

Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale e di Precisione

Nome: Delia

Cognome: Righi

Ciclo: 38° ciclo a.a. 2022/2023

Laurea: Medical Biotechnologies

ORCID: 0009-0001-3352-5618



Progetto di Ricerca/Research Project

ITA

Le miopatie autoimmuni infiammatorie costituiscono una famiglia eterogenea di malattie che comprendono: Dermatomiosite (DM), Polimiosite (PM), Miosite Autoimmune Necrotizzante (NAM), Miosite sovrapposta alla sindrome antisintetasi (Anti-SS-OM) e Miosite a Corpi di Inclusione (IBM) [Dalakas M. C., 2020]. I pazienti affetti da miopatia autoimmune presentano tipicamente debolezza muscolare progressiva sia a livello prossimale che distale. [Mammen A. L., 2016]. Tutte queste condizioni condividono un componente immunomediato, ma ciascuna malattia è associata a caratteristiche cliniche, istopatologiche e fisiopatologiche distinte. In particolare, la IBM è una malattia muscolare sia neurodegenerativa che autoimmune, caratterizzata dall'evoluzione asimmetrica graduale della debolezza muscolare, lenta ma che porta a una grave disabilità nei pazienti. I reperti clinici iniziali comuni includono debolezza e atrofia dei flessori delle dita lunghe e dei muscoli quadricipiti. I pazienti diventano gravemente disabili dopo una progressione lenta, insidiosa e indolore della malattia. In due terzi dei casi può verificarsi anche disfagia. [Ranque-Francois, B., 2005]. La IBM rappresenta la causa più frequente di miopatia acquisita dopo i 50 anni, con un inizio clinico che si verifica raramente prima del quarto decennio di vita. [Lucchini, M., 2021]. Tuttavia, la patogenesi della malattia rimane scarsamente compresa e consiste in un'interazione tra vie infiammatorie e degenerative [Naddaf, E., 2018]. La biopsia muscolare di solito evidenzia cellule infiammatorie, principalmente linfociti CD8+, che circondano e invadono le fibre muscolari non necrotiche, rappresentando l'elemento principale della componente infiammatoria, insieme a caratteristiche degenerative come vacuoli "rimmed" e piegature anomale delle proteine. [Naddaf, E., 2018]. La IBM è ulteriormente caratterizzata da un'associazione aumentata con la neuropatia periferica, estremamente insolita nelle altre forme di miopatie infiammatorie idiopatiche. In uno studio di popolazione esteso, il 36% dei pazienti con IBM era affetto da dolore neuropatico periferico (PNP) [Naddaf, E., 2022], nella maggior parte dei casi descritto come polineuropatia assonale [Lee 2020]. La miosite a corpi di inclusione rimane refrattaria al trattamento. Attualmente, la diagnosi si basa sui criteri ECNM 2011 [Hilton-Jones, D., 2016] o sui criteri di Griggs che sono più stringenti [Lucchini, M., 2021], includendo stimolazione elettrofisiologica, biopsia muscolare e giudizio clinico basato sulla storia della progressione dei sintomi. Pertanto, l'identificazione di biomarcatori genetici e nuovi circolanti specifici per la miosite a corpi di inclusione potrebbe rivestire un'importanza fondamentale. Un insieme di "segni distintivi" biologici nei fluidi

