller SA. et al., 1988). I frammenti di DNA contenenti i polimorfismi sono stati amplificati mediante "polymerase chain reaction" (PCR).

DRD1

La miscela di reazione (25µl) conteneva: 150ng di DNA, 20pmol di ciascun primer (-800 T/C: 5'-CTC TCG AAA GGA AGC CAA GA-3' e 5'-CGG CTC CGA AAC GTT GAG-3' [Cichon S. et al., 1996]; -48 T/C: 5'-ACT GAC CCC TAT TCC CTG CT-3' e 5'-AGC ACA GAC CAG CGT GTT C-3'; 1403 T/C: 5'-TGG AGA AGC TGT CCC CAG-3' e 5'-GTA CCT TAG TTT CTT AAT AGC GA-3' [Cichon S. et al., 1994]), 200 µM dNTP, buffer Cetus 1 X, 2.5 U AmpliTaq DNA polimerasi, 5% di DMSO. Dopo un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, sono stati eseguiti 30 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 94°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 30 sec. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 10 min. Per la PCR sono stati utilizzati i termociclatori BMJ PT100 e GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). I prodotti dell'amplificazione sono stati

digeriti tramite gli enzimi di restrizione Hae III, per il -800 T/C, Dde I per il -48 A/G e Bsp1286 I per il 1403 T/C. I prodotti della digestione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro. Le bande di DNA distinguibili dopo corsa su gel erano le seguenti: -800T/C: allele T = 169bp + 112bp, allele A = 143bp + 112bp + 26bp; -48A/G: allele A = 146bp + 61bp, allele G = 146bp + 42bp + 19bp; 1403T/C: allele T = 189bp, allele C = 167bp + 22bp.

DRD2

La miscela di reazione (50µl) conteneva: 150ng di DNA, 50pmol di ciascun primer (NcoI: 5'-ATC CTG CAG CCA TGG-3' e 5'-ATT GTC CGG CTT TAC C3' [Sarkar G. et al., 1991] TaqIA: 5'-CCG TCG ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA-3' e 5'-CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA-3' [Grandy DK. et al., 1993]), 200 µM dNTP, 1 X PCR buffer, 2 U AmpliTaq DNA polimerasi, s mM MgCl₂. La miscela per il polimorfismo NcoI conteneva 2.5% di formamide. I campioni sono stati amplificati utilizzando un DNA Thermal Cycler Stratagene. Dopo un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, sono stati eseguiti i seguenti cicli: NcoI: 40 cicli di amplificazione: 1 min a 94°C, 2 min a 54°C. TaqIA: 35 cicli di amplificazione: 1 min a 94°C, 1 min a 53°C: 1.5 min a 72°C. Entrambe le PCR sono state concluse con un ciclo di estensione finale a 72°C per 5 min. I prodotti dell'amplificazione sono stati digeriti tramite i seguenti enzimi di restrizione: NcoI per il polimorfismo C/T e TaqIA per il polimorfismo T/C.

I prodotti della digestione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro. Le bande di DNA distinguibili dopo corsa su gel erano le seguenti: NcoI: allele 1 = 446bp, allele 2 = 254bp + 194bp; TaqIA: allele 1 = 310bp; allele 2 = 130bp + 180bp.

DRD3

La miscela di reazione (volume finale 50 µl) conteneva 150 ng di DNA genomico, 25 pmol di ciascun primer (5'-GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA-3', 5'-AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA-3' [Lannfelt L., et al 1992]), 0.1mM dNTP, 1 X PCR buffer, 2 U AmpliTaq. Dopo un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 5 min, sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 95 °C per 1 min, 56°C per 1 min e 72°C per 1 min. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 8 min. Il prodotto della reazione, un frammento di 462 bp, è stato digerito con l'enzima di restrizione *MscI*. Gli alleli 1 (304 bp) e 2 (206 e 98 bp) sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro.

DRD4

La miscela di reazione (volume finale 50 µl) conteneva 150 ng di DNA genomico, 25pm di ciascun primer (5'-GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG-3' e 5'-AGG ACC CTC ATG GCC TTG-3'), 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dTTP , 0.1 mM dGTP, 0.1 mM 7-deaza-dGTP, 1 X PCR buffer Cetus, 3 U di AmpliTaq polimerasi e 10% DMSO. La PCR è stata eseguita secondo il metodo Hot Start (Lichter JB et al.,

1993). Questo metodo prevede una denaturazione a 99°C per 2 min della miscela contenente il DNA e l'acqua. Dopo questo ciclo è stata aggiunta la miscela contenente il resto dei reagenti e si è proceduto con una ulteriore denaturazione a 95°C per 5 min. Sono stati successivamente effettuati 40 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 95 °C per 1 min, 54°C per 1 min e 72°C per 2 min. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 min. Gli alleli sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro. L'allele 2 corrisponde ad un frammento di 323bp mentre l'allele 7 ad un frammento di 563bp.

DAT

La miscela di reazione (volume finale 50 µl) conteneva 150 ng di DNA genomico, 20pm di ciascun primer (5'-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AG-3' 5'-CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG-3'[Vandenberg DJ. et al., 1992]), 0,2 mM dNTP, 1 X PCR buffer Cetus e 2,5 U di AmpliTaq polimerasi. Sono stati eseguiti 30 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 94 °C per 1 min, 58°C per 1 min e 72°C per 1 min. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 min. Gli alleli sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro. Nel nostro campione sono stati identificati l'allele 11 (520bp), l'allele 10 (480bp) e l'allele 9 (440bp).

HTR2C

La miscela di reazione (volume finale 25 µl) conteneva 150 ng di DNA genomico, 25 pmol di ciascun primer (5'-GGC CTA TTG GTT TGG CCA-3' e 5'-GTC TGG GAA TTT GAA GCG TCC AC-3' [Burnet PW. et al., 1997]), 0,2 mM dNTP, 1 X PCR buffer, 3 mM MgCl₂ e 2 U di Taq polimerasi. Sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione con le seguenti temperature : 94 °C per 1 min, 57°C per 1 min e 72°C per 1 min. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 min. Il prodotto della reazione, un frammento di 104bp, è stato digerito con l'enzima di restrizione *Nla*III. Gli alleli Ser (104bp) e Cys (86bp e 16bp) sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 4% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro.

HTR2A

La miscela di reazione (volume finale 25 µl) conteneva 150 ng di DNA genomico, 20 pmol di ciascun primer (5'-TCT GCT ACA AGT TCT GGC TT-3' 5'-CTG CAG CTT TTT CTC TAG GGG-3' [Warren JT. et al., 1993]), 0,2 mM dNTP, 1 X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂ e 1,5 U di Taq polimerasi. Dopo un ciclo iniziale di denaturazione a 94°C per 3 min, sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 94 °C per 1 min, 58°C per 1 min e 72°C per 1 min. E' stato inoltre eseguito un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 min. Il prodotto della reazione, un frammento di 342 bp, è stato digerito con l'enzima di restrizione *Msp*I. Gli alleli C102 (342 bp) e T102 (216 e 126 bp) sono stati separati mediante

elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro e identificati con il densitometro.

hSERT

La miscela di reazione (30 µl) conteneva 100 ng di DNA, 0.2 mM dATP, dCTP, dTTP, 0.1 mM dGTP e 7-deazaGTP, 25 pmol di ciascun primer (5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT C-3' e 5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC [Collier DA. et al., 1996]), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 10% DMSO and 1.5 U AmpliTaq (Perkin Elmer). Sono stati eseguiti 30 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 30 sec a 95°C, 30 sec a 61°C e 60 sec a 72°C. I prodotti dell'amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro e gli alleli l (528 bp) e s (484 bp) sono stati identificati con il densitometro.

PDLIM5 e NR1D1

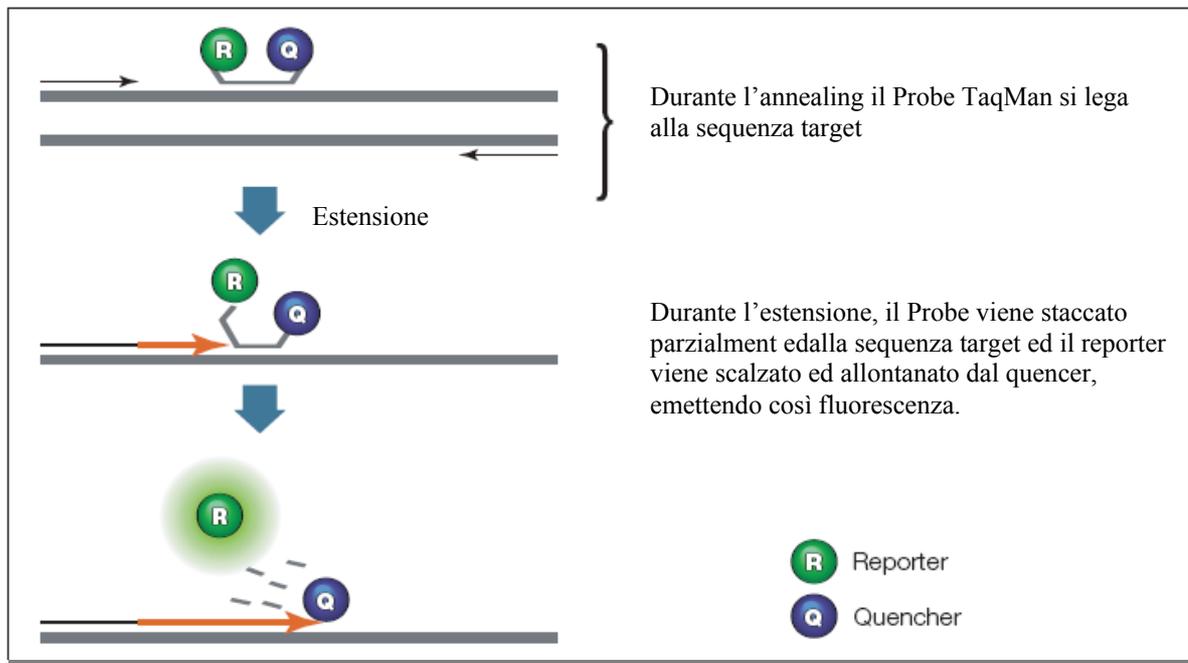
Gli SNP nei geni *PDLIM5* e *NR1D1* sono stati analizzati tramite il metodo TaqMan® (Figura 1). Questa tecnica utilizza due probe a sequenza specifica per i due filamenti della regione contenente il polimorfismo.

