Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Oncologia, Ematologia e Patologia

Ciclo XXXV°

Settore Concorsuale: **06/A2**

Settore Scientifico Disciplinare: **MED/04**

Marcatori di età biologica nella malattia di Parkinson: risultati di un'analisi glicomica e epigenomica

Presentata da: Maddalena Milazzo

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Manuela Ferracin

Supervisore

Prof. Stefano Salvioli

Co- Supervisore

Prof. Paolo Garagnani

Esame finale Anno 2023

Sommario

ABSTRACT 3
1 INTRODUZIONE 5
1.1 La Malattia di Parkinson 5
1.2 Il PD nel framework concettuale della geroscienza 13
2 OBIETTIVI 23
3 MATERIALI E METODI 24
3.1. Coorte analizzata 24
3.2 Analisi degli N-glicani 25
3.3 Estrazione del DNA da sangue intero 26
3.4 Quantificazione del DNA 27
3.5 Conversione del DNA tramite bisulfito 27
3.6 Analisi della metilazione del DNA genome-wide 28
3.7 Analisi della metilazione del DNA di sequenze genomiche target 28
3.8 Analisi bioinformatica e statistica 32
4 RISULTATI 34
4.1 Stima dell'età biologica mediante marcatori epigenetici 34
4.2 Stima dell'età biologica mediante marcatori glicomici 37
4.3 Predizione delle conte cellulari del sangue sulla base dei dati di metilazione 38
4.4 Analsi della metilazione del DNA genome-wide 39
4.5 Analisi della metilazione del DNA di regioni genomiche selezionate 41
5 DISCUSSIONE 45

ABSTRACT

La malattia di Parkinson è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una progressiva disfunzione a livello motorio e cognitivo. È noto che l'età avanzata è il principale fattore di rischio per la malattia di Parkinson, e alcuni studi hanno dimostrato un'accelerazione dell'età biologica nelle fasi più avanzate della malattia.

Il presente studio si propone di valutare se l'accelerazione dell'invecchiamento biologico descritta nelle fasi avanzate della malattia di Parkinson caratterizzi anche le prime fasi della malattia. A tale fine sono stati utilizzati due tipi di marcatori di età biologica, basati sull'analisi della metilazione del DNA del sangue (l'orologio epigenetico e le sue varianti) e dei profili di N-glicani nel plasma (GlycoAge Test). Questi biomarcatori sono stati valutati in campioni ottenuti da pazienti con malattia di Parkinson *de novo*, cioè con una diagnosi recente e non ancora in trattamento farmacologico, oltre che da pazienti con malattia in fasi più avanzate e da controlli sani. I risultati ottenuti nei pazienti nelle prime fasi della malattia non evidenziano segni d'invecchiamento accelerato, che invece si confermano nelle fasi più avanzate.

Dai dati di metilazione è poi possibile inferire una predizione sulle proporzioni delle diverse popolazioni leucocitarie. Tale analisi ha evidenziato già nelle prime fasi della malattia significative alterazioni che in parte ricalcano quelle caratteristiche dell'invecchiamento del sistema immunitario, suggerendo un'accelerata immunosenescenza associata alla malattia di Parkinson.

Infine, i dati di metilazione del DNA sono stati analizzati per indentificare regioni del genoma differentemente metilate tra pazienti con malattia di Parkinson e controlli. I risultati di quest'analisi suggeriscono l'esistenza di piccole ma significative alterazioni nella metilazione del DNA che caratterizzano la fase precoce e/o avanzata della malattia.

In conclusione, questo studio suggerisce che le prime fasi della malattia di Parkinson siano caratterizzate da specifiche alterazioni epigenetiche e da un invecchiamento precoce del sistema immunitario, che però non si traducono in un'alterazione dei biomarcatori di invecchiamento epigenetici e glicomici.

1 INTRODUZIONE

1.1 La Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (Parkinson's disease, PD; codice ICD-10 G20) è un disturbo neurodegenerativo che colpisce prevalentemente la capacità di svolgere movimenti volontari in modo coordinato. Le principali manifestazioni cliniche della malattia di Parkinson sono la bradicinesia accompagnata da rigidità, tremore a riposo e instabilità posturale. Questi sintomi motori di solito insorgono in modo unilaterale e l'asimmetria si mantiene durante il decorso della malattia. Possono inoltre essere presenti anche manifestazioni di carattere non motorio, tra cui deterioramento cognitivo, dolore, depressione e disturbi nella regolazione del ciclo sonno-veglia REM, disfunzione autonomica, costipazione e iposmia (Armstrong e Okun 2020).

1.1.1 Epidemiologia del PD

L'incidenza mondiale del PD è compresa tra 5 e 35 persone su 1 milione di persone ogni anno. Questi valori hanno mostrato un consistente aumento in tutto il mondo negli ultimi 20 anni (Twelves, Perkins, e Counsell 2003), con un impatto elevato in termini sia di morbilità che di mortalità. La mortalità di solito aumenta dopo dieci anni dall'insorgenza della malattia, sebbene l'applicazione di trattamenti sempre più innovativi abbia considerevolmente aumentato l'aspettativa di vita dei pazienti. L'impatto socio-economico del PD è molto elevato anche a causa delle ripercussioni sulla qualità della vita dei *caregivers,* oltre che dei pazienti stessi (Macchi et al. 2020).

La malattia compare generalmente dopo i 50 anni, con una rapida crescita dell'incidenza nelle persone tra i 60 ei 90 anni, mentre il PD ad esordio giovanile coinvolge, invece, individui di età inferiore ai 40 anni.

Nelle femmine, l'incidenza della malattia è dimezzata rispetto ai maschi e l'esordio è più tardivo (Baldereschi et al. 2000), probabilmente grazie a meccanismi di contrasto mediati, ad esempio, da ormoni sessuali o da elementi protettivi sesso-specifici contro fattori ambientali che possono predisporre al PD. Inoltre, la manifestazione clinica della malattia può differire tra maschi e femmine: le donne hanno una maggiore probabilità di manifestare bradicinesia, sintomi motori e non-motori e problemi legati al sistema urinario, mentre gli uomini sono caratterizzati da una maggiore probabilità di manifestare deficit cognitivi (Nicoletti et al. 2017).

1.1.2 Caratteristiche neuropatologiche del PD

Da un punto di vista neuropatologico, le principali caratteristiche del PD sono la perdita dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra* e l'accumulo di α-sinucleina all'interno delle cellule.

La neurodegenerazione dopaminergica, che inizia diversi anni prima della comparsa dei sintomi motori, è responsabile della disfunzione dei meccanismi facilitatori e inibitori nei gangli della base, portando alla manifestazione della bradicinesia (Bloem, Okun, e Klein 2021).

Gli aggregati di α-sinucleina localizzati nel citoplasma dei neuroni prendono il nome di "corpi di Lewy". La formazione dei corpi di Lewy inizia nei neuroni colinergici, monoaminergici e olfattivi nelle fasi iniziali della malattia, raggiungendo i neuroni limbici e neocorticali nelle fasi successive. Secondo il modello di Braak, le inclusioni di α-sinucleina sono presenti nei neuroni colinergici e monoaminergici del tronco encefalico inferiore durante le prime fasi della malattia, con successiva progressione nei neuroni del mesencefalo e del proencefalo basale nei pazienti sintomatici. Negli stadi successivi si diffondono infine al limbico e al neocorticale (Halliday e McCann 2010; Braak et al. 2003).