corporei potrebbe non solo contribuire alla diagnosi della malattia, ma migliorare la comprensione dei bersagli patogenetici coinvolti sia nelle vie degenerative che infiammatorie. Tra i potenziali biomarcatori per il componente neurodegenerativo, i neurofilamenti (NF) sono stati ampiamente studiati in diverse malattie neurologiche, a causa della loro elevata espressione nei neuroni, fornendo supporto strutturale per il mantenimento del citoscheletro neuronale. Le anomalie nei NF, in particolare nella forma leggera (NF-L), riflettono il danno assonale e le lesioni neuronali e sono implicati nella patogenesi delle malattie neurodegenerative [Yuan A., 2017]. Diverse malattie del sistema nervoso periferico sono state oggetto di indagini relative ai NF, sia autoimmune acquisite, tossiche o genetiche. [Hayashi, 2020; Huehnchen, 2022]. La concentrazione di NF è generalmente aumentata nei fluidi corporei (liquido cerebrospinale, plasma e siero) e svolge un ruolo importante come biomarcatore prognostico per il monitoraggio della progressione/gravità della malattia e la previsione della sopravvivenza. Sono rilevabili precocemente e il loro aumento è associato a una progressione più rapida della malattia e a una diminuita durata della vita del paziente [Benatar M., 2018]. Anche se la polineuropatia associata alla IBM non presenta specifiche caratteristiche istopatologiche infiammatorie o degenerative, il danno assonale è una caratteristica in una considerevole quota di casi e giustifica ulteriormente l'analisi del NF-L nel siero. Oltre ai NF, il ruolo della proteina TDP-43 come biomarcatore è stato discusso per lungo tempo: l'accumulo di aggregati di TDP-43 nel sistema nervoso centrale è una caratteristica comune di molte malattie neurodegenerative, come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), la demenza frontotemporale (DFT), la malattia di Alzheimer (AD) [Jo, M., 2020]. La TDP-43 è una proteina nucleare a legame RNA multi-dominio, altamente incline a dislocazione (dal nucleo al citoplasma), piegatura e aggregazione. Questi accumuli di TDP-43 sono stati trovati anche nelle fibre muscolari scheletriche dei pazienti con IBM, dimostrati mediante immunocolorazione [Benveniste, O. 2015]. Poiché diverse caratteristiche di questa proteina sembrano essere correlate a meccanismi chiave alla base della neurodegenerazione, rappresenta una proteina dominante di interesse per comprendere la patogenesi della malattia. L'autoanticorpo diretto contro una proteina di 43 kD identificata nei sieri dei pazienti con IBM può valutare la via infiammatoria. L'antigene bersaglio è stato identificato nella proteina nucleosidasi 1A citosolica 5' (cN1A), un enzima in grado di catalizzare l'idrolisi di nucleotidi ampiamente espressa in diversi tessuti e nel sistema nervoso centrale. [Amlani A., 2019]. Sulla base di studi recenti, il test degli anticorpi anti-cN1A mostra un'alta specificità diagnostica del 93% e una sensibilità moderata del 50% [Felice, K., 2018]. Gli autoanticorpi associati alla miosite possono contribuire a definire sottogruppi di pazienti in termini di fenotipi clinici o patologici, prognosi e risposta al trattamento. Infine, le mutazioni nel gene che codifica la proteina valosina-contenente (VCP) sono associate alla sindrome clinica della miopatia a corpi di inclusione e ad altre patologie come la malattia di Paget, la demenza fronto-temporale, la SLA e la corea di Huntington. [Greenberg, S. A. 2007]. La VCP è un membro della famiglia di proteine AAA+ (AAA+) associate a diverse attività cellulari. Le caratteristiche tipiche di una proteina AAA+ sono uno o due domini proteici AAA+ codificati tandem. [White SR., 2007]. Questi domini sono essenziali per il legame e l'idrolisi dell'ATP. Per questo motivo, la VCP è stata implicata in processi cellulari multipli che vanno dalla mitosi, alla morte cellulare, alla biogenesi degli organelli, alla fusione delle membrane e alla degradazione proteica, potendo essere coinvolta anche nella formazione di inclusione proteiche. [Wang Q., 2004].

OBIETTIVI: Caratterizzazione di un insieme di molecole circolanti in grado di definire:

- Le miopatie autoimmuni infiammatorie.
- In particolare, la Miosite a Corpi di Inclusione, le vie neurodegenerative e infiammatorie.
- Confrontare la IBM con altre Miopatie Autoimmuni Infiammatorie e Malattie Muscolari Non Infiammatorie.

Ciò può migliorare la comprensione dei bersagli patogenetici, la previsione della prognosi, la valutazione della risposta al trattamento e, eventualmente, potenziare gli studi clinici per sviluppare un trattamento efficace.

Metodi sperimentali: Esamineremo diversi tipi di marcatori neuronali per svelare la loro utilità diagnostica e prognostica nelle miopatie autoimmuni infiammatorie, e in particolare nella Miosite a Corpi di Inclusione. Il nostro interesse principale è cercare nuovi possibili biomarcatori circolanti in grado di caratterizzare sia la via neurodegenerativa che quella infiammatoria. Utilizzeremo siero ottenuto dal sangue periferico, anziché la raccolta di