I due probe contengono un differente fluoroforo (VIC E FAM), la cui attività è bloccata da un quencher posizionato all'estremità del probe. Durante la PCR, i probe ibridizzano a valle dei primer.

L'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi taglia il probe, rilasciandolo nella soluzione, in questo modo il quencher è separato dal probe. Ciò permette al probe

sollecitato da un raggio di luce laser, di emettere la fluorescenza che distingue i due alleli.

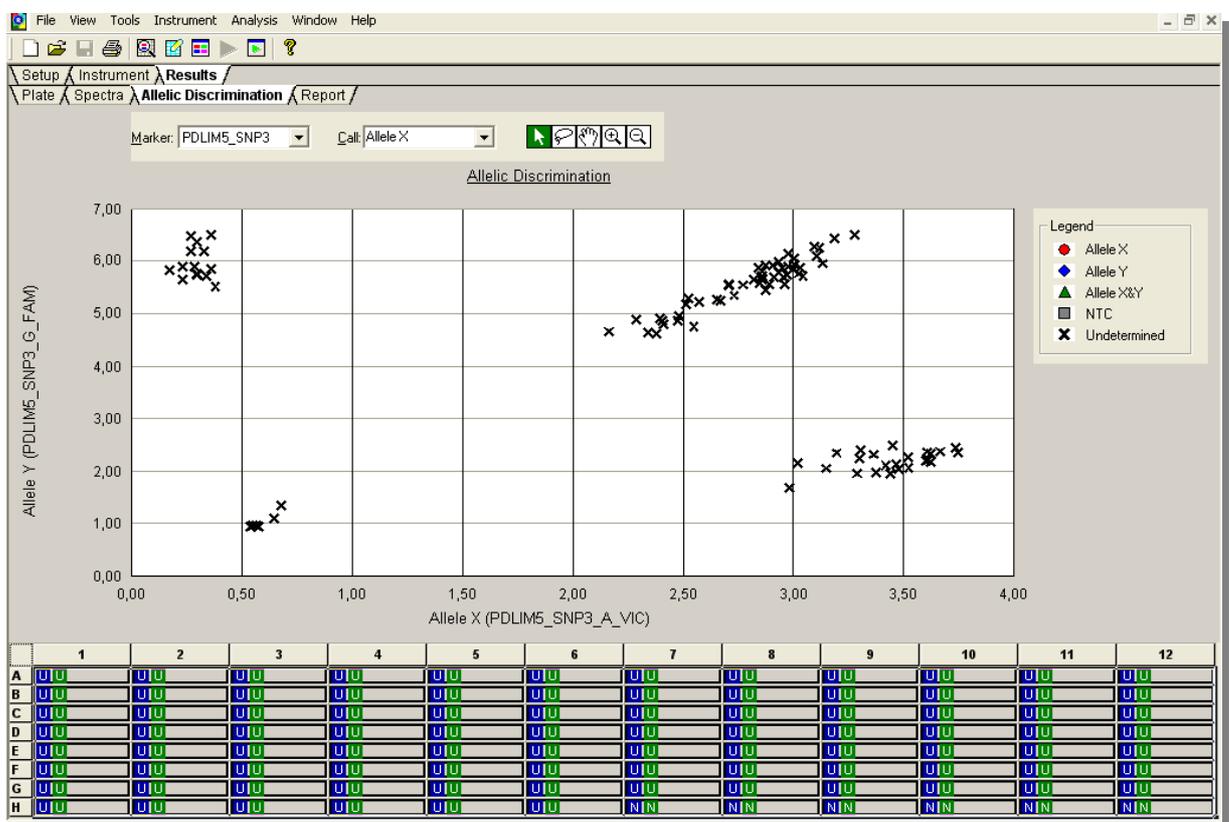
Figura 6. Rappresentazione schematica della reazione basata sul metodo TaqMan



Lo strumento utilizzato per la discriminazione allelica è l'ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). La miscela di reazione (50ul) è stata preparata utilizzando 25µl di TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), una mix contenente la polimerasi AmpliTaq Gold® DNA, dNTP con dUTP, il fluoroforo passivo ROX ed il buffer. La soluzione è fornita ad una concentrazione 2X ed è ottimizzata per l'uso di assay basati sulla tecnica TaqMan®. Alla mix sono stati aggiunti 20ng di DNA e 2,5 µl di Assay 20X contenente i primer e i probe specifici per lo SNP che deve essere genotipizzato.

La PCR è stata effettuata secondo il protocollo standard come suggerito dal costruttore, effettuando un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C e 40 cicli alla temperatura di 94°C per 30 sec e 60°C per 1 min. Al termine della PCR è stata effettuata la lettura dell'emissione di fluorescenza tramite uno step a 60°C per 5 minuti, durante i quali lo strumento emette la luce laser e registra l'emissione di fluorescenza dei campioni. La fluorescenza rilevata dal sensore e registrata dallo strumento consente di distinguere il genotipo del soggetto sulla base della quantità di emissione ad esso relativa visualizzata in un sistema di assi cartesiani.

Figura 7. File di output di una discriminazione allelica condotta con lo strumento ABI PRISM 7000



Come mostrato nella figura 7, per ogni pozzetto della piastra ($n = 96$) è riportata una X in un sistema di assi cartesiani. Sull'asse delle ordinate è riportato il valore di emissione relativo al fluoroforo FAM mentre sull'asse delle ascisse è riportato quello del fluoroforo VIC. L'omozigosi per uno dei due alleli determina una emissione nello spettro di uno solo dei due fluorofori e la X è disposta agli estremi degli assi. I soggetti eterozigoti sono rappresentati dalle X intermedie, poiché entrambi i fluorofori emettono fluorescenza durante la PCR. Le X riportate vicino all'origine degli assi rappresentano i campioni di controllo privi di DNA.

5.3.1 ESTRAZIONE DELL'RNA E ALLESTIMENTO DI UNA BANCA DI cDNA

L'RNA necessario allo studio di espressione per il gene *PDLIM5* è stato estratto da LCL secondo il protocollo del Trizol (Invitrogen). Le LCL sono state allestite infettando i linfociti B, separati dal sangue venoso dei pazienti, con il virus di Epstein Barr (EBV), secondo il metodo di Neitzel H. (1986).

L'RNA totale estratto è stato quantizzato sia tramite lettura spettrofotometrica sia tramite confronto con un marcatore di dimensioni e concentrazione nota seminato, insieme ai campioni, su gel di agarosio più etidio bromuro e letto tramite densitometro.

Dall'RNA totale è stato sintetizzato il DNA copia (cDNA) tramite trascrizione inversa con l'enzima SuperScript II RT (Invitrogen).

Il cDNA così ottenuto è rappresentativo dell'intero pool di RNA delle cellule del soggetto analizzato e può essere utilizzato per la Real Time PCR.

5.3.2 REAL TIME PCR

La Real Time PCR è un metodo che consente di amplificare e contemporaneamente quantificare l'amplicone. Poiché il cDNA prodotto secondo il protocollo precedentemente descritto viene trascritto dall'RNA dell'intero genoma del campione, è necessario utilizzare probe specifici che consentano di amplificare il cDNA retrotrascritto dall'RNA messaggero del gene target (Assay per il *PDLIM5* Hs00179051_m1). Il metodo si basa sulla tecnica del TaqMan, descritta precedentemente.

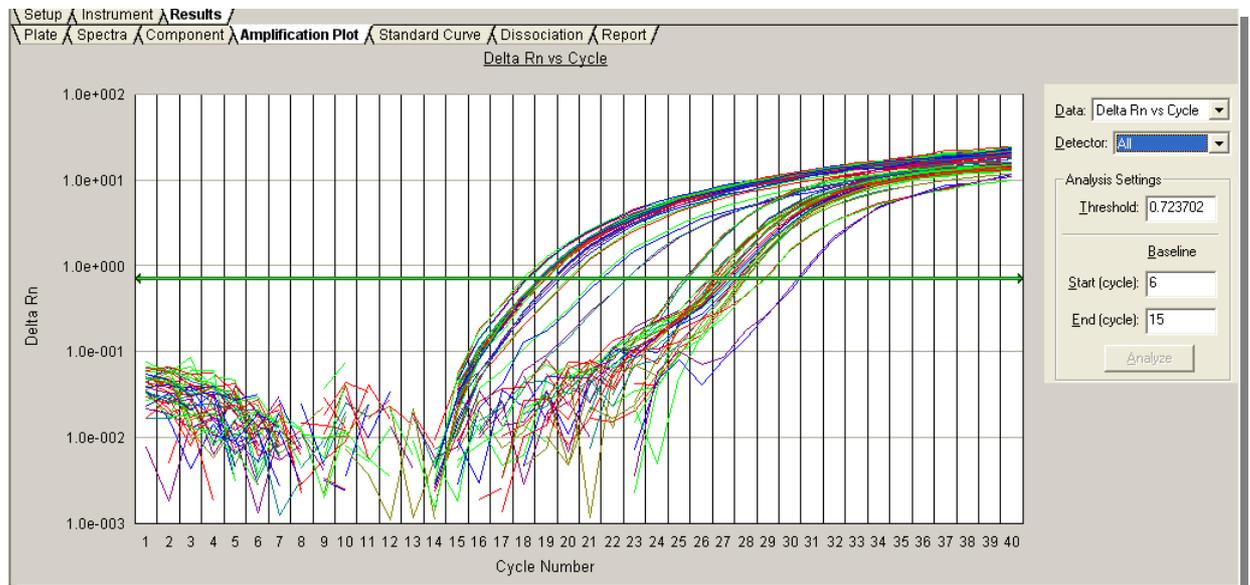
La Real Time PCR è stata condotta seguendo il protocollo standard, come suggerito dal costruttore (Applied Biosystems). La miscela di reazione (50µl) era costituita da 25µl di TaqMan Universal PCR Master Mix 2 X, 20ng di cDNA e 2,5µl della miscela contenete i primer e il probe specifico per il *PDLIM5*. Il protocollo prevede un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C e 40 cicli alla temperatura di 94°C per 30 sec e 60°C per 1 min. Durante la PCR lo strumento emette, ad ogni ciclo, un raggio laser che eccita i fluorofori e ne registra l'emissione.

Sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti in cui i campioni amplificati sono stati ripetuti in triplicato per testare l'efficienza e la replicabilità dell'esperimento. Per ogni campione sono inoltre stati allestiti i triplicati contenenti i probe e i primer specifici per il gene endogeno Gliceraldeide-Fosfato-Deidrogenasi (GAPDH). Un gene endogeno è un gene la cui espressione non è soggetta a variabilità interindividuale. Questo consente di utilizzare i livelli di espressione come normalizzatori per il gene target e permette di identificare quelle differenze di

espressione, tra un soggetto ed un altro, dovute ad errori di preparazione della miscela di reazione piuttosto che ad una reale differenza.

Al termine della reazione è possibile visualizzare un grafico rappresentativo dell'incremento di emissione di fluorescenza dei probe di ciascun soggetto, sia per il gene target che per il gene endogeno.

Figura 8. File di output di una Real Time PCR condotta con lo strumento ABI PRISM 7000



Il valore di riferimento necessario al calcolo della quantità di espressione del gene target in ciascun soggetto è rappresentato dal valore Ct. Tale valore indica il numero di cicli di PCR necessari affinché la quantità di cDNA presente in ogni pozzetto (e quindi di emissione di fluorescenza) superi un limite di riferimento, denominato *threshold*. Il *threshold* viene settato automaticamente dallo strumento nel punto in cui inizia la crescita esponenziale dell'emissione di fluorescenza e quindi del cDNA che

viene amplificato. Minore sarà il numero di cicli necessari a superare il *threshold* e maggiore sarà la quantità di cDNA (e quindi di mRNA) di partenza. Poiché ogni soggetto viene ripetuto in triplicato, il valore di espressione sarà dato dalla media dei tre valori. Per calcolare la quantità di mRNA per ogni campione è stato utilizzato il metodo della curva di diluizione standard. Oltre ai campioni a quantità di cDNA da determinare, viene infatti seminato, nella stessa piastra e per ogni piastra, un campione a concentrazione nota del quale vengono preparati 6 gradi di diluizione con fattore 2. La curva di diluizione viene preparata sia per il gene target che per il gene endogeno ed ogni diluizione viene ripetuta in triplicato. La curva di diluizione standard così preparata è necessaria per il calcolo sia dell'efficienza della PCR che della quantità di cDNA del gene target e del gene endogeno. Dall'equazione della curva è possibile ricavare la quantità di mRNA, espressa in ng, del gene target per ogni soggetto. Poiché ogni soggetto è ripetuto in triplicato, il valore di mRNA è ottenuto dalla media del triplicato del gene target normalizzata per la media del triplicato del gene endogeno.

5.4 STATISTICA E BIOINFORMATICA

La deviazione dall'Equilibrio di Hardy Weinberg (HWE) è stata valutata tramite il test del Chi-quadro. Il grado di Linkage Disequilibrium (LD) tra i marcatori di uno stesso gene è stato determinato calcolando il coefficiente di Lewontin D' e il coefficiente di correlazione r^2 (Lewontin RC. 1988).

La differenza nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche è stata valutata con il test del Chi-quadro o il test esatto di Fisher. Le frequenze aplotipiche sono state stimate tramite l'algoritmo Estimation Maximization (EM) (Qin ZS. et al., 2002). L'algoritmo EM consente di stimare la frequenza degli aplotipi a fase non nota, per i quali cioè non è possibile dedurre la posizione fisica degli alleli che li determinano sui rispettivi cromosomi omologhi.

La significatività della differenza di quantità di mRNA del *PDLIM5* tra il campione dei casi e quello dei controlli è stata calcolata con il test di Mann-Whitney.

I test statistici sono stati effettuati utilizzando i programmi Haploview versione 4.0 (Barret JC. et al., 2005), Unphased versione 3.0.10 (Dudbrige F. 2003) e GraphPad Prism versione 4.

Gli SNP dell'*NR1D1* sono stati selezionati con la funzione Tagger di Haploview utilizzando i dati scaricati dal sito pubblico di HapMap (<http://www.hapmap.org>). La funzione Tagger consente di selezionare il numero minimo di SNP informativi sufficienti a fornire informazioni sull'intero gene o su una regione limitata del gene. I Tag SNP sono stati selezionati automaticamente dal software tra quelli con valori di $D' \geq 0.9$ e valori di $r^2 \geq 0.8$. Questi valori indicano che gli SNP sono in LD completo ma non assoluto e che costituiscono un unico blocco aplotipico.

Le sequenze necessarie alla sintesi dei primer e dei prob come Assay by Design (Applied Biosystems) per il gene *PDLIM5* sono state scaricate dal sito Web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

6. RISULTATI

6.1 Geni del Sistema Dopaminergico

Tutti i polimorfismi studiati sono risultati in HWE sia nel campione dei casi che in quello dei controlli. Nell'analisi dei singoli marcatori non abbiamo riscontrato nessuna differenza significativa nella distribuzione delle frequenze alleliche o genotipiche tra casi e controlli per nessuno dei marcatori studiati (Tabella 4 I; 4 II).

I polimorfismi del *DRDI* sono risultati in LD completo ma non assoluto. Nell'analisi degli aplotipi abbiamo riscontrato una tendenza per l'associazione dell'aplotipo C-A-C ($p = 0.049$; Tabella 5) con il DB. Inoltre, l'aplotipo T-A-T è risultato più frequente nel campione dei controlli rispetto al campione dei casi ($p = 0.05$). Nell'analisi a due finestre non abbiamo evidenziato nessuna associazione.

6.2 Geni del Sistema Serotoninergico

Tutti i polimorfismi studiati sono risultati in HWE sia nel campione dei casi che in quello dei controlli. Non abbiamo riscontrato nessuna differenza significativa nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche tra casi e controlli per nessuno dei marcatori oggetto dello studio (Tabella 6).

6.3 PDLIM5: associazione ed espressione

Gli SNP sono risultati in HWE in entrambi i campioni. Non abbiamo riscontrato associazione per nessuno degli alleli o genotipi analizzati (Tabella 7). I marcatori sono in LD completo ma non assoluto. Nell'analisi degli aplotipi costituiti dai 3 SNP abbiamo riportato associazione tra il DB e l'aplotipo G-A-G ($p = 0.013$) (Tabella 8). L'aplotipo A-A-G è risultato significativamente più frequente nei controlli rispetto ai casi ($p = 0.047$). Nell'analisi a due finestre, abbiamo riportato associazione tra l'aplotipo G-A degli SNP 1 e 2 ($p = 0.009$) ed il DB ed una frequenza significativamente maggiore dell'aplotipo A-A nei controlli rispetto ai pazienti ($p = 0.047$). Per quanto riguarda gli aplotipi degli SNP 2 e 3, non abbiamo riportato differenze significative tra casi e controlli nelle frequenze aplotipiche stimate. Nello studio di espressione genica non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative nella quantità di mRNA tra pazienti e controlli (Figura 1).

6.4 NR1D1

Gli SNP sono risultati in HWE sia nel campione dei casi che in quello dei controlli. Non abbiamo riscontrato nessuna differenza significativa nella distribuzione delle frequenze alleliche o genotipiche tra casi e controlli per nessuno dei marcatori (Tabella 9). Gli SNP sono risultati in LD completo ma non assoluto. Nell'analisi degli aplotipi abbiamo rilevato una associazione significativa tra l'aplotipo G-G ed il DB ($p = 0.02$) ed una frequenza significativamente maggiore dell'aplotipo A-G ($p = 0.005$) nei controlli rispetto ai pazienti (Tabella 10).

7. DISCUSSIONE

Nel nostro studio, l'analisi dei singoli marcatori non ha rilevato una associazione tra i polimorfismi analizzati e il DB. Nell'analisi degli aplotipi abbiamo riscontrato un'associazione statisticamente significativa per alcuni aplotipi costituiti dagli SNP dei geni *DRD1*, *PDLIM5* e *NR1D1*. Lo studio di espressione del *PDLIM5* non ha evidenziato differenze statisticamente significative nella quantità di mRNA tra i casi e i controlli.

I geni candidati oggetto del nostro studio sono stati precedentemente valutati in numerosi studi di associazione con il DB. Come riportato in introduzione, i polimorfismi dei geni *hSERT* e *DRD1* sono stati più frequentemente riportati associati con il DB. Tuttavia, studi di replicazione o metanalisi hanno fornito risultati contrastanti o riportato associazione con polimorfismi differenti, non consentendo di trarre conclusioni definitive circa il loro coinvolgimento nel modulare la suscettibilità al DB (review in Kato T. 2007).

Differenze nelle frequenze alleliche e genotipiche tra popolazioni possono essere all'origine delle discrepanze tra i dati riportati in letteratura. Inoltre, il differente disegno dello studio (numero di marcatori, dimensioni del campione, statistiche utilizzate) può contribuire alla mancanza di replicabilità di un dato.

Nel nostro campione l'analisi degli aplotipi del *DRD1* ha evidenziato una associazione positiva con il DB.