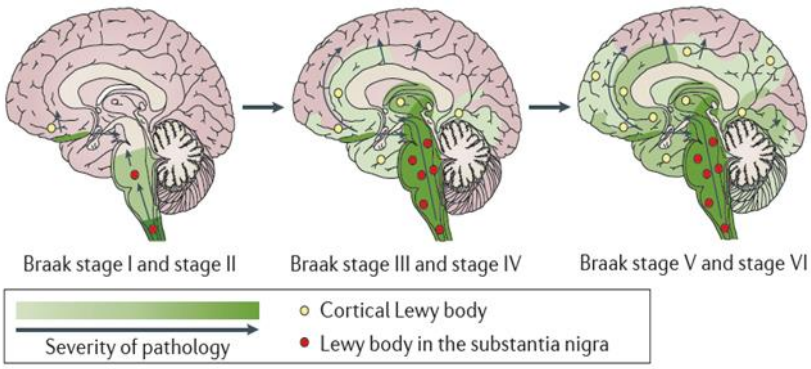


Figura 1.1.2.1: Teoria di Braak sull'aggregazione e la progressione dell'alfa-sinucleina nel PD (Poewe et al. 2017)

1.1.3 Gestione clinica dei pazienti con PD

La diagnosi definitiva del PD è possibile solo *post mortem*, poiché solo in quella fase le caratteristiche neuropatologiche del morbo di Parkinson possono essere rilevate nel cervello. Pertanto nella pratica clinica la diagnosi di PD è tipicamente stabilita sulla base dell'anamnesi, dell'esame neurologico e della valutazione dei sintomi motori (tremore, rigidità e bradicinesia,

disturbi posturali, ecc.) mediante la *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) (Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease 2003).

Da un punto di vista strumentale la diagnosi si avvale di tecniche di imaging, quali la tomografia a emissione di positroni (PET) cerebrale con 18F-DOPA che rileva la perdita di dopamina (Garthwaite e Garthwaite 1983), la tomografia computerizzata ad emissione di fotoni singoli (SPECT) e la risonanza magnetica nucleare (Tolosa, Wenning, e Poewe 2006). Per quanto riguarda gli esami di laboratorio, è invece possibile quantificare l'alfa-sinucleina nel liquido cerebrospinale, ma questa non è considerata un'opzione diagnostica a causa della sua bassa sensibilità e specificità e non sono ad oggi disponibili biomarcatori ematici affidabili. Alcune alterazioni che caratterizzano questo disturbo quali strutture vescicolari specifiche, organelli dismorfici (come i mitocondri dismorfici) e un alto contenuto di lipidi sono state riscontrate anche nella pelle, nel colon e nelle ghiandole salivari, suggerendo che il morbo di Parkinson sia una malattia multisistemica (Chahine et al. 2020). Queste conoscenze aprono la strada nuovi approcci diagnostici, poiché questi tessuti sistemici sono meglio accessibili del tessuto del cervello negli individui in vita.

L'esordio del morbo di Parkinson è preceduto da una lunga fase prodromica, che può durare diversi anni (*Figura 1.1.3.1*). I criteri internazionali per la diagnosi del PD prodromico si basano sulla valutazione di diversi sintomi (Berg et al. 2015) e maggiore è il numero di sintomi prodromici, maggiore è il rischio di sviluppare un parkinsonismo manifesto (Heinzel et al. 2019). Tra i sintomi prodromici, il più importante è la presenza di disturbo comportamentale del sonno REM idiopatico, che è di per sé raro ma piuttosto specifico e può aumentare del 6,3% il rischio di sviluppare parkinsonismo o demenza (Postuma et al. 2019).

La diagnosi di PD può ulteriormente essere complicata dalla presenza di comorbidità, che possono rendere il quadro clinico del paziente meno chiaro (Santiago, Bottero, e Potashkin 2017; Santos García et al. 2017). Una comorbidità comune, ad esempio, è la presenza di lesioni cerebrovascolari concomitanti, visibili all'imaging cerebrale durante i test diagnostici di routine (Ten Harmsen et al. 2018), che possono produrre manifestazioni simili alle lesioni del morbo di Parkinson, come disturbi dell'andatura, declino cognitivo o incontinenza urinaria. L'assenza di progressione e/o il riscontro di un consistente miglioramento dei sintomi dopo la somministrazione di L-dopa (Bloem, Okun, e Klein 2021) esclude una diagnosi di morbo di Parkinson, mentre tassi di progressione insolitamente rapidi, accompagnati da rapida manifestazione di fattori, come cadute o demenza, suggeriscono una diagnosi alternativa (Postuma et al. 2015).

Sulla base del tempo intercorso dalla diagnosi e del trattamento farmacologico, gli individui con PD possono essere classificati come “de-novo”, se nelle prime fasi della malattia e privi di trattatamento con farmaci anti-Parkinson, o “advanced”, se con diagnosi di Parkinson conclamata e in trattamento con L-dopa. La possibilità di includere negli studi soggetti con PD de-novo è di fondamentale importanza per poter osservare i cambiamenti molecolari che caratterizzano il decorso della malattia e poter individuare, quindi, nuovi potenziali target terapeutici su cui agire, potendo escludere eventuali effetti confondenti legati all’assunzione della terapia.

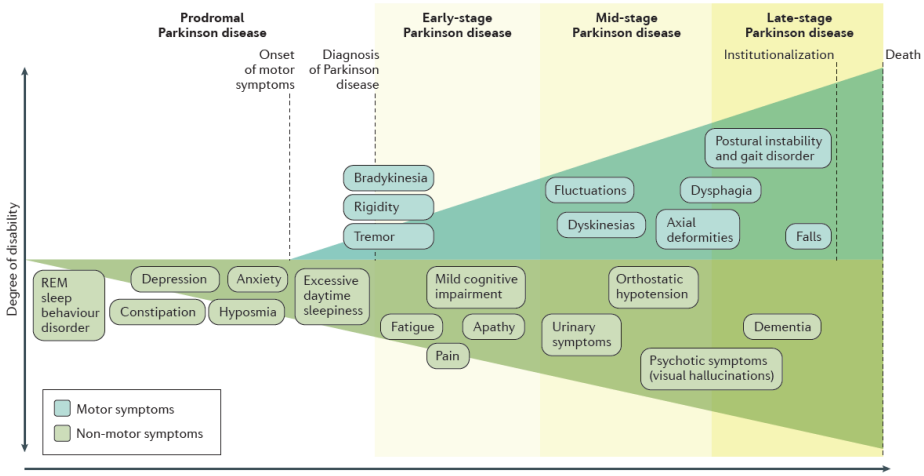


Figura 1.1.3.1: Manifestazioni cliniche del PD correlate con la classificazione dello stadio diagnostico

Il trattamento farmacologico del PD prevede di solito un trattamento combinato basato sulla reintroduzione farmacologica della dopamina (sotto forma dell'amminoacido precursore della dopamina L-dopa) associato a terapie non dopaminergiche, al fine di contrastare sia i sintomi motori che quelli non motori. L'approccio dopaminergico è il più efficace nel contrastare la perdita striatale di dopamina; tuttavia, è fondamentale valutare la tempistica migliore per somministrare la terapia ai pazienti. Infatti, l'uso prolungato di L-dopa può causare effetti collaterali legati alla sua tossicità e alla possibilità di favorire la progressione della malattia, stimolando l'insorgenza di sintomi motori e di bradicinesia (Bloem, Okun, e Klein 2021). Ciò potrebbe essere in parte dovuto alla breve emivita della L-dopa. D’altra parte, è stato dimostrato che la risposta al trattamento è più consistente quando si assume L-dopa nelle prime fasi della malattia. Terapie alternative sono basate su inibitori della catecol-O

metiltransferasi (*COMT*), inibitori della monoaminossidasi di tipo B, agonisti della dopamina, bersagli farmacologici non dopaminergici. Questi approcci sono principalmente focalizzati sul miglioramento dell'efficacia della L-dopa (Poewe e Antonini 2015). I trattamenti non farmacologici includono trattamenti basati sull'esercizio e la stimolazione cerebrale profonda (DBS), una strategia applicata per i pazienti che presentano un peggioramento dei sintomi motori.