liquido cerebrospinale, evitando un procedimento invasivo, rappresentando il principale svantaggio nell'impiego estensivo del liquido cerebrospinale in diagnostica e consentendo di ripetere le procedure durante l'evolversi della malattia. Quindi, in base all'introduzione precedente, pianifichiamo di quantificare Neurofilamenti, TDP 43 e VCP per caratterizzare clinicamente le condizioni di neurodegenerazione, mentre la misurazione degli autoanticorpi anti-cN1A rappresenta un metodo potenzialmente valido per la diagnosi clinica della IBM, oltre a essere un indizio per chiarire il ruolo dell'autoimmunità nella patogenesi della IBM. Saranno raccolti campioni di siero da circa 20 pazienti con miopatie autoimmuni infiammatorie, 20 pazienti con miosite a corpi di inclusione e 20 pazienti con miopatie non infiammatorie presso l'Ospedale "Le Scotte" e saranno divisi in aliquote, adeguatamente conservati a -80°C. Effettueremo la determinazione quantitativa delle isoforme di NF-light e TDP-43 mediante il Simoa digital immunoassay ultrasensibile (Sistema di Rilevamento Biomarcatori SR-X™ - Quanterix). Gli autoanticorpi anti-cN1A saranno valutati tramite ELISA. Infine, sarà eseguito il testing genetico mirato a singolo gene per il VCP utilizzando il sequenziamento genico Sanger. L'analisi sarà condotta per ciascun biomarcatore, ma diversi modelli, rappresentanti profili specifici di biomarcatori, saranno esaminati attraverso adeguate metodologie computazionali al fine di caratterizzare specificamente ogni condizione clinica.

ENG

Autoimmune inflammatory myopathies are a heterogeneous family of diseases that include Dermatomyositis (DM) Polymyositis (PM), Necrotizing Autoimmune Myositis (NAM), Anti-synthetase syndrome-overlap myositis (Anti-SS-OM), and Inclusion-Body-Myositis (IBM) [Dalakas M. C., 2020]. Patients with autoimmune myopathy typically present progressing proximal and distal muscle weakness. [Mammen A. L., 2016]. All these conditions share an immune-mediated component, but each disease is associated with distinct clinical, histopathologic, and pathophysiologic features. In particular, IBM is both a neurodegenerative and autoimmune muscle disease characterized by the gradual asymmetric evolution of muscle weakness, which is slow, but patients become severely disabled. Common initial clinical findings include weakness and atrophy of long finger flexors and quadriceps muscles. Patients become severely disabled after a slow, insidious, and painless disease progression. In two-thirds of the cases dysphagia can also occur. [Ranque-Francois, B., 2005]. IBM represents the most frequent cause of acquired myopathy after 50 years of age, and clinical onset rarely occurs before the fourth decade of life. [Lucchini, M., 2021]. However, disease pathogenesis remains poorly understood and consists of an interplay between inflammatory and degenerative pathways [Naddaf, E., 2018]. Muscle biopsy usually shows inflammatory cells, mainly comprising CD8+ lymphocytes surrounding and invading non-necrotic muscle fibers which represent the main feature of the inflammatory component, along with degenerative features such as "rimmed" vacuoles and abnormal protein misfolding. [Naddaf, E., 2018]. IBM is further characterized by an increased association with peripheral neuropathy, highly unusual in the other forms of idiopathic inflammatory myopathies. In a recent extended population study, 36% of IBM patients were affected by peripheral neuropathic pain (PNP) [Naddaf, E., 2022], in most cases described as axonal polyneuropathy [Lee 2020]. Inclusion body myositis remains refractory to treatment. Nowadays, diagnosis is based on ECNM 2011 criteria [Hilton-Jones, D., 2016] or by Griggs criteria which are more stringent [Lucchini, M., 2021], including electrophysiological stimulation, muscle biopsy, and clinical judgment with a history of symptom progression. Thus, the identification of genetic and novel circulating biomarkers specific to Inclusion Body Myositis could be of fundamental importance. A set of biological "hallmarks" in biofluid may not only aid in the diagnosis of the disease but improve a better understanding of the pathogenic targets involved in both degenerative and inflammatory pathways. Among potential biomarkers for neurodegenerative component, Neurofilaments (NFs) have been studied extensively in different neurological disorders, because of their high expression in neurons, which provide structural support for neuronal cytoskeleton maintenance. Abnormalities in NF, in particular NF-light (NF-L), level reflect axonal damage and neuronal injury and are implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases [Yuan A., 2017].