Recentemente, Ni e collaboratori (2002) hanno riportato una associazione statisticamente significativa tra gli aplotipi costituiti dai polimorfismi -800T/C, -48A/G, 1403T/C e il DB I. In uno studio condotto in collaborazione con la sezione di

Neurogenetica del *Clarke Institute, Università di Toronto, Canada*, il nostro gruppo ha riportato una associazione tra alcuni aplotipi costituiti dagli stessi polimorfismi ed il DB I, sia nel campione sardo che nel campione combinato sardo-canadese. (Del Zompo M. et al., 2007).

Nel presente studio, abbiamo esteso la genotipizzazione all'intero campione di bipolari non stratificato per sottodiagnosi, confermando l'associazione precedentemente riportata. Questo dato fornisce ulteriori conferme di un possibile coinvolgimento del gene codificante per il recettore D1 nel modulare la suscettibilità al disturbo.

Come riferito nei risultati, abbiamo evidenziato una associazione per l'aplotipo raro G-A-G del *PDLIM5* mentre l'aplotipo A-A-G è risultato più frequente nel campione dei controlli rispetto a quello dei casi.

Nell'analisi a due finestre abbiamo rilevato associazione per gli aplotipi costituiti dagli SNP 1 e 2, mentre non è stata riscontrata associazione per gli aplotipi costituiti dagli SNP 2 e 3. Il nostro risultato conferma quanto riportato nello studio di Kato e collaboratori (2005), i quali hanno evidenziato una associazione per gli aplotipi costituiti dagli SNP 1 e 2 del *PDLIM5* ed il DB in un campione giapponese.

I nostri risultati suggeriscono la presenza di un locus di suscettibilità in LD con il blocco delimitato dagli SNP 1 e 2, mentre il blocco costituito dagli SNP 2 e 3 sembrerebbe non fornire alcuna informazione aggiuntiva. L'associazione degli aplotipi rari (frequenza <10%) con il disturbo, indica che l'aplotipo di rischio non ha un contributo di grande effetto nel determinare l'insorgenza della malattia. Tuttavia, poiché il DB è una malattia complessa, una associazione con un aplotipo raro può

indicare la presenza di un locus, in LD con il blocco, che contribuisce con un piccolo effetto all'insorgenza della malattia, determinata da una complessa interazione tra fattori di rischio multipli.

Lo studio di espressione del *PDLIM5* non ha evidenziato differenze significative tra casi e controlli. L'ipotesi di un coinvolgimento di una espressione alterata del *PDLIM5* nel DB deriva sia dalle evidenze biologiche che collegano il LIM alla cascata dei secondi messaggeri, sia dai dati riportati in letteratura. Gli studi condotti finora hanno riportato un aumento dell'espressione del *PDLIM5* nella corteccia prefrontale ed una riduzione nei linfoblasti di pazienti giapponesi affetti da DB (Iwamoto et al., 2004; Kato T. et al., 2005). Tuttavia, nello studio di Iwamoto è stata valutata l'espressione del *PDLIM5* anche in un campione caucasico di bipolari non evidenziando alcuna variazione significativa tra affetti e non affetti. Il nostro dato è dunque in linea con quanto riportato in letteratura.

La valutazione dell'espressione del *PDLIM5* in cellule periferiche può fornire informazioni utili all'identificazione di marker biologici. Come riportato nell'introduzione, il LIM è una proteina coinvolta nella regolazione dei canali al Ca^{2+} a voltaggio dipendenti localizzati nelle regioni sinaptiche. In letteratura sono state riportate diverse evidenze di una alterazione dei livelli basali di Ca^{2+} nei linfoblasti di soggetti bipolari (Emamghoreishi M. et al., 2000; Kato T. et al., 2003).

In uno studio di Emamghoreishi e colleghi (1997), gli autori hanno dimostrato che le concentrazioni basali di Ca^{2+} risultano significativamente più alte nei linfoblasti di pazienti bipolari confrontate con quelle di un campione di controllo. Questo dato conferma l'importanza delle alterazioni dei meccanismi intracellulari Ca^{2+} dipendenti

nel DB e suggerisce il possibile utilizzo di linee cellulari periferiche come modelli cellulari di DB.

Nel nostro studio abbiamo riportato una associazione positiva per gli aplotipi del gene *NR1D1*. In letteratura non sono presenti studi che valutano il ruolo di questo gene nell'insorgenza del DB. Altri geni del sistema dei ritmi circadiani sono stati analizzati riportando associazioni positive e confermando il possibile coinvolgimento di mutazioni nelle sequenze dei clock genes nel DB.

Come riportato nei risultati, abbiamo riscontrato una maggiore frequenza di alcuni degli aplotipi dei geni *DRD1*, *PDLIM5* e *NR1D1* nei controlli. Questo dato indica che i soggetti portatori di tale combinazione aplotipica potrebbero avere un minore rischio di insorgenza della malattia rispetto ai soggetti non portatori. In una condizione ideale, infatti, in uno studio di associazione dovrebbe essere possibile identificare un marker e/o un aplotipo associato ad un aumento di rischio ed un marker e/o un aplotipo associato ad una diminuzione del rischio.

La mancanza di associazione per i singoli marcatori rispetto all'associazione significativa che abbiamo evidenziato per gli aplotipi può essere determinata da diversi fattori. Molti test statistici utilizzati per l'identificazione di loci di suscettibilità per una malattia valutano i valori di LD tra la malattia stessa ed un singolo marcatore. Tuttavia, il potere dei test di associazione può non essere sufficiente ad identificare una associazione, poiché spesso il rischio correlato ad un singolo locus risulta molto basso nelle malattie complesse. Inoltre, le informazioni di LD contenute in un singolo marker sono in genere molto ridotte. Gli aplotipi costituiti da marcatori in LD completo ma non assoluto invece, consentono di analizzare una

intera regione del gene, includendo dunque anche eventuali marker localizzati all'interno dell'area o in LD con essa (Akey J. et al., 2001).

Uno dei punti di forza del nostro lavoro è rappresentato dalle caratteristiche peculiari della popolazione sarda. La Sardegna, infatti, è costituita da un insieme di isolati genetici che conferiscono alla intera popolazione caratteristiche storiche e genetiche uniche.

L'accrescimento demografico di una popolazione aperta è soggetto ad un forte contributo dei flussi di immigrazione da popolazioni con caratteristiche genetiche spesso differenti. Questo determina un aumento della variabilità genetica della popolazione e la sovrapposizione di diversi pool genetici che ne riducono l'omogeneità. Negli studi di associazione o di linkage la stratificazione può inficiare l'attendibilità del dato e l'omogeneità genetica è un requisito di fondamentale importanza. Le popolazioni isolate hanno una struttura genetica più omogenea ed una minore stratificazione rispetto alle popolazioni aperte e i risultati genetici ottenuti su queste popolazioni sono generalmente più attendibili (Kruglyak L. 1999; Abbot A. 2000). Uno dei vantaggi delle popolazioni isolate è dato dall'alto grado di LD. L'ampia estensione delle mappe di LD, infatti, consente di valutare il linkage o l'associazione con una malattia utilizzando un numero di marcatori genetici minore rispetto a quelli necessari per una popolazione aperta. Inoltre, in condizioni di elevata omogeneità, è sufficiente un numero minore di soggetti per poter avere un potere statistico adeguato all'identificazione di associazione di un marker o di una regione cromosomica con la malattia (Service S. et al., 2006).

8. CONCLUSIONI

Il nostro studio suggerisce che i geni *NR1D1*, *PDLIM5* e *DRD1* sono implicati nella patogenesi del DB. Il dato ottenuto su una popolazione isolata aumenta la robustezza dello studio e la accuratezza del risultato. Tuttavia, in considerazione delle possibili differenze nella struttura genetica delle popolazioni, questo risultato necessita di essere replicato in popolazioni con diversa origine etnica.

9. APPENDICE

Tabella 3. *Caratteristiche demografiche del campione*

	Età media \pm DS
Bipolari (n = 299)	42.9 \pm 13.8
Maschi (n = 109)	39.2 \pm 13.2
Femmine (n = 190)	44.9 \pm 13.8
Controlli (n = 300)	41.98 \pm 12.77
Maschi (n = 140)	41.89 \pm 11.39
Femmine (n = 160)	42.07 \pm 13.96

DS = Deviazione Standard

Tabella 4 I. *Distribuzione delle frequenze dei polimorfismi dei geni del sistema dopaminergico e analisi di associazione*

Polimorfismo	Casi (n)	%	Controlli (n)	%	χ^2 (p)
DRD1					
-800T/C					
Allele T	196	33	206	37	
Allele C	402	67	348	63	2.45 (0.11)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo TT	36	12	40	14	
Genotipo TC	124	41	126	46	
Genotipo CC	139	47	111	40	2.53 (0.28)
Totale	299	100	277	100	
-48A/G					
Allele A	190	32	195	35	
Allele G	408	68	359	65	1.52 (0.22)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo AA	34	11	35	13	
Genotipo AG	122	41	125	45	
Genotipo GG	143	48	117	42	1.82 (0.40)
Totale	299	100	277	100	
1403T/C					
Allele T	404	68	356	64	
Allele C	194	32	198	36	1.39 (0.24)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo TT	142	48	115	42	
Genotipo TC	120	40	126	45	
Genotipo CC	37	12	36	13	2.16 (0.34)
Totale	299	100	277	100	
DRD2					
NcoI					
Allele C	453	76	394	71	
Allele T	145	24	160	29	3.17 (0.07)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo CC	174	58	141	51	
Genotipo CT	105	35	112	40	
Genotipo TT	20	7	24	9	3.21 (0.20)
Totale	299	100	277	100	
Taq1A					
Allele T	99	17	81	15	
Allele C	499	83	469	85	0.73 (0.39)
Totale	598	100	550	100	
Genotipo TT	7	2	3	1	
Genotipo TC	85	28	75	27	
Genotipo CC	207	70	197	72	1.52 (0.50)
Totale	299	100	275	100	

Tabella 4 II. Distribuzione delle frequenze dei polimorfismi dei geni del sistema dopaminergico e analisi di associazione

Polimorfismo	Casi (n)	%	Controlli (n)	%	χ^2 (p)
DRD3					
Ser/Gly					
Allele A	423	71	387	70	
Allele G	175	29	167	30	0.1 (0.75)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo AA	156	52	136	49	
Genotipo AG	111	37	115	42	
Genotipo GG	32	11	26	9	1.22 (0.54)
Totale	299	100	277	100	
DRD4					
VNTR 48bp					
Allele 2	89	15	69	13	
Allele 4	395	68	367	69	
Allele 7	86	15	78	15	3.89 (0.27)
AR*	12	2	20	3	
Totale	582	100	534	100	
Genotipo 2/2	9	3	12	4	
Genotipo 2/4	61	21	39	15	
Genotipo 2/7	8	3	6	2	
Genotipo 4/4	136	46	127	48	
Genotipo 4/7	55	19	60	22	9.00 (0.17)
Genotipo 7/7	11	4	5	2	
GR**	11	4	18	7	
Totale	291	100	267	100	
DAT					
VNTR 40bp					
Allele 1	2	0.3	1	0.1	
Allele 2	359	60.7	360	64.9	
Allele 3	231	39	193	35	2.49 (0.28)
Totale	592	100	554	100	
Genotipo 1/2	1	0.3	1	0.4	
Genotipo 1/3	1	0.3	0	0	
Genotipo 2/2	111	38.2	113	40.8	
Genotipo 2/3	136	46	133	48	4.59 (0.33)
Genotipo 3/3	47	15.2	30	10.8	
Totale	296	100	277	100	

*AR = Alleli Rari raggruppati (frequenza < 0.02); **GR = Genotipi Rari raggruppati (frequenza < 0.02)

Tabella 5. DRD1: Frequenze aplotipiche stimate e analisi di associazione

Polimorfismi	Aplotipi (%)						p globale
SNP 1-2-3	T-A-T	T-A-C	T-G-C	C-A-C	C-G-T	C-G-C	
Casi (n = 299)	0.02	0.28	0.025	0.02	0.635	0.02	0.07
Controlli (n = 300)	0.007	0.336	0.03	0.007	0.60	0.02	
χ^2	2.26	3.82	0.37	3.87	1.23	0.11	
p	0.13	0.050	0.54	0.049	0.26	0.73	
SNP 1-2 (D'=0.92; r² = 0.8)	T-A	T-G	C-A	C-G			
Casi (n = 299)	0.30	0.03	0.02	0.65			0.27
Controlli (n = 300)	0.34	0.03	0.01	0.62			
χ^2	2.42	0	1.63	1.46			
p	0.12	1	0.2	0.23			
SNP 2-3 (D'=0.93; r² = 0.85)	A-T	A-C	G-T	G-C			
Casi (n = 299)	0.02	0.30	0.66	0.02			0.25
Controlli (n = 300)	0.01	0.34	0.63	0.02			
χ^2	0.96	2.24	0.78	0.99			
p	0.33	0.13	0.38	0.32			

SNP1 = -800T/C; SNP2 = -48A/G; SNP3 = 1403T/C. I valori di p statisticamente significativi (≤ 0.05) sono riportati in grassetto.

Tabella 6. Distribuzione delle frequenze dei polimorfismi dei geni del sistema serotoninergico e analisi di associazione

Polimorfismo	Casi (n)	%	Controlli (n)	%	χ^2 (p)
HTR2a					
102T/C					
Allele T	342	57	289	52	
Allele C	256	43	265	48	2.93 (0.09)
Totale	598	100	554	100	
Genotipo TT	92	31	75	27	
Genotipo TC	158	53	139	50	
Genotipo CC	49	16	63	23	3.86 (0.14)
Totale	299	100	277	100	
hSERT					
5-HTTLPR					
Allele l	350	59	297	54	
Allele s	248	41	255	46	2.60 (0.11)
Totale	598	100	552	100	
Genotipo ll	109	36	76	28	
Genotipo ls	132	44	145	52	
Genotipo ss	58	20	55	20	5.69 (0.06)
Totale	299	100	276	100	
5HTR2c					
Ser/Cys					
Campione completo					
Allele Cys	391	80	344	82	
Allele Ser	97	20	74	18	0.69 (0.40)
Totale	488	100	418	100	
Femmine					
Allele Cys	307	81	237	83	
Allele Ser	71	19	49	17	0.20 (0.66)
Totale	378	100	286	100	
Genotipo SerSer	10	5	5	3	
Genotipo SerCys	51	27	39	27	
Genotipo CysCys	128	68	99	70	4.09 (0.13)
Totale	189	100	143	100	
Maschi					
Allele Cys	84	76	107	81	
Allele Ser	26	24	25	19	0.54 (0.46)
Totale	110		132		

Tabella 7. *Distribuzione delle frequenze dei polimorfismi del PDLIM5 e analisi di associazione*

Polimorfismo	Casi (n)	%	Controlli (n)	%	χ^2 (p)
SNP1					
rs10008257					
Allele A	315	53	336	56	1.42 (0.23)
Allele G	283	47	264	44	
Totale	598	100	600	100	
Genotipo AA	82	28	95	32	1.66 (0.43)
Genotipo AG	151	50	147	49	
Genotipo GG	66	22	58	19	
Totale	299	100	300	100	
SNP2					
rs2433320					
Allele A	228	38	246	41	1.03 (0.31)
Allele G	370	62	354	59	
Totale	598	100	600	100	
Genotipo AA	48	16	42	14	5.9 (0.051)
Genotipo AG	132	44	162	54	
Genotipo GG	119	40	96	32	
Totale	299	100	300	100	
SNP3					
rs2433322					
Allele A	370	62	354	59	1.03 (0.31)
Allele G	228	38	246	41	
Totale	598	100	600	100	
Genotipo AA	118	40	96	32	5.19 (0.07)
Genotipo AG	134	45	162	54	
Genotipo GG	47	15	42	14	
Totale	299	100	300	100	

Tabella 8. PDLIM5: Frequenze aplotipiche stimate e analisi di associazione

Polimorfismi	Aplotipi (%)				p globale
	A-A-G	A-G-A	G-A-G	G-G-A	
SNP 1-2-3					
Casi (n = 299)	0.33	0.19	0.04	0.43	0.033
Controlli (n = 300)	0.39	0.17	0.02	0.42	
χ^2	3.98	0.39	5.94	0.34	
p	0.047	0.54	0.013	0.56	
SNP 1-2 (D'=0.82; r² = 0.4)	A-A	A-G	G-A	G-G	
Casi (n = 299)	0.33	0.19	0.05	0.43	0.025
Controlli (n = 300)	0.39	0.17	0.02	0.42	
χ^2	3.96	0.49	6.84	0.34	
p	0.047	0.48	0.009	0.56	
SNP 2-3 (D'=1; r² = 0.98)	A-G	G-A			
Casi (n = 299)	0.37	0.62			0.255
Controlli (n = 300)	0.41	0.59			
χ^2	1.45	1.18			
p	0.23	0.28			

SNP1 = rs10008257; SNP2 = rs2433320; SNP3 = rs2433322. I valori di p statisticamente significativi (≤ 0.05) sono riportati in grassetto.

Tabella 9. *Distribuzione delle frequenze dei polimorfismi dell'NR1D1 e analisi di associazione*

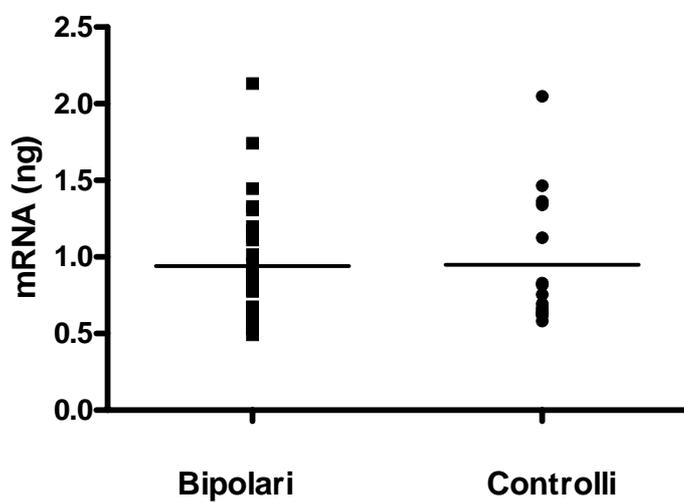
Polimorfismo	Casi (n)	%	Controlli (n)	%	χ^2 (p)
SNP1					
rs12941497					
Allele A	90	15	98	16	0.40 (0.52)
Allele G	508	85	502	84	
Totale	598	100	600	100	
Genotipo AA	11	3	6	2	3.96 (0.13)
Genotipo AG	68	23	86	29	
Genotipo GG	220	74	208	69	
Totale	299	100	300	100	
SNP2					
rs939347					
Allele A	79	13	92	15	1.15 (0.28)
Allele G	519	87	508	85	
Totale	598	100	600	100	
Genotipo AA	10	3	8	3	2.8 (0.25)
Genotipo AG	59	20	76	25	
Genotipo GG	230	77	216	72	
Totale	299	100	300	100	

Tabella 10. *NR1D1: Frequenze aplotipiche stimate e analisi di associazione*

Polimorfismi	Aplotipi (%)			p globale
SNP 1-2 (D'=0.84; r²= 0.62)	A-A	A-G	G-G	0.016
Casi (n = 299)	13	2	85	
Controlli (n = 300)	12	5	80	
χ^2	0.48	7.84	5.27	
p	0.49	0.005	0.02	

SNP1 = rs12941497; SNP2 = rs939347. I valori di p statisticamente significativi (≤ 0.05) sono riportati in grassetto

Figura 1. mRNA (ng) del gene PDLIM5 nel sottocampione costituito da 30 pazienti BD e 15 controlli



Mann-Whitney U-test, $p = 0.838$

Bipolari: media \pm DS; 0.94 ± 0.37 min: 0.49 max: 2.13

Controlli: media \pm DS; 0.95 ± 0.43 min: 0.58 max: 2.05

10. BIBLIOGRAFIA

Abbot A Manhattan versus Reykjavik. *Nature*. 2000. 406:340–342.

Adams, L.J., Mitchell, P.B., Fielder, S.L., Rosso, A., Donald, J.A. & Schofield, P.R. A susceptibility locus for bipolar affective disorder on chromosome 4q35. *Am J Hum Genet* 1998. 62:1084–1091.

Akey J, Jin L, Xiong M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *Eur J Hum Genet*. 2001. 9:291-300.

Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review for association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol Psychiatry* 2003. 8:574–91.107

Badenhop, R.F., Moses, M.J., Scimone, A., Adams, L.J., Kwok, J.B.J., Jones, A.M., Davison, G., Evans, M.R., Kirkby, K.C., Hewitt, J.E., Donald, J.A., Mitchell, P.B. & Schofield, P.R. Genetic refinement and physical mapping of a 2.3 Mb probable disease region associated with a bipolar affective disorder susceptibility locus on chromosome 4q35. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet)*. 2003. 117:23–32.

Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maitre M., Malan A., et al. Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci*. 2002. 15:833–840.

Barden, N., Harvey, M., Shink, E., Tremblay, M., Gagne, B., Raymond, C., Labbe, M., St-Onge, L., Stadler, H., Sillaber, I., Paez-Pereda & Holsboer, F. Identification and characterisation of a gene predisposing to both bipolar and unipolar affective disorders. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet)*. 2004. 130:122.

Barrett JC., Fry B., Maller J., Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005. 21:263-265

Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, Schulze TG, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Georgi A, Schumacher J, Schwarz M, Abou Jamra R, Höfels S, Propping P, Satagopan J, Detera-Wadleigh SD, Hardy J, McMahon FJ. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2007. Epub ahead of print

Benedetti, F., Serretti, A., Colombo, C., Barbini, B., Lorenzi, C., Campori, E., et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003. 123: 23–26.

Berrettini, W.H., Ferraro, T.N., Goldin, L.R., Weeks, D.E., Detera-Wadleigh, S., Nurnberger, J.I., Jr & Gershon, E.S. Chromosome 18 DNA markers and manic depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91:5918–5921.

Blackwood, D.H., He, L., Morris, S.W., McLean, A., Whitton, C., Thomson, M., Walker, M.T., Woodburn, K., Sharp, C.M., Wright, A.F., Shibasaki, Y., St Clair, D.M., Poreous, D.J. & Muir, W.J. A locus for bipolar disorder on chromosome 4p. *Nat Genet*. 1996. 12:427-430.

Bocchetta A, Piccardi MP, Martinelli V, Quesada G, Del Zompo M. Maternal inheritance of manic depression in hemizygotes for the G6PD-Mediterranean mutation. Indirect evidence for Xq28 transmission in Sardinia. *Psychiatr Genet*. 1999. 9:63-68

Boivin, D. B. Influence of sleep–wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *J Psychiatry Neurosci* . 2000. 25:446–458.

Bunney, W. E., & Bunney, B. G. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology* 2000. 22:335–345.

Burnet PW, Harrison PJ, Goodwin GM, Battersby S, Ogilvie AD, Olesen J, Russell MB. Allelic variation in the serotonin 5-HT_{2C} receptor gene and migraine. *Neuroreport*. 1997. 8:2651-3.

Cade JF. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Medical Journal of Australia* 1949. 2:349–352

Castaneda T.R., de Prado, B. M., Prieto, D., & Mora, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J Pineal Res*. 2004. 36:177–185.

Chen G, Hasanat KA, Bebchuk JM, Moore GJ, Glitz D, Manji HK Regulation of signal transduction pathways and gene expression by mood stabilizers and antidepressants. *Psychosom Med*. 1999. 61:599–617

Chen G, Masana MI, Manji HK. Lithium regulates PKC-mediated intracellular cross-talk and gene expression in the CNS in vivo. *Bipolar Disord*. 2000. 2:217-36

Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, et al. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2005. 10:771–81.

Cichon S, Nothen MM, Erdmann J, Propping P. Detection of four polymorphic sites in the human dopamine D1 receptor gene (DRD1). *Hum Mol Genet.* 1994.1:209.

Cichon S, Nothen MM, Stober G, Schroers R, Albus M, Maier W, Rietschel M, Korner J, Weigelt B, Franzek E, Wildenauer D, Fimmers R, Propping P. Systematic screening for mutations in the 5'-regulatory region of the human dopamine D1 receptor (DRD1) gene in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet.* 1996. 26:424-428.

Cichon, S., Schumacher, J., Muller, D.J. et al. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet.* 2001. 10:2933–2944.

Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Muller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry.* 1996. 1:453-60

Cordeiro Q, Talkowski ME, Chowdari KV, Wood J, Nimgaonkar V, Vallada H. Association and linkage analysis of RGS4 polymorphisms with schizophrenia and bipolar disorder in Brazil. *Genes Brain Behav.* 2005; 4: 45–50.

Culver JL, Arnow BA, Ketter TA. Bipolar disorder: improving diagnosis and optimizing integrated care. *J Clin Psychol.* 2007. 63:73-92.

Cummings JL, Mendez MF. Secondary mania with focal cerebrovascular lesions. *Am J Psychiatry* 1984. 141:1084–1087

Cummings JL. The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry* 1993. 54:14–20

Craddock N, Owen M. Is there an inverse relationship between Down's syndrome and bipolar affective disorder? Literature review and genetic implications. *J Intellect Dis Res* 1994.38:613-20.

Craddock N., Jones I. Genetics of Bipolar Disorder. *J Med Genet.* 1999. 36:585-594

Craddock N, Davé S, Greening J. Association studies of bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2001. 3:284–98.

Curtis D., Kalsi G., Brynjolfsson J. et al. Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. *Psychiatric genetics* 2003. 13: 77-84

Detera-Wadleigh, S.D., Badner, J.A., Yoshikawa, T., Sanders, A.R., Goldin, L.R., Turner, G., Moses, R., Haerian, G., Muniec, D., Nurnberger, J.I. Jr & Gershon, E.S. Initial genome scan of the NIMH Genetics Initiative bipolar pedigrees: chromosomes 4, 7, 9, 18, 19, 20, and 21q. *Am J Med Genet.* 1997. 74:254–262.

Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Goldin LR, et al. Affected sib-pair analyses reveal support of a prior evidence for a susceptibility locus for bipolar disorder, on 21q. *Am J Hum Genet* 1996. 58:1279-85.

Detera-Wadleigh, S.D., Badner, J.A., Yoshidawa, T., et al. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. 96:5604–5609.

Dewan MJ, Haldipur CV, Lane EE, Ispahani A, Boucher MF, Major LF. 1988. Bipolar affective disorder. I. Comprehensive quantitative computed tomography. *Acta Psychiatr Scand* 77:670–676.

Dick, D.M., Foroud, T., Flury, L. et al. Genomewide linkage analyses of bipolar disorder: a newsample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Am J Hum Genet.* 2003. 73:107–114.

Dmitrzak-Weglarz M, Rybakowski JK, Slopian A et al. Dopamine receptor D1 gene –48A/G polymorphism is associated with bipolar illness but not with schizophrenia in a Polish population. *Neuropsychobiology* 2006. 53: 46–50.

Drevets WC, Frank E, Price JC et al. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 1999;46:1375-87.

Dubovsky SL, Murphy J, Thomas M et al. Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. *Am J Psychiatry* 1992. 149:118-20.

Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003. 25:115-121

Egan M.F., Weinberg D.R, Neurobiology of schizophrenia, *Curr. Opin. Neurobiol.*1997. 701-707

Elvidge G, Jones I, McCandless F, Asherson P, Owen MJ, Craddock N. Allelic variation of a ball polymorphism in the DRD3 gene does not influence susceptibility to bipolar disorder: results of analysis and meta-analysis. *Neuropsych Genet.* 2001. 105:307–11.

Emamghoreishi M., Schlichter L., Li P., Parikh S., Sen J., Kamble A., Warsh JJ. High Intracellular Calcium Concentrations in Transformed Lymphoblasts From Subjects With Bipolar I Disorder. *Am J Psychiatry.* 1997. 154:976-982

Emamghoreishi M, Li PP, Schlichter L, Parikh SV, Cooke R, Warsh JJ. Associated disturbances in calcium homeostasis and G protein-mediated cAMP signaling in bipolar I disorder. *Biol Psychiatry*. 2000. 48:665-73.

Endicott J, Spitzer RL. A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1978. 35:837-844

Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D et al. Bipolar I disorder and schizophrenia: A 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am. J. Hum. Genet*. 2005; 77: 918–936.

Foroud, T., Castelluccio, P.F., Koller, D.L. et al. Suggestive evidence of a locus on chromosome 10p using the NIMH Genetics Initiative bipolar affective disorder pedigrees. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2000. 96:18–23.

Frank B, Niesler B, Nothen MM et al. Investigation of the human serotonin receptor gene HTR3B in bipolar affective and schizophrenic patients. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2004; 131: 1–5.

Frey BN, Andreazza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, Kapczinski F. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behav Pharmacol*. 2007. 18:419-30.

Friedman E, Wang HY. Receptor-mediated activation of G proteins is increased in postmortem brains of bipolar affective disorder subjects. *J Neurochem*. 1996. 67:1145–1152.

Furlong RA, Ho L, Walsh C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES, et al. Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. *Am J Med Genet* 1998. 81:58–63. 106

Furlong RA, Ho L, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, Rubinsztein DC. Nucleotide analysis of the monoamine oxidase A (MAOA) gene in bipolar affective disorder by association studies, meta-analyses, and sequencing of the promoter. *Am J Med Genet.* 1999; 88 (4): 398–406.

Garner, C., McInnes, L.A., Service, S.K., Spesny, M., Fournier, E., Leon, P. & Freimer, N.B. Linkage analysis of a complex pedigree with severe bipolar disorder, using a Markov Chain Monte Carlo method. *Am J Hum Genet.* 2001. 68:1061–1064.

Ginns, E.I., Ott, J., Egeland, J.A., Allen, C.R., Fann, C.S.J., Pauls, D.L., Weissenbachoff, J., Carulli, J.P., Falls, K.M., Keith, T.P. & Paul, S.M. A genome-wide search for chromosomal loci linked to bipolar affective disorder in the Old Order Amish. *Nat Genet.* 1996. 12:431–435.

Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet.* 1993. 2:2197.

Green EK, Raybould R, Macgregor S et al. Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 2005; 62: 642–648

Greenwood, T.A., Alexander, M., Keck, P.E., McElroy, S., Sadovnick, A.D., Remick, R.A. & Kelsoe, J.R. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder *AmJMed Genet (Neuropsychiatr Genet).* 2001. 105:145–151.

Guillaumond F., Dardente, H., Giguere, V., & Cermakian, N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* 2005. 20:391–403.

Gutierrez, B., Fananas, L., Arranz, M.J., Valles, V., Guillamat, R., Vanos, J., Collier, D. Allelic association analysis of the 5-HT₂ receptor gene in bipolar affective-disorder. *Neurosci. Lett.* 1996. 212:65–67.

Hahn C.G, Friedman E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 1999; 2:81-86

Hahn CG, Umapathy, Wang HY, Koneru R, Levinson DF, Friedman E. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients. *J Psychiatr Res.* 2005. 39:355-363

Harms E., Young, M. W., & Saez, L. CK1 and GSK3 in the *Drosophila* and mammalian circadian clock. *Novartis Found Symp* 2003. 253:267–277

Hayden EP, Nurnberger JI Jr. Molecular genetics of bipolar disorder. *Genes Brain Behav.* 2006. 5: 85–95.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem.* 1996. 66:2621-2624.

Hong KS, McInnes LA, Service SK *et al.* Genetic mapping using haplotype and model-free linkage analysis supports previous evidence for a locus predisposing to severe bipolar disorder at 5q31-33. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2004. 125: 83–86.

Ikonomov OC, Manji HK. Molecular mechanisms underlying mood stabilization in manic-depressive illness: the phenotype challenge. *Am J Psychiatry.* 1999. 156:1506-1514.

Itokawa, M., Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Ishitsuka, Y., Detera-Wadleigh, S. & Yoshikawa, T. Genetic analysis of a functional GRIN2A promoter (GT) N repeat in bipolar disorder pedigrees in humans. *Neurosci Lett.* 2003. 345:53–56.

Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Ikeda K, Kato T. (2004a). Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry* 9:406-416

Iwamoto K., Bundo M., Washizuka S., Kakiuchi C., Kato T. (2004b). Expression of HSPF1 and LIM in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *J Hum Genet* 49:227-231

Jope RS, Roh MS.. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets.* 2006. 7:1421-1434

Kato T, Ishiwata M, Mori K, Washizuka S, Tajima O, Akiyama T, Kato N. Mechanisms of altered Ca²⁺ signalling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003. 6:379-89.

Kato T, Kuratomi G, Kato N. Genetics of bipolar disorder. *Drugs Today (Barc.)* 2005. 41: 335–344.

Kato T, Iwayama Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K, Minabe Y, et al. Gene expression and association analyses of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2005. 10:1045-1065

Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet.* 1999. 22:139–144

Kurabayashi N., Hirota, T., Harada, Y., Sakai, M., & Fukada, Y. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiol Int.* 2006. 23:129–134.

Lannfelt, L., Sokoloff, P., Matres, M.P., Pilon, C., Giros, B., Jonnson, E., Sedvall, G. Schwartz, J.C. Amino acid substitution in the dopamine D3 receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr. Genet.* 1992. 2:249–256

Larmande P, Palisson E, Saikali I et al. Disappearance of akinesia in Parkinson disease during a manic attack. *Rev Neurol* 1993.149:557-558.

Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. *Am J Med Genet* 2005. 133:110–5.

Leboyer M, Malafosse A, Boularand S et al. Tyrosine hydroxylase polymorphisms associated with manic-depressive illness. *Lancet* 1990.335: 1219.

Lenox, R.H., Gould, T. D., & Manji, HK. Endophenotypes in bipolar disorder. *Am J Med Genet.* 2002. 114:391–406.

Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics.* 1988.120:849-52.

Li P, Andreopoulos S, Warsh J. Signal transduction abnormalities in bipolar affective disorder. In: Reith MEA (ed). *Cerebral signal transduction.* Totowa: Humana Press, 2000. 283-312.

Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ. A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet.* 1993. 2:767-73.

Lidow M.S., Williams G.V, Goldman-Rakic P,S. The cerebral cortex: a case for common site of action of antipsychotics *TiPS.* 1998. 19

Liu, J., Aita, V.M., Knowles, J.A., Terwilliger, J.D., Baltazar, R., Grunn, A., Loth, J.E., Kanyas, K., Lerer, B., Endicott, J., Wang, Z., Penchaszadeh, G., Gilliam, T.C. & Baron, M. Search for susceptibility loci in extended pedigrees with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry.* 1999. 4: S21.

Liu, J., Juo, S.H., Dewan, A., Grunn, A., Tong, X., Brito, M., Park, N., Kanyas, K., Lerer, B., Endicott, J., Penchaszadeh, G., Knowles, J.A., Ott, J., Gilliam, T.C. & Baron, M. Evidence for a putative bipolar disorder locus on 2p13-16 and other potential loci on 4q31, 7q34, 8q13, 9q31, 10q21-24, 13q32, 14q21 and 17q11-12. *Mol Psychiatry.* 2003. 8:333–342.

Lundstrom, K. and Turpin, M.P. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest Virus System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 225:1068–1072.

Lyons-Warren A, Chang JJ, Balkissoon R et al. Evidence of association between bipolar disorder and Citron on chromosome 12q24. *Mol. Psychiatry* 2005; 10: 807–809.

Maeno-Hikichi Y, Chang S, Matsumura K, Lai M, Lin H, Nakagawa N, et al. A PKC ϵ –ENH-Channel complex specifically modulates N-Type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci.* 2003. 6:468-475

Mahmood T, Silverstone T. Serotonin and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2001. 66:1-11.

Magnusson A. & Boivin D.. Seasonal affective disorder: an overview. *Chronobiol Int.* 2003. 20 :189–207.

Malek Z.S., Dardente, H., Pevet, P., & Raison, S. Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci.* 2005. 22:895–901.

Manji HK, Etcheberrigaray R, Chen G, Olds JL. Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the alpha isozyme. *J Neurochem.* 1993. 61:2303-2310

Manji HK, Potter W. Monoaminergic mechanisms in bipolar disorder. In: Young LT, Joffe RT (eds). *Bipolar disorder: biological models and their clinical application.* New York: Dekker, 1997. 1-40

Manji HK. and Lenox R. H. Protein Kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry.* 1999. 24:1328-1351

Manji HK, Lenox RH. The nature of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2000a. 61:42- 57

Manji HK, Lenox RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2000b. 48:518-30.

Manji HK, Quiroz JA, Payne JL, Singh J, Lopes BP, Viegas JS, Zarate CA. The underlying neurobiology of bipolar disorder. *World Psychiatry.* 2003. 2:136-46.

Mansour, H. A., Wood, J., Logue, T., Chowdari, K. V., Dayal, M., Kupfer, D. J., et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2006. 5:150–157.

Mansour HA, Wood J, Logue T et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2006; 5: 150–157.

Massat I, Souery D, Del-Favero J, Van Gestel S, Serretti A, Macciardi F, Smeraldi E, et al., Positive association of dopamine D2 receptor polymorphism with bipolar affective disorder in a European Multicenter Association Study of affective disorders. *Am J Med Genet.* 2002.114:177-85.

Massat, I., Souery, D., Del-Favero, J. et al. Positive association of dopamine D2 receptor polymorphism with bipolar affective disorder in a European multicenter association study of affective disorders. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet).* 2002. 114:177–185.

McInnis, M., Lan, T.-H., Willour, V.L. et al. Genome-wide scan of bipolar disorder in 65 pedigrees: supportive evidence for linkage at 8q24, 18q22, 4q32, 2p12, and 13q12. *Mol Psychiatry.* 2003a. 8:288–298.

McInnis, M., Dick, D.M., Willour, V.L. et al. Genomewide scan and conditional analysis in bipolar disorder: evidence for genomic interaction in the National Institute of Mental Health Genetics Initiative bipolar pedigrees. *Biol Psychiatry.* 2003b. 54:1265–1273.

Millar, K., Mackie, S., Pickard, B., Buchanan, S., Christie, S., Malloy, P., Blackwood, D., Muir, W. & Porteous, D. DISC1: progress from discovery towards an understanding. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet).* 2004. 130: 6.

Miller S. A., Dykes, D. D., Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988. 16: 1215.

Moore GJ, Bebchuk JM, Parrish JK, Faulk MW, Arfken CL, Strahl-Bevacqua J, Manji HK. Temporal dissociation between lithium-induced changes in frontal lobe myo-inositol and clinical response in manic-depressive illness. *Am J Psychiatry*. 1999. 156:1902-8.

Morissette, J., Villeneuve, A., Bordeleau, L., Rochette, D., Laberge, C., Gagne, B., Laprise, C., Bouchard, G., Plante, M., Gobeil, L., Shink, E., Weissenbach, J. & Barden, N. Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in Quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. *Am J Med Genet (NeuropsychiatrGenet)*. 1999. 88,:567–587.

Muglia P, Petronis A, Mundo E, Lander S, Cate T, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes in bipolar disorder: evidence for a role of DRD4. *Mol Psychiatry*. 2002. 7:860-6.

Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet*. 1986. 73:320-326

Ni X., Trakalo JM., Mundo E. et al. Linkage disequilibrium between dopamine D1 receptor gene (DRD1) and bipolar disorder *Biological Psychiatry* 2002. 52:1144-1150

Nievergelt, C. M., Kripke, D. F., Barrett, T. B., Burg, E., Remick, R. A., Sadovnick, A. D., et al. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006. 141:234–241.

Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Detera-Wadleigh, S.D., Toyota, T., Shimuzu, H., Yamada, K., Yoshitsugu, K., Hattori, E., Yoshikawa, T. & Arinami, T. Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative bipolar pedigrees. *Mol Psychiatry*. 2002. 7:954–961.

Okada M, Northup JK, Ozaki N, Russell JT, Linnoila M, Goldman D. Modification of human 5-HT(2C) receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino-acid substitution. *Molecular Psychiatry*. 2004. 9:55–64.

Pekkarinen, P., Terwilliger, J., Bredbacka, P.E., Lonnqvist, J. & Peltonen, L. Evidence of a predisposing locus to bipolar disorder on Xq24-q27.1 in an extended Finnish pedigree. *Genome Res*. 1995. 5:105–115.

Potash, J.B., Zandi, P.P., Willour, V.L., Lan, T., Huo, Y., Avramopoulos, D., Shugart, Y.Y., MacKinnon, D.F., Simpson, S.G., McMahon, F.J., DePaulo, J.R. & McInnis, M.G. Suggestive linkage to chromosomal regions 13q31 and 22q12 in families with psychotic bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2003. 160:680–686.

Preisig M, Bellivier F, Fenton BT et al. Association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms: results of a multicenter study. *Am J Psychiatry*. 2000. 157: 948–955.

Qin ZS, Niu T, Liu JS. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002. 71:1242-1247.

Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Interv*. 2004. 4:259-72.

Reppert, S.M., & Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647–676.

Robins LN, Price RK. Adult disorders predicted by childhood conduct problems: results from the NIMH Epidemiologic Catchment Area project. *Psychiatry* 1991. 54:116-32

Sarkar G, Kapelner S, Grandy DK, Marchionni M, Civelli O, Sobell j, Heston L, Sommer SS. Direct sequencing of the dopamine D2 receptor (DRD2) in schizophrenics reveals three polymorphisms but no structural change in the receptor. *Genomics*.1991. 11: 8-14

Scappa S, Teverbaugh P, Ananth J. Episodic tardive dyskinesia and parkinsonism in bipolar disorder patients. *Can J Psychiatry* 1993. 38:633

Schlegel S, Krtezschar K. Computed tomography in affective disorders. Part I. Ventricular and sulcal measurements. *Biol Psychiatry*. 1987. 22:4–14.

Schosser A, Fuchs K, Leisch F *et al*. Possible linkage of schizophrenia and bipolar affective disorder to chromosome 3q29; a follow-up. *J. Psychiatr. Res.* 2004. 38: 357– 364.

Segurado, R., Detera-Wadleigh, S.D., Levinson, D.F. et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: bipolar disorder. *Am J Hum Genet.* 2003. 73:49–62.

Sklar, P., Gabriel, S.B., McInnis, M.G., Bennett, P., Lim, Y.-L., Tsan, G., Schaffner, S., Kirov, G., Jones, I., Owen, M., Craddock, N., DePaulo, J.R. & Lander, E.S. Family based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry*. 2002. 7:579–593.

Serretti, A., Benedetti, F., Mandelli, L., Lorenzi, C., Pirovano, A., Colombo, C., et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003. 121, 35–38.

Service S, DeYoung J, Karayiorgou M, Roos JL, Pretorius H, Bedoya G, Ospina J, et al. Magnitude and distribution of linkage disequilibrium in population isolates and implications for genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006. 38:556-560

Severino G, Congiu D, Serreli C et al. A48G polymorphism in the D1 receptor genes associated with bipolar I disorder. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatr. Genet.* 2005. 134: 37–38.

Shastry BS. Bipolar disorder: an update. *Neurochem Int.* 2005. 46:273-279.

Smyth C, Kalsi G, Curtis D, et al. Two-locus admixture linkage analysis of bipolar and unipolar affective disorder supports the presence of susceptibility loci on chromosomes 11p15 and 21q22. *Genomics* 1997. 39:271-8.

Staley JK, Malison RT, Innis RB. Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol Psychiatry.* 1998 Oct 1;44(7):534-49.

Stopkova P, Saito T, Papolos DF et al. Identification of PIK3C3 promoter variant associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2004; 55: 981–988.

Strakowski SM, Wilson DR, Tohen M, Woods BT, Douglass AW, Stoll AL. Structural brain abnormalities in first-episode mania. *Biol Psychiatry.* 1993. 33:602–609.

Strakowski SM, Adler CA, DelBello MP. Volumetric MRI studies of mood disorders: do they distinguish unipolar and bipolar disorder? *Bipolar Disord.* 2002. 4:80–88.

Straub, R.E., Lehner, T., Luo, Y., Loth, J.L., Shao, W., Sharpe, L., Alexander, J.R., Das, K., Simon, R., Fieve, R.R., Lerer, B., Endicott, J., Ott, J., Gilliam, C. & Baron, M. A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3. *Nat Genet.* 1994. 8: 291–296.

Swanson J., Castellanos F.X, Murias M.et al., Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder *Curr.Opin.Neurobiol.* 1998. 263-271

The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNP. *Nature.* 2007. 449:851-861.

Thomson PA, Wray NR, Millar JK et al. Association between the TRAX/DISC locus and both bipolar disorder and schizophrenia in the Scottish population. *Mol. Psychiatry* 2005a; 10: 657–668, 616.

Thomson PA, Wray NR, Thomson AM et al. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G proteincoupled receptor. *Mol. Psychiatry* 2005; 10: 470–478b.

Turecki G, Rouleau GA, Mari J, Joobor R, Morgan K. Lack of association between bipolar disorder and tyrosine hydroxylase: a meta-analysis. *Am J Med Genet* 1997.74:348–352.

Vandenbergh D. J.; Persico, A. M.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A.; Li, X.; Jabs, E. W.; Uhl, G. R.: Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics.* 1992. 14: 1104-1106

Wang H.Y., Friedman E. Enhanced Protein Kinase C Activity and Translocation in Bipolar Affective Disorder Brains. *Biol Psychiatry*. 1993. 40:568-575

Wang JF, Young LT, Li PP, Warsh JJ. Signal transduction abnormalities in bipolar disorder. In: Joffe RT, Young LT, editors. *Bipolar Disorder: Biological Models and Their Clinical Application*. New York: Marcel Dekker. 1997. 41–79.

Wang HY and Friedman E. Increased association of brain Protein Kinase C with the Receptor for Activated C Kinase-1 (RACK1) in Bipolar Affective Disorder. *Biol Psychiatry*. 2001. 50:364-370

Warren JT Jr, Peacock ML, Rodriguez LC, Fink JK. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR2): detection by DGGE and RFLP analysis. *Hum Mol Genet*. 1993. 2:338.

Warsh JJ, Young LT, Li PP. Guanine nucleotide binding (G) protein disturbances in bipolar affective disorder. In: Manji HK, Bowden CL, Belmaker RH, editors. *Bipolar Medications: Mechanisms of Action*. Washington, DC: American Psychiatric Press. 2000. 299–329.

Watson DG, Lenox RH. Chronic lithium-induced down-regulation of MARCKS in immortalized hippocampal cells: potentiation by muscarinic receptor activation. *J Neurochem*. 1996 Aug;67(2):767-77.

Wehr TA, Sack D, Rosenthal N, Duncan W, Gillin JC. Circadian rhythm disturbances in manic-depressive illness. *Fed Proc*. 1983. 42:2809-2814.

Weiner N., Clement, H. W., Gemsa, D., & Wesemann, W. Circadian and seasonal rhythms of 5-HT receptor subtypes, membrane anisotropy and 5-HT release in hippocampus and cortex of the rat. *Neurochem Int*. 1992. 21:7–14.

Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium sensitive component of the circadian clock. *Science*. 2006. 311:1002-5.

Young LT, Li PP, Kish SJ, Siu KP, Kamble A, Hornykiewicz O, Warsh JJ. Cerebral cortex Gs a protein levels and forskolin-stimulated cyclic AMP formation are increased in bipolar affective disorder. *J Neurochem*. 1993. 61:890–898.

Zandi, P.P., Willour, V.L., Huo, Y., Chellis, J., Potash, J.B., MacKinnon, D.F., Simpson, S.G., McMahon, F.J., Gershon, E.S., Reich, T., Foroud, T., Nurnberger, J.I. Jr, DePaulo, J.R. & McLinnis, M.G. Genome scan of a second wave of NIMH Genetics Initiative bipolar pedigrees: chromosomes 2, 11, 13, 14, and X. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet)*. 2003. 119:69–76.

Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA. et al. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*. 2007. 9:561-570

Zubieta JK, Huguelet P, Ohl LE et al. High vesicular monoamine transporter binding in asymptomatic bipolar I disorder: sex differences and cognitive correlates. *Am J Psychiatry* 2000. 157:1619-1628.

Zucker M, Weizman A, Harel D et al. Changes in vesicular monoamine transporter (VMAT2) and synaptophysin in rat substantia nigra and prefrontal cortex induced by psychotropic drugs. *Neuropsychobiology*. 2001. 44:187-191.

Per la stesura di questa tesi sono stati consultati i seguenti testi:

- Neuropsicofarmacologia. Govoni S, Frattola L. Ed. UTET 1998
- Le basi farmacologiche della terapia. Goodman & Gilman. McGraw-Hill, Undicesima Edizione.
- Clemente F, Fumagalli G. Farmacologia generale e molecolare Ed UTET 1999