

NUOVO ASSEGNO DI RICERCA: PROGETTO DI RICERCA

Tutor: Piero Parchi, Prof. Associato MED26

Titolo Progetto: “Validazione di un saggio “quantitativo” dell’alfa-sinucleina patologica liquorale come marker di progressione della malattia con corpi di Lewy”.

Background e significato

La malattia da corpi di Lewy, termine ombrello che include sia il morbo di Parkinson (PD) che la demenza con corpi di Lewy (DLB), è la seconda malattia neurodegenerativa più prevalente dopo il morbo di Alzheimer. Essa consegue all’accumulo intracellulare di aggregati oligomericici e fibrillari della proteina alfa-sinucleina (α -syn) che conducono alla formazione dei corpi di Lewy.

La malattia da corpi di Lewy è molto eterogenea sia per quanto riguarda i sintomi d’esordio che la progressione clinica ed è difficile da distinguere, specie all’esordio, da altre malattie associate all’accumulo di altre proteine patologiche (tau e TDP-43), come i parkinsonismi atipici, la demenza frontotemporale e la malattia di Alzheimer.

Recentemente sono stati sviluppati saggi laboratoristici ultrasensibili che, sfruttando le proprietà di autopropagazione di queste proteine con proprietà *prion-like*, permettono, attraverso un’amplificazione del segnale, la rilevazione indiretta di minute quantità delle proteine “*misfolded*”, specifiche di patologia, nei tessuti e liquidi biologici (Atarashi 2009). Ciò ha condotto ad un significativo passo avanti nella diagnostica clinica precoce delle malattie neurodegenerative. Tra questi saggi, il più studiato e ad oggi più diffuso è la *real time-quaking induced conversion* (RT-QuIC) (Atarashi 2009). Tale metodica è stata inizialmente applicata alle malattie da prioni dove, come conseguenza degli ottimi risultati ottenuti nelle patologie da prioni, è oggi diventata il test diagnostico di riferimento per la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) (Hermann 2022), la malattia da prioni più frequente nell’uomo. Sebbene la maggior parte degli studi sia stato condotto su campioni di liquido cerebrospinale (CSF), nella CJD la RT-QuIC ha dimostrato una ottima performance diagnostica anche su altri tessuti accessibili quali la cute prelevata mediante punch biotico (Mammana et al 2020) o la mucosa olfattoria prelevata mediante brushing nasale (Bongianni et al. 2017). L’interesse verso queste matrici tessutali alternative al CSF è legato al fatto che mentre raccolta del CSF mediante puntura lombare è una procedura invasiva che presenta anche alcune controindicazioni, la raccolta di campioni di cute o di mucosa olfattiva non richiede la necessità di ospedalizzazione e/o osservazione protratta e pertanto potrebbe essere effettuata mediante una semplice visita ambulatoriale e condurre ad un significativo ampliamento della popolazione di pazienti che ne potrebbe beneficiare.

Alla luce del successo ottenuto nelle malattie da prioni, la RT-QuIC è stata successivamente adattata con successo per la ricerca dell’ α -syn patologica nella malattia da corpi di Lewy (α -syn RT-QuIC). Numerosi studi sia del nostro gruppo che di altri ricercatori hanno dimostrato l’ottima

performance diagnostica della α -syn RT-QuIC su liquor di pazienti affetti da sinucleinopatie associate a corpi di Lewy (PD, DLB), sia nella fase clinica conclamata che nelle fasi prodromiche quali il disturbo comportamentale in sonno REM isolato (iRBD) e anche in fase preclinica (Grosveman 2018, Rossi 2020 e 2021, Iranzo 2022, Quadalti 2023, Palmqvist 2023). Alcuni studi hanno anche dimostrato una comparabile accuratezza diagnostica della α -syn RT-QuIC condotta su liquor e biopsie di cute (Wang 2020, Mammana 2021, Iranzo 2023).

Il risultato dell' α -syn RT-QuIC è stato finora ampiamente validato come risposta qualitativa dicotomica (positiva / negativa), utile per la diagnosi differenziale e la stratificazione dei pazienti con o senza la patologia da corpi di Lewy. Tuttavia, in uno studio recente, in cui abbiamo analizzato mediante RT-QuIC omogenati di tessuto cerebrale di un sottogruppo di 20 pazienti a diverso stadio di progressione abbiamo osservato che, parallelamente al progredire della patologia e l'aumento delle aree cerebrali interessate dall'accumulo patologico di α -syn, si osserva un maggior grado di positività del saggio RT-QuIC. Specificatamente, la correlazione positiva osservata tra i parametri cinetici della reazione RT-QuIC e la severità della patologia suggerisce che questo approccio potrebbe fornire anche dati quantitativi, che rivelino indirettamente la concentrazione della α -syn presente nei campioni biologici. (*Bentivenga et al, Acta Neuropathol. 2024*). L'outcome quantitativo oltre a quello qualitativo dicotomico (positivo/negativo) rappresenterebbe un significativo passo avanti ai fini di una migliore caratterizzazione sia diagnostica che prognostica dei pazienti con LBD e la loro stratificazione nei trials terapeutici. Pertanto, l'attuale obiettivo è quello di potenziare il saggio RT-QuIC in modo da ricavare una quantificazione della α -syn anche in campioni di CSF prelevati *in vitam*.

Recentemente abbiamo ottenuto risultati preliminari in tal senso analizzando diluizioni seriali di CSF prelevato da una coorte di 26 pazienti con PD: 14 *high seeders* e 12 *low seeders*, così classificati poiché risultati fortemente e debolmente positivi ad uno screening iniziale di RT-QuIC, rispettivamente. I risultati hanno mostrato una tendenza del gruppo *high seeders* a produrre una maggiore percentuale di curve RT-QuIC positive rispetto al gruppo *low seeders*. Inoltre, il numero di replicati positivi e la *lag phase* (il tempo richiesto alla reazione RT-QuIC per superare la soglia di positività) si sono rivelati i parametri cinetici più promettenti per la quantificazione della proteina patologica, in quanto consentono di discriminare tra loro i pazienti dei due gruppi. (*Mammana et al, Clin Chem Lab Med 2024*)

L'obiettivo principale del presente progetto include la validazione di questo nuovo approccio "quantitativo" nella realtà clinica. In particolare, verrà valutata la correlazione tra "seeding activity" dell' α -syn misurata mediante RT-QuIC "quantitativa" e le diverse traiettorie di progressione di malattia nei pazienti con malattia di Parkinson, e la comparazione del valore clinico della misurazione quantitativa della "seeding activity" dell' α -syn nelle due matrici biopsia cutanea periferica e liquido cefalorachidiano.

Materiali e metodi, obiettivi e descrizione del lavoro:

In primo luogo, verrà ottimizzata la capacità del nostro test RT-QuIC di quantificare l' α -syn patologica nella matrice in esame. Successivamente, applicheremo il test "quantitativo" ad una coorte di pazienti PD stratificati in base allo stato genetico, alla durata della malattia, alle caratteristiche motorie e alla presenza di declino cognitivo. Infine, effettueremo una comparazione tra le matrici liquor e cute riguardo alla associazione tra valutazione quantitativa dell' α -syn in ciascuna matrice e i parametri clinici di severità e di progressione della malattia.

Per raggiungere il primo obiettivo analizzeremo in modo sistematico tutti i potenziali parametri "quantitativi" della α -syn RT-QuIC per la loro riproducibilità e la loro capacità di distinguere tra campioni con concentrazione nota di α -syn patologica (cioè campioni di CSF α -syn RT-QuIC negativi "spiked" con diluizioni seriali di omogenati cerebrali di individui con patologia LB contenente una quantità nota di α -syn patologica). Questi parametri includeranno a) la % di repliche positive, b) i parametri cinetici della curva fluorescente (in particolare il tempo di latenza o LAG e l'area sotto la curva della curva di fluorescenza o AUC), e c) la valutazione dell'effetto della diluizione del campione sulla risposta RT-QuIC (sia dei parametri cinetici che del numero di repliche positive). In particolare verrà calcolato sulla curva di diluizione seriata il valore di SD50 che per la α -syn RT-QuIC rappresenta la quantità di seed nel campione a cui corrisponde un numero di replicati positivi pari al 50% di quelli caricati. A tal fine useremo l'algoritmo midSIN, disponibile online al seguente sito: <https://midsin.physics.ryerson.ca>

Valuteremo, infine, anche il potenziale valore clinico e la riproducibilità di un punteggio di *outcome* quantitativo basato su un'analisi combinata dei parametri cinetici più riproducibili della α -syn RT-QuIC risultanti dalle indagini al punto 3.

Una volta completato il test di messa a punto, lo applicheremo retrospettivamente ad una estesa coorte di pazienti con PD (almeno 200) valutati al basale entro 5 anni dall'esordio. L'ipotesi sarebbe che la "quantità" rilevata di "seeds" di α -syn, definita dai parametri cinetici della reazione, correli con una progressione più rapida e diffusa della patologia, che, a sua volta, mostrerà un'associazione con la progressione della malattia ed il fenotipo clinico.

Ogni paziente PD sarà sottoposto a fenotipizzazione approfondita, compresi i punteggi clinici che valutano i domini motori, non motori e cognitivi e l'analisi genetica, mediante un pannello di geni associati al rischio di PD e al fenotipo clinico. Le valutazioni cliniche includeranno sia valutazioni motorie (ad esempio, Movement Disorders Society Unified Parkinson's disease Rating Scale (MDS-UPDRS) parti da I a IV) che valutazioni non motorie, ad esempio, funzione autonoma e l'olfatto, e valutazioni cognitive (ad esempio, Mini-Mental State Examination (MMSE) e Montreal Cognitive Assessment (MoCa). Saranno inoltre raccolti dati di neuroimaging, tra cui risonanza magnetica e SPECT.

Oltre alla α -syn RT-QuIC, misureremo in ogni paziente la proteina leggera del neurofilamento CSF (NfL), un biomarcatore che riflette la neurodegenerazione degli assoni mielinici, i cui livelli hanno

già dimostrato un'associazione positiva con lo sviluppo di declino cognitivo. Inoltre, stratificheremo i pazienti per la concomitante patologia a-beta e tau secondo i profili dello schema ATN misurando i livelli liquorali delle proteine A β 42, A β 40, p-tau e t-tau che sono noti per essere associati al declino cognitivo.

Bibliografia.

Atarashi R et al. *Nat Methods*. 2007 Aug;4(8):645-50. doi: 10.1038/nmeth1066
Hermann P et al. *Lancet Neurol*. 2021 Mar;20(3):235-246. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30477-4
Mammana A et al. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Apr;7(4):559-564. doi: 10.1002/acn3.51000
Bongianni M et al. *JAMA Neurol*. 2017 Feb 1;74(2):155-162. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4614
Groverman BR et al. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Feb 9;6(1):7. doi: 10.1186/s40478-018-0508-2
Rossi M et al. *Acta Neuropathol* 2020;140(1):49-62. doi: 10.1007/s00401-020-02160-8.
Rossi M et al. *Neurology* 2021;97(9): e930–40. doi: 10.1212/WNL.00000000000012438
Iranzo A et al. *Lancet Neurol* 2021;20(3):203-212. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30449-X.
Quadalti C et al. *Nat Med*. 2023 Aug;29(8):1964-1970. doi: 10.1038/s41591-023-02449-7
Palmqvist S et al. *Nat Med*. 2023 Aug;29(8):1971-1978. doi: 10.1038/s41591-023-02450-0
Wang Z et al. *JAMA Neurol* 2020;78(1):1–11. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.3311.
Mammana A et al. *Mov Disord* 2021. doi: 10.1002/mds.28651.
Iranzo A et al. *Neurology*. 2023;100(18):e1944-e1954. doi: 10.1212/WNL.000000000000207147
Bentivenga GM et al. *Acta Neuropathol* 2024;147(1):18. doi: 10.1007/s00401-023-02663-0
Mammana A et al. *Clin Chem Lab Med* 2024 62(10):2001-2010. doi: 10.1515/cclm-2023-1472

Piano delle Attività

Il piano di formazione a cui è collegato il progetto di ricerca oggetto della presente richiesta di Assegno ha come scopi la miglior riuscita del progetto in oggetto e la formazione di un giovane ricercatore con competenze specifiche nel campo della neurobiologia applicata allo studio delle malattie neurodegenerative.

Il candidato vincitore dell'Assegno di Ricerca verrà inserito in un percorso di formazione comprendente:

1. Attività formativa di laboratorio:

- Discussione e stesura dei protocolli sperimentali.
- Acquisizione delle metodiche previste dal progetto.
- Analisi dei risultati degli esperimenti previsti dal progetto.
- Discussione, analisi, ed interpretazione dei dati ottenuti.

2. Partecipazione alla preparazione e stesura dei lavori scientifici riguardanti i dati ottenuti.

3. Collaborazione alla preparazione di lavori scientifici di ordine generale (reviews) sull'argomento.

4. Partecipazione a comunicazioni orali o poster a congressi e riunioni scientifiche nazionali ed internazionali.

5. Partecipazione a seminari e corsi di aggiornamento sull' argomento sia in Italia che all' Estero.
6. Possibilità di un breve periodo di formazione presso un centro di ricerca all' Estero.