Different peripheral nervous system disorders have also been the object of investigations relative to NfL, either acquired autoimmune, toxic, or genetic. [Hayashi, 2020; Huehnchen, 2022]. NF concentration is generally increased in biofluids (CSF, plasma, and serum) and has an important role as a prognostic biomarker for monitoring disease progression/severity and predicting survival. They are early detectable, and their increase is associated with a faster disease progression and diminished patient lifespan [Benatar M., 2018]. Though IBM-associated polyneuropathy does not present with specific inflammatory or degenerative histopathological features, axonal damage is a feature in a considerable quote of cases and further warrants the analysis of serum NfL. In addition to NFs, the role of TDP-43 protein as biomarker has been discussed for such a long time: the accumulation of TDP-43 aggregates in the central nervous system is a common feature of many neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal dementia (FTD), Alzheimer's disease (AD) [Jo, M., 2020]. TDP-43 is a nuclear multidomain RNA binding protein, highly prone to mislocalization (from the nucleus to cytoplasm), misfolding and aggregation. These TDP-43 accumulations have been found also in skeletal muscle fibers of IBM patients, demonstrated by immunostaining [Benveniste, O. 2015]. Since TDP-43 several features of this protein seem to be correlated to key mechanisms underlying neurodegeneration, it represents a dominant protein of interest to understand disease pathogenesis. The autoantibody directed against a 43 kD protein identified in the sera of IBM patients can assess the inflammatory pathway. The target antigen was identified in the 5' -cytosolic nucleosidase 1A (cN1A) protein, an enzyme able to catalyze the hydrolysis of nucleotides widely expressed in several tissues and in the central nervous system. [Amlani A., 2019]. Based on recent studies, the anti-cN1A antibody test shows high diagnostic specificity of 93% and a moderate sensitivity of 50% [Felice, K., 2018]. Myositis-associated autoantibodies can help define subgroups of patients in terms of clinical or pathologic phenotypes, prognosis, and response to treatment. Finally, mutations in the gene encoding valosin-containing protein (VCP) are associated with the clinical syndrome of inclusion-body myopathy and other pathologies such as Paget's disease, fronto temporal dementia, ALS, and Huntington's disease. [Greenberg, S. A. 2007]. VCP is a member of the ATPases Associated with diverse cellular Activities AAA+ (AAA+) protein family. The typical features of an AAA+ protein is one or two tandemly encoded AAA+ protein domains [White SR., 2007]. These domains are essential for ATP binding and hydrolysis. For this reason, VCP has been implicated in multiple cellular processes ranging from mitosis, cell death, organelle biogenesis, membrane fusion, and protein degradation, and may also be involved in protein inclusion formation. [Wang Q., 2004].

OBJECTIVES: Characterization of a set of circulating molecules able to define:- Autoimmune inflammatory myopathies.- In particular, Inclusion Body Myositis, the neurodegenerative and inflammatory pathways.- Compare IBM with other Autoimmune Inflammatory Myopathies and Noninflammatory Muscle diseases. This can improve the understanding of pathogenic targets, prediction of prognosis, evaluation of treatment response and eventually enhance clinical studies to develop an effective treatment. **Experimental methods:** We will examine different kinds of neuronal markers to unravel their diagnostic and prognostic utility in autoimmune inflammatory myopathies, and in particular in Inclusion Body Myositis. Our primary interest is to search for novel possible circulating biomarkers able to characterize both the neurodegenerative pathway and the inflammatory ones. We will use serum obtained from peripheral blood, rather than CSF collection, avoiding an invasive procedure, representing the main disadvantage for CSF to be extensively employed in diagnostics, and allowing repeating the procedures during the disease course. So based on the previous introduction, we plan to quantify Neurofilaments, TDP 43, and VCP in order to clinically characterize neurodegeneration conditions, while measurement of anti-cN1A autoantibodies is a potentially valuable method for clinical diagnosis of IBM, as well as a clue to clarifying the role of autoimmunity in IBM pathogenesis. Serum samples of about 20 patients with autoimmune inflammatory myopathies, 20 patients with inclusion body myositis, and 20 patients with noninflammatory myopathies will be collected in "Le Scotte" Hospital and will be divided into aliquots, and appropriately stored at -80°C. We will perform quantitative determination of NF-light and TDP-43 isoforms by the ultra-sensitive Simoa digital immunoassay (SR-X™ Biomarker Detection System -Quanterix). Anti-cN1A autoantibodies will be performed by ELISA. Finally, targeted single-gene testing for VCP will be performed using Sanger Gene Sequencing. The analysis will be performed for every single biomarker, but multiple patterns, representing specific biomarker profiles, will be examined by appropriate computational approaches, to specifically characterize each clinical condition.