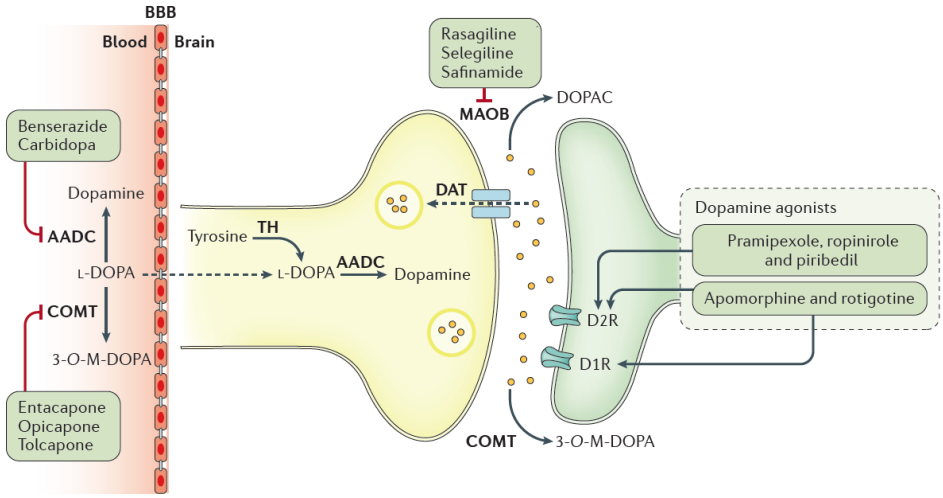


Figura 1.1.3.2: Trattamenti dopaminergici nel PD. Panoramica generale dei principali farmaci dopaminergici correlati alla patologia del PD. Ad esempio, ci sono inibitori delle COMT, inibitori delle monoaminossidasi di tipo B, agonisti della dopamina.

1.1.4 Cause e fattori modificanti

Il PD è un disturbo multifattoriale, in cui fattori genetici e ambientali interagiscono e contribuiscono alla sua insorgenza e progressione (Poewe et al. 2017).

Per quanto riguarda le basi genetiche, il PD presenta sia forme monogeniche che non monogeniche.

Le forme monogeniche sono normalmente di tipo familiare ed associate ad un esordio giovanile della malattia. Esse rappresentano una minoranza di pazienti con PD, ma sono state essenziale per comprenderne la fisiopatologia. I geni coinvolti includono *LRRK2*, *PRKN*, *SNCA*, *PINK1* e *GBA*. Le mutazioni in *LRRK2* rappresentano dal 3 al 40% dei casi familiari di PD ma sono osservabili, con frequenza minore, anche nel PD sporadico. Le mutazioni in *SNCA*, il gene che codifica per l'alfa-sinucleina, includono mutazioni puntiformi e duplicazioni e spesso portano a un esordio precoce, una rapida progressione dei sintomi motori e marcate conseguenze non motorie come declino cognitivo (George et al. 2013). Mutazioni in *PINK1* e *PARKIN* sono principalmente associate a forme autosomiche recessive e sono particolarmente comuni nel PD giovanile (età di insorgenza <20 anni; circa il 77% dei casi) (Kasten et al. 2018). Infine, le mutazioni in *GBA* si trovano nell'8,5% delle persone e sono associate a esordio giovanile, deterioramento cognitivo rapido e decorso grave della malattia. Mutazioni eterozigoti in GBA rappresentano la componente genetica che più predispone al morbo di Parkinson sporadico. Ampi studi di associazione sull'intero genoma hanno identificato diverse decine di polimorfismi in geni come *GCH1*, *ADH1C*, *TBP*, *ATXN2*, *MAPT* e *GLUD2*.

Per quanto riguarda i fattori non genetici, diversi elementi potrebbero contribuire al rischio di PD. Possibili fattori di rischio includono lesioni cerebrali traumatiche o esposizioni ad agenti infettivi. Inoltre, l'infezione da COVID-19 è stata proposta come possibile fattore predisponente per il PD, in virtù di alcune caratteristiche patologiche comuni come l'iposmia, tuttavia questa ipotesi richiede ulteriori indagini nei prossimi anni (Bloem, Okun, e Klein 2021). Anche le esposizioni ambientali, come ad esempio quella alla neurotossina MPTP e ad altre tossine o ad alcuni pesticidi, possono favorire l'insorgenza del PD (Nonnekes et al. 2018).

Parallelamente, esistono anche alcuni fattori protettivi rispetto all'insorgenza del PD, come il fumo, l'attività fisica, il consumo di caffè, farmaci antinfiammatori e livelli elevati di urato plasmatico (Noyce et al. 2012).

1.1.5 Fisiopatologia del PD

I meccanismi patologici del PD includono l'aggregazione dell'α-sinucleina, la compromissione

della funzione dei mitocondri, dei lisosomi, del trasporto vescicolare e sinaptico e la neuroinfiammazione. L'interazione tra questi meccanismi è determinante nell'insorgenza e nella progressione del PD.

Il ruolo fisiologico dell'α-sinucleina non è ancora del tutto chiaro, ma sembra che la proteina sia coinvolta in diversi processi come la regolazione delle vescicole sinaptiche, l'attività mitocondriale e il traffico intracellulare. La disfunzione dell'α-sinucleina è principalmente correlata a un progressivo cambiamento conformazionale. Infatti, vi è una prima aggregazione dei monomeri solubili in oligomeri che, di conseguenza, si organizzano in fibrille. Il processo di accumulo può avere origini diverse, come la sovra-espressione della proteina o la presenza di mutazioni a livello del gene (vedi sopra). L'aggregazione della proteina potrebbe essere dovuta ad una disregolazione del meccanismo di degradazione. Infatti, se il sistema ubiquitina-proteasoma e i processi di macroautofagia non funzionano correttamente, l'intero sistema è compromesso (Kaushik e Cuervo 2015). Infine, un meccanismo di propagazione simile a quello caratteristico dei prioni è un'ipotesi alternativa per spiegare l'accumulo di α-sinucleina. Secondo questo modello, quando l'α-sinucleina si aggrega a livello di un neurone, viene trasportata lungo l'assone e viene rilasciata nello spazio extracellulare in altre aree del cervello. Quindi, successivamente, gli aggregati possono essere raccolti dai neuroni circostanti attraverso l'endocitosi e innescare l'aggregazione di molecole endogene di α-sinucleina (Angot et al. 2010; Brundin, Melki, e Kopito 2010). L'α-sinucleina può anche accumularsi all'interno dei mitocondri, causando un difetto nella funzione del complesso mitocondriale I e determinando un aumento dello stress ossidativo.

È stato anche suggerito che l'interazione tra l'α-sinucleina e il sistema lisosomiale possa contribuire all'insorgenza e alla propagazione della neurodegenerazione. Infatti, se il meccanismo autofagico lisosomiale è danneggiato, la degradazione dell'α-sinucleina sarà compromessa, favorendo l'accumulo della proteina stessa e l'insorgenza del PD.

La neuroinfiammazione svolge un ruolo chiave nella patogenesi del PD. Molti dei polimorfismi associati ad un rischio più elevato di PD mappano in geni coinvolti nei meccanismi immunitari. Esiste un circolo vizioso tra l'aggregazione dell'α-sinucleina, che induce risposte immunitarie adattative e innate, e la neuroinfiammazione, che a sua volta favorisce il misfolding proteico (Ransohoff 2016; Hirsch e Hunot 2009).

Anche la funzionalità mitocondriale è coinvolta nel PD, che è caratterizzato da difetti nella *clearance* dei mitocondri danneggiati. *PINK1* e *PARKIN*, le cui mutazioni sono associate a forme

genetiche di PD (vedi sopra), sono proprio coinvolti nella regolazione mitocondriale (Rakovic et al. 2019).

Infine, un'altra possibile causa dell'insorgenza del PD è una disfunzione a livello dell'apparato gastrointestinale. Una delle principali osservazioni a sostegno di questa ipotesi è che la stitichezza è un sintomo comune del PD e di solito precede i sintomi motori di diversi anni (Postuma et al. 2019). Valutando l'intestino, il cuore, il tronco cerebrale e le proiezioni nigrali attraverso l'imaging, Horsager et al. ha suggerito che esistono due diversi tipi di PD: il primo è definito "*body firs*t", in cui la malattia è innescata da fattori periferici e in cui le disfunzioni intestinali e cardiache precedono la neurodegenerazione; mentre il secondo è definito "*brain first*", in cui il PD inizia nel sistema nigrostriatale, spesso come conseguenza della predisposizione genetica (Horsager, Knudsen, e Sommerauer 2022).

L'esistenza di una correlazione tra infiammazione periferica e neurodegenerazione nel PD è stata dimostrata da differenti studi in cui sono stati effettuati dosaggi di citochine infiammatorie sia su modelli animali sia su pazienti. È stato, infatti, dimostrato che l'induzione dell'attività del TNF-α portata all'attivazione della microglia con successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie: Mogi et al. ha rilevato un aumento delle citochine pro-infiammatorie, come IL-1β e IL-6, nei tessuti post mortem e Dobbs et al. ha riportato lo stesso aumento di citochine e linfociti anche in studi clinici. Inoltre, gli stessi dati sono stati confermati anche da studi sperimentali su modelli animali, attraverso l'iniezione di lipopolisaccaride. Tutti i risultati precedenti indicano un'associazione tra l'attivazione del sistema immunitario periferico e il sistema dopaminergico centrale. Infatti, è stato dimostrato che l'influenza dell'infiammazione sistemica sul SNC che porta alla perdita dopaminergica contribuisce alla patogenesi del PD e alla progressione della malattia (Ferrari e Tarelli 2011).

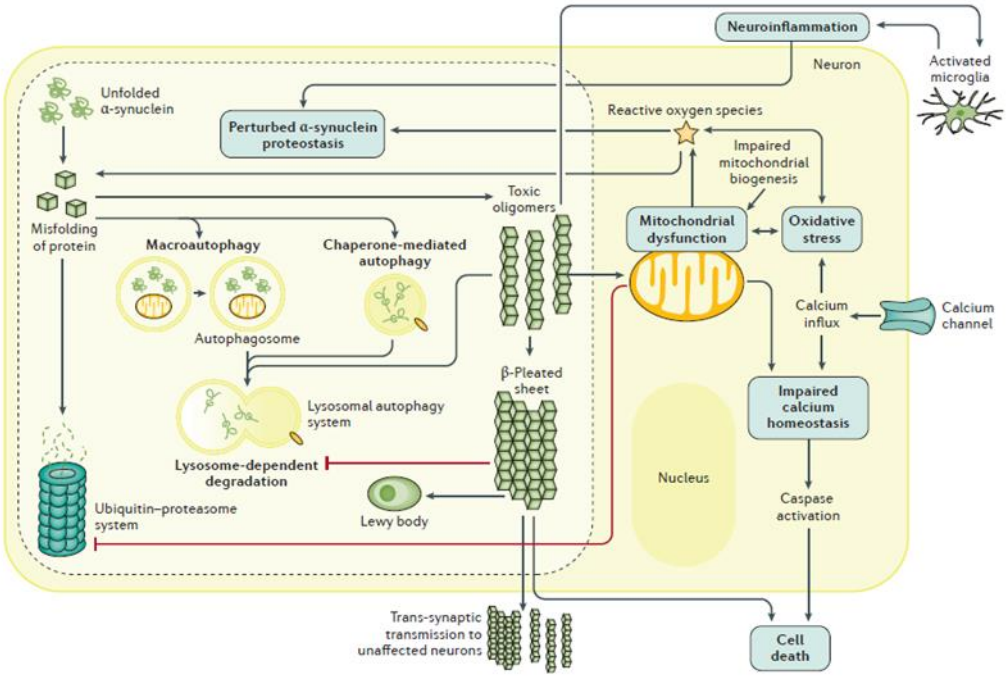


Figura 1.1.5.1: Processi molecolari implicati nella patologia del morbo di Parkinson. Rappresentazione schematica delle principali associazioni tra i diversi processi coinvolti nella biogenesi del PD (Poewe et al. 2017)

In conclusione, sebbene l'eziopatogenesi del PD non sia ancora del tutto chiara, la malattia sembra caratterizzata da un complesso rimodellamento dei profili molecolari e cellulari, sia a livello del sistema nervoso centrale che in periferia.

1.2 Il PD nel framework concettuale della geroscienza

L'età è il principale fattore di rischio per l'insorgenza del PD. L'incidenza di PD aumenta rapidamente dopo i 65 anni e raggiunge il picco nella popolazione con più di 80 anni (Van Den Eeden et al. 2003; Reeve, Simcox, e Turnbull 2014). Nonostante questa evidenza, il rapporto tra invecchiamento e la patogenesi PD è stato scarsamente investigato sia a livello cerebrale che sistemico. Recentemente, è stato creato un nuovo framework concettuale, noto come "Geroscienza" (Kennedy et al. 2014) che mira a sottolineare l'intima connessione tra invecchiamento fisiologico e malattie legate all'età, compresi i disturbi neurodegenerativi come il PD (Claudio Franceschi et al. 2018).

L'invecchiamento è il risultato della combinazione di fattori genetici, ambientali e processi stocastici che contribuiscono, in varia misura, al progressivo e fisiologico deterioramento del

corpo (da Costa et al. 2016). La Geroscienza ha identificato sette processi che sono alla base dell'invecchiamento, denominati "i pilastri dell'invecchiamento": epigenetica, danno macromolecolare, alterazione delle cellule staminali, metabolismo, adattamento allo stress, proteostasi e all'infiammazione (Kennedy et al. 2014).

Questi pilastri definiscono la traiettoria e la qualità dell'invecchiamento fisiologico. In effetti, l'invecchiamento non procede con lo stesso ritmo in tutti gli individui (Khan, Singer, e Vaughan 2017; Lenart e Bienertová-Vašků 2017) e mentre alcuni affrontano con successo un invecchiamento sano, altri vengono affetti da malattie legate all'età. Pertanto, nel contesto della geroscienza, i disturbi legati all'età possono essere ascritti ad un'accelerazione del deterioramento che normalmente colpisce gli organi durante l'invecchiamento (Claudio Franceschi et al. 2018), mentre l'invecchiamento in salute (o di successo) è considerato come un rallentamento di questi processi (C. Franceschi e Bonafè 2003).

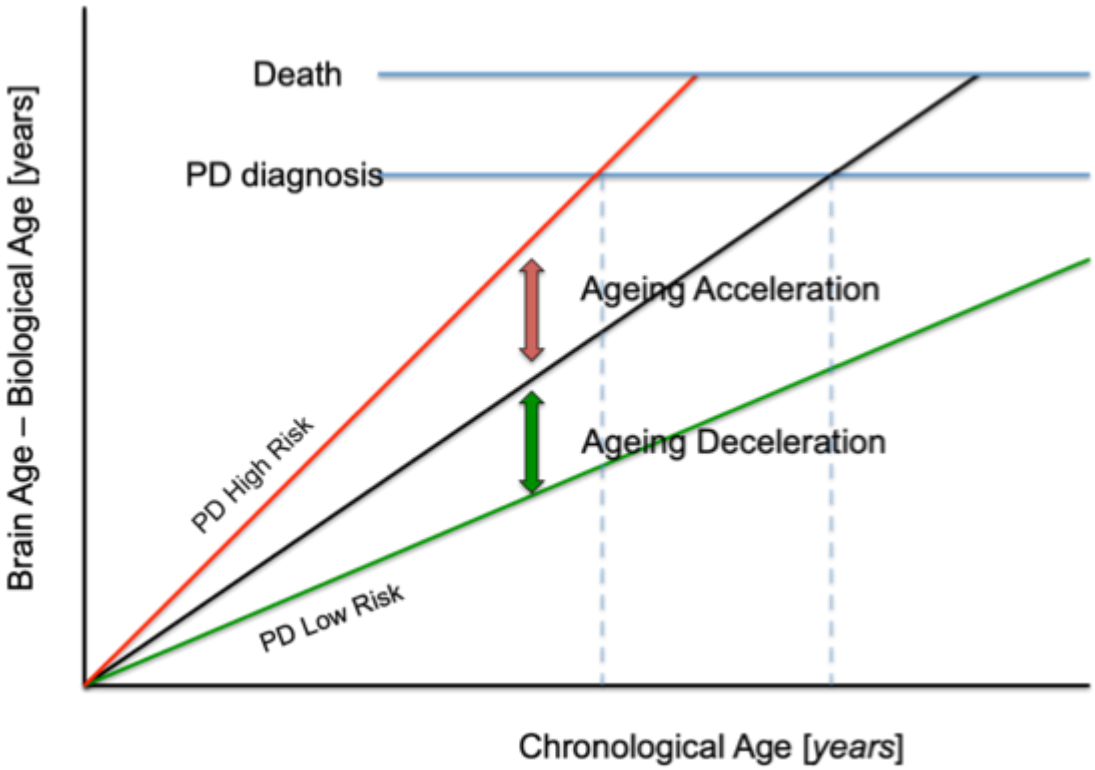


Figura 1.2.1: Il framework concettuale della Geroscienza. L'invecchiamento non procede alla stessa velocità in tutti gli individui. Gli individui con una velocità di invecchiamento più rapida hanno un rischio maggiore di sviluppare precocemente disturbi legati all'età, come il morbo di Parkinson. D'altra parte, le persone con velocità di invecchiamento più lente sono in grado di rimandare a un'età estremamente avanzata o non sviluppare alcuna condizione patologica prima della morte.

Per quanto riguarda il PD, alcuni dati suggeriscono che esso sia legato a un'accelerazione dei

processi molecolari associati al declino fisiologico legato all'età. Nell'uomo, segni di una neurodegenerazione simili a quelli osservati nel PD sono stati infatti evidenziati in soggetti anziani sani (Fig. 1.2.2). In particolare, uno studio eseguito su tessuti cerebrali *post mortem* di 744 soggetti anziani a cui non era stata diagnosticato il PD ha mostrato perdita neuronale di *substantia nigra* o formazione di corpi di Lewy, o entrambi contemporaneamente (Buchman et al. 2012). Inoltre, recentemente è stato riprodotto in un modello animale di primati anziani un accumulo asintomatico di marcatori associati alla perdita di neuroni dopaminergici e aumentati livelli di neuroinfiammazione nella *substantia nigra* (Collier, Kanaan, e Kordower 2017).

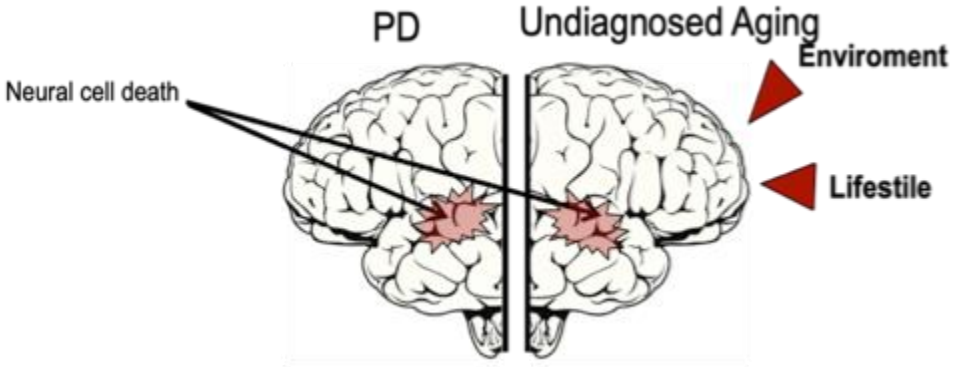


Figura 1.2.2: Prospettiva molecolare del Continuum del deterioramento cerebrale nel morbo di Parkinson e invecchiamento fisiologico. C'è una sovrapposizione di processi molecolari associati al deterioramento del cervello legato all'età che giustifica l'accumulo di marcatori rilevanti per il PD (morte delle cellule neuronali nella substantia nigra locus coeruleus e nella deposizione di α-sinucleina) nel cervello di soggetti anziani sani.

La neuroinfiammazione nel cervello dei soggetti anziani si sovrappone a quella correlata al PD (Pizza et al. 2011). Gli individui anziani sono caratterizzati da progressivo aumento del tono infiammatorio cronico nel cervello (neuro-inflammageing) (Costantini, D'Angelo, e Reale 2018) così come in tutto il corpo (inflammageing) (Claudio Franceschi e Campisi 2014). La neuroinfiammazione aumenta nei soggetti anziani per un abbassamento delle soglie di attivazione della microglia (Cornejo e von Bernhardi 2016; Nikodemova et al. 2016) e degli astrociti (Matias, Morgado, e Gomes 2019; Cerbai et al. 2012). Inoltre, l'accumulo di cellule gliali senescenti nel cervello di pazienti con PD e in soggetti anziani contribuisce alla creazione di un ambiente infiammatorio che è dannoso per la sopravvivenza delle cellule neuronali dopaminergiche (Tchkonia et al. 2013).

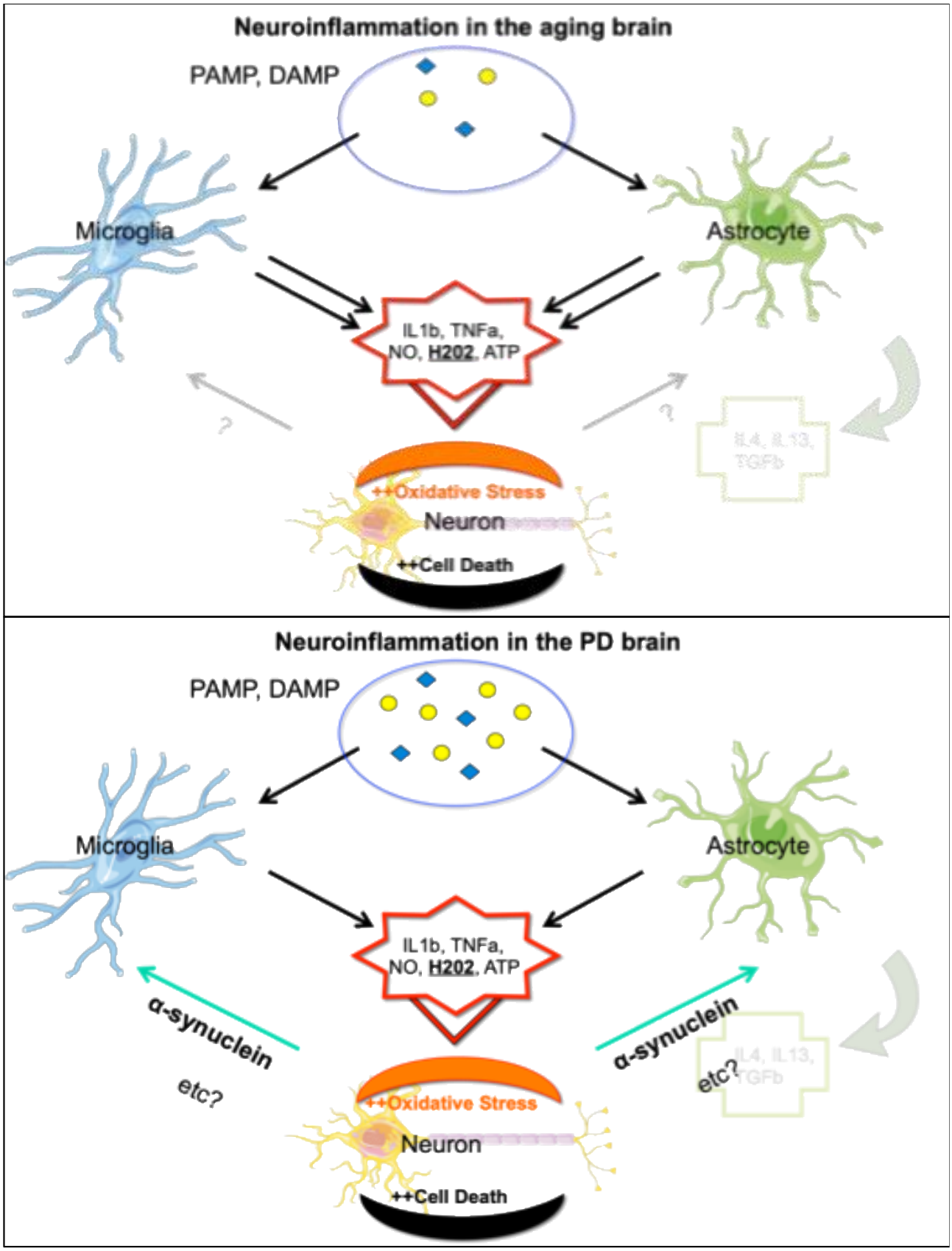


Figura 1.1.6.3: Deterioramento cerebrale nei pazienti con morbo di Parkinson e nei soggetti che invecchiano in buona salute: neuroinflammageing. I processi infiammatori legati all'età e al PD aumentano il tono infiammatorio e la creazione di un ambiente di stress ossidativo che promuove la morte delle cellule neuronali.

1.2.1 Marcatori di età biologica

L'età cronologica è un importante fattore di rischio per malattie croniche e mortalità. Tuttavia, esiste ancora una grande eterogeneità del processo di invecchiamento a livello individuale nelle persone anziane (Lowsky et al. 2014). Alcuni individui appaiono fragili e richiedono assistenza nelle routine quotidiane già attorno ai 70 anni mentre altri rimangono indipendenti dall'assistenza e sembrano sfuggire a gravi deterioramenti fisiologici fino a età molto avanzate. In linea con il tasso di crescita senza precedenti dell'invecchiamento della popolazione mondiale, vi è un chiaro bisogno di una migliore comprensione del processo di invecchiamento biologico e dei determinanti della salute d'invecchiamento. I marcatori di invecchiamento sono definiti come parametri molecolari, fisiologici o funzionali che siano informativi riguardo l'età biologica di un individuo. Con questo termine si intende in maniera generica una misura del declino funzionale (di un tessuto, un organo, un sistema o un organismo) associato all'età, della presenza di patologie correlate all'invecchiamento e del rischio di svilupparne in futuro. In altre parole, un marcatore di invecchiamento è in grado di predire lo sviluppo futuro di condizioni patologiche età-associate in maniera migliore rispetto alla sola età cronologica (Jylhävä, Pedersen, e Hägg 2017). Negli ultimi decenni, sono stati compiuti notevoli sforzi per identificare tali biomarcatori di invecchiamento. Criteri per l'identificazione di tali biomarcatori sono stati formulati dalla Federazione americana per la ricerca sull'invecchiamento (AFAR) come segue (Johnson 2006; Butler et al. 2004):

1. prevedere il tasso di invecchiamento: il biomarcatore deve indicare esattamente dove si trova una persona nella sua durata totale della vita. Deve essere un predittore migliore della durata della vita rispetto all'età cronologica.

2. monitorare un processo che è alla base del processo di invecchiamento, non gli effetti della malattia.

3. poter essere testato ripetutamente senza nuocere alla persona: deve essere valutabile con tecniche non invasive quali un esame del sangue o una tecnica di imaging.

4. essere qualcosa che funziona negli esseri umani e negli animali da laboratorio, come i topi, in modo da poter essere testato su animali da laboratorio prima di essere validato negli esseri umani.

Una profilazione multi-omica (analisi integrale che mette insieme i risultati di diverse tecniche in grado di ottenere un elevatissimo numero di dati su un sistema biologico) condotta su uno stesso individuo potrebbe far luce sul processo di invecchiamento e fornire un'ulteriore

comprensione di ciò che contribuisce a un invecchiamento sano. Finora, il predittore dell'età biologica più promettente è l'orologio epigenetico. Si tratta di orologi basati sul livello di metilazione del DNA (Bocklandt et al. 2011) che sfruttano algoritmi in grado di stimare l'età di una persona a partire dai valori di metilazione del DNA di molti siti CpG nel genoma.

Un altro processo strettamente collegato all'invecchiamento è l'accorciamento dei telomeri, le parti finali dei cromosomi (Vaiserman e Krasnienkov 2020). Infatti, la loro lunghezza è inversamente correlata con l'invecchiamento, come dimostrato da molti studi che negli ultimi anni hanno valutato la relazione fra la loro lunghezza e la lifespan di un organismo. Tuttavia, se è vero che la lunghezza dei telomeri può fornire un'indicazione della salute generale di un individuo, non sembra essere un valido metodo di misurazione dell'età biologica. Un ulteriore tipo di orologio biologico ("trascrittomico") prende in esame il livello di espressione di geni che appaiono collegati al processo di invecchiamento (Holzscheck et al. 2021). Nonostante questo orologio abbia una buona capacità di misurazione dell'età biologica e di predizione del rischio clinico, è di difficile applicazione nella pratica clinica poiché estremamente complesso sia dal punto di vista operativo che interpretativo e viene, quindi, usato solamente nella ricerca sperimentale. Un quarto tipo di orologio si basa sulla valutazione dello stato di glicosilazione delle proteine plasmatiche, che è stato osservato cambiare con l'età e in alcuni casi collegarsi al livello di infiammazione dell'organismo (Dall'Olio et al. 2013). Lo strumento di diagnosi dell'età biologica che è stato sviluppato è stato definito "GlycoAge Test" e analizza la presenza di specifici glicani sulle proteine plasmatiche, in particolare le immunoglobuline (Vanhooren et al. 2008).

1.2.2 GlycoAge Test

La glicosilazione consiste in una serie di reazioni enzimatiche in cui i carboidrati vengono attaccati ad altre molecole (ad esempio, proteine o lipidi) con conseguente formazione di carboidrati complessi e glico-coniugati comunemente indicati come glicani. La glicosilazione proteica è una delle modificazioni secondarie più frequenti (Mariño et al. 2010). L'aggiunta di glicani differenti influenza notevolmente la struttura e la funzione delle glicoproteine e può essere paragonata ai cambiamenti nelle sequenze proteiche (Dalziel et al. 2014). La glicosilazione proteica non si verifica in modo casuale ma che è finemente regolata da enzimi che mediano l'aggiunta covalente di strutture zuccherine al residuo di asparagina in una sequenza consenso. Il processo inizia nel reticolo endoplasmatico dove un oligosaccaride precursore è attaccato alla proteina, seguono una fase di taglio e altre modifiche nel Golgi fino

a quando le proteine sono completamente glicosilate e sono incorporate nella membrana plasmatica o secrete (Vanhooren et al. 2008). La glicosilazione influenza non solo la conformazione nativa della proteina, ma anche proprietà specifiche come la solubilità, l'antigenicità e l'emivita, e la sua localizzazione subcellulare. Ha anche un ruolo nella comunicazione cellula-cellula, nelle vie di segnalazione molecolare intracellulare e in particolare nella modulazione della risposta immunitaria. Con l'invecchiamento è stata osservata un'alterazione del profilo sierico degli N-glicani (ossia dei glicani legati ad un atomo di azoto, contrapposti agli O-glicani, in cui il legame coinvolge un atmo di ossigeno), che è stata validata in studi indipendenti. Il GlycoAge test, definito come il logaritmo del rapporto tra i glicani NGA2F e NA2F, fornisce una valutazione dell'età biologica di un individuo. Variazioni del GlycoAge test, infatti, sono state osservate in persone sane di diversa età (da 20 a 99 anni), dove è stato riportato un aumento di questo parametro a partire dai 40 fino a 99 anni (Vanhooren et al. 2010). Questo risultato è stato validato anche in una coorte di pazienti con demenza e pazienti con sindrome di Cockayne in cui i livelli di GlycoAge test erano più alti rispetto individui sani di pari età (Vanhooren et al. 2010). E' ipotizzabile che una glicosilazione aberrante possa contribuire alla comparsa di diverse patologie umane e, infatti, i cambiamenti nel profilo glicomico del siero individuabili in individui sani e affetti hanno il potenziale per essere utilizzati come biomarcatori per diversi tipi di cancro, come quello epatico (Kamiyama et al. 2013), pancreatico (Nouso et al. 2013), renale (Hatakeyama et al. 2014) e alla prostata (Ishibashi et al. 2014) e per altre malattie, comprese le malattie neurodegenerative (Gizaw et al. 2016). Nell'ambito delle malattie neurodegenerative, è stato recentemente descritto che i topi transgenici della malattia di Huntington mostrano alterazioni significative dei livelli di espressione dei glicani totali (Gizaw et al. 2015). Inoltre, sono stati individuati profili glicomici caratteristici da biopsie cerebrali, siero e CSF di individui affetti da malattia Alzheimer (che si sono, quindi, distinti dai controlli sani) (Gizaw et al. 2016). Inoltre, è stato dimostrato che la glicosilazione proteica è alterata nella malattia neurodegenerativa di Creutzfeldt-Jakob (Silveyra et al. 2006). Nel contesto del PD, sono disponibili risultati promettenti per quanto riguarda l'uso del profilo glicomico sierico o da CSF come biomarcatore della malattia (Russell et al. 2017), come indicatore della stadiazione o per definire trattamenti terapeutici specifici.

1.2.3 Gli orologi epigenetici

Come già detto, gli orologi epigenetici sono algoritmi basati sulla combinazione dei livelli di metilazione del DNA in alcuni specifici siti CpG. Questi orologi sono per lo più derivati da

algoritmi di regressione lineare di metilazione del DNA rispetto all'età cronologica del campione al fine di selezionare una serie di siti CpG. Ad ognuno dei siti CpG individuati viene quindi assegnato un peso. L'età epigenetica è ottenuta sommando i risultati ottenuti moltiplicando tale coefficiente per il livello di metilazione di ciascun sito CpG. Inizialmente, gli orologi epigenetici si sono dimostrati dei validi strumenti per prevedere l'età cronologica ma successivamente si sono rivelati capaci di catturare anche aspetti biologici dell'invecchiamento (età biologica), evidenziando le traiettorie di invecchiamento che si discostano da quelle fisiologiche e che risultano in un'accelerazione (invecchiamento patologico) (Levine et al. 2015; Horvath et al. 2014) o in una decelerazione (invecchiamento di successo e longevità) dell'invecchiamento stesso (Horvath et al. 2015). (Figura 1.2.3.1).

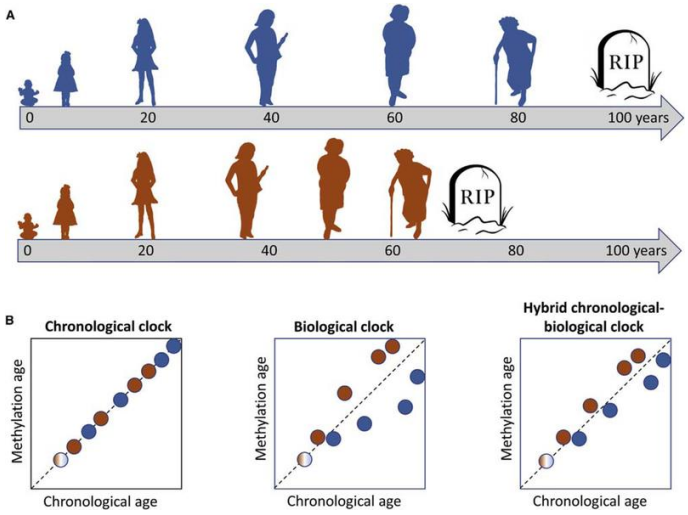


Figura 1.2.3.1: Orologi epigenetici ed età biologica (Field et al. 2018). (A) Due persone, blu e rossa, nate nello stesso momento, condivideranno sempre la stessa età cronologica Tuttavia, l'effetto combinato di fattori genetici, epigenetici e ambientali e di scelte di stile di vita, inducono a velocità diverse il declino funzionale che caratterizza l'invecchiamento biologico. In questa immagine, il rosso invecchia biologicamente più rapidamente del blu. (B) Un orologio cronologico misura il tempo trascorso dalla nascita. Pertanto, non può distinguere tra individui che invecchiano biologicamente velocemente (rosso) o lentamente (blu). Al contrario, un orologio biologico (al centro) può distinguere tra invecchiamento accelerato (rosso) e fisiologico (verde), ma è meno accurato nel determinare l'età cronologica. Un orologio ibrido (a destra) mostra una buona accuratezza nel determinare l'età cronologica, ma permette contestualmente l'individuazione di deviazioni che riflettono l'età biologica. Gli orologi umani calibrati rispetto all'età cronologica sono probabilmente orologi ibridi (ad esempio Hannum e Horvath).

Il primo orologio è stato sviluppato da Horvath ed è un biomarcatore di invecchiamento basato sulla quantificazione della metilazione del DNA di 353 siti CpG, misurata mediante i microarray Infinium (Illumina) nel sangue intero o in altri tessuti (Horvath 2013a). L'orologio

è basato su un algoritmo che restituisce una stima dell'età epigenetica di un individuo. Successivamente, Hannum ha proposto un orologio basato sul livello di metilazione di 71 siti CpG ottenuto da campioni di sangue intero che mostra un'elevata correlazione con l'età e piccole deviazioni dall'età cronologica (Hannum et al. 2013) e lo stesso Horvath ha presentato lo Skin&Blood, sviluppato appositamente per cellule in coltura (Horvath et al. 2018). Più recentemente, biomarcatori basati sulla metilazione del DNA di seconda e terza generazione sono stati appositamente sviluppati per prevedere l'età biologica e il rischio di mortalità (Lu et al. 2019; Levine et al. 2018b; Bell et al. 2019). Particolare attenzione meritano il PhenoAge (che sfrutta un modello basato su 513 siti CpG, non calibrato su età cronologica ma su "età fenotipica", derivata da un insieme di diversi parametri bioclinici come albumina, creatinina o proteina C-reattiva livelli, che è in grado di prevedere meglio la durata della vita in buona salute (Levine et al. 2018b), il GrimAge (basato sulla stima, a partire dai dati di metilazione, del livello plasmatico di 7 proteine quali adrenomedullina, beta-2-microglobulina, cistatina-C, GDF15, leptina, *plasminogen activator inhibitor 1*, *tissue Inhibitor Metalloproteinases 1*, e sul numero di pacchetti di sigarette fumati per ogni anno e che risulta essere fortemente associato alla mortalità) (Lu et al. 2019). Successivamente, risultati interessanti sono stati ottenuto sia con l'orologio proposto da Higgins-Chen (Higgins-Chen et al. 2022), che applica l'analisi delle componenti principali ai 5 orologi sopra menzionati, migliorandone l'affidabilità riducendo al minimo il rumore tecnico, sia con l'orologio DunedinPACE (Belsky et al. 2020), derivato dall'analisi dei dati longitudinali di individui della stessa coorte di nascita, che fornisce informazioni sul tasso di deterioramento correlato all'età. Questi orologi superano di gran lunga la prima generazione per quanto riguarda la loro associazione con la durata della salute e la durata della vita, e l'accelerazione dell'età è costantemente associata alla mortalità per tutte le cause, ai fenotipi clinici legati all'età e alle misure delle prestazioni cognitive (Maddock et al. 2020; McCrory et al. 2021; Duan et al. 2022; Gialluisi et al. 2021). Nel contesto della malattia di Parkinson, l'orologio epigenetico sviluppato da Horvath nel 2013 è stato utilizzato per valutare l'età biologica di una coorte di pazienti affetti da PD che hanno mostrato un'accelerazione dell'età epigenetica rispetto ai controlli sani non affetti. Una delle principali limitazioni di questo studio è la selezione della coorte analizzata che, come in molte altri studi precedenti sulla malattia di Parkinson, includeva pazienti in avanzato stato della malattia e soprattutto in trattamento con i farmaci i dopaminergici (pazienti con PD avanzato, adPD) rendendo, quindi, possibile escludere un ruolo del trattamento farmacologico nell'alterazione dei livelli di metilazione del DNA (Horvath e Ritz 2015).

2 OBIETTIVI

L'obiettivo primario della presente tesi è quello di valutare se l'accelerazione dell'invecchiamento biologico descritta nelle fasi avanzate del PD caratterizzi anche le prime fasi della malattia. A tale fine saranno utilizzati due marcatori di età biologica distinti (gli orologi epigenetici e il GlycoAge Test) che saranno analizzati in campioni di sangue ottenuti da pazienti con PD *de novo*, cioè con una diagnosi recente di malattia e non ancora in trattamento farmacologico, rispetto a controlli sani e a pazienti con PD in fasi più avanzate.

Come obiettivo secondario, i dati di metilazione genome-wide generati per calcolare gli orologi epigenetici saranno utilizzati per identificare le differenze nei profili di metilazione del DNA tra pazienti con PD *de novo* e controlli sani, al fine di identificare potenziali biomarcatori precoci e meccanismi patogenetici della malattia.

3 MATERIALI E METODI

3.1. Coorte analizzata

La coorte analizzata nel presente studio si compone di pazienti con Malattia di Parkinson in fase precoce (de novo PD, dnPD), pazienti con Malattia di Parkinson in fase avanzata (advanced PD, aPD), pazienti con paralisi sopranucleare progressiva (PSP) e controlli sani. I criteri di inclusione per i pazienti dnPD, aPD e PSP sono stati decritti precedentemente (Mollenhauer et al. 2013; Hughes et al. 1992; Collins et al. 1995). I campioni sono stati raccolti in Germania (Prof.ssa Brit Mollenhauer, University Medical Center Goettingen, Department of Neurology and Paracelsus-Elena-Klinik, Kassel, Germany) ed in Italia (Prof. Claudio Franceschi, Università di Bologna) e analizzati nell'ambito del progetto PROPAG-AGEING ("The continuum between healthy ageing and idiopathic Parkinson Disease within a propagation perspective of inflammation and damage: the search for new diagnostic, prognostic and therapeutic targets", H2020, grant number 634821) e del progetto "Inflammaging in the concept of Parkinson's disease" finanziato dalla Michael J. Fox Foundation.

Tutti gli studi sono stati approvati da comitati etici locali: il comitato etico del Physician's Board Hesse, Germany (Approval No. FF89/2008 for DeNoPa), quello dell'University Medical Center Goettingen, Germany (Approval No. 9/7/04 e 36/7/02 per la coorte di Kassel), quello di Area Vasta Emilia Centro (79/2015/U/Tess del 15/09/2015) e quello Interaziendale Bologna-Imola (Prot.N.516/CE).

Le caratteristiche demografiche dei campioni utilizzati per l'analisi glicomica, l'analisi della metilazione genome-wide e l'analisi della metilazione gene-targeted sono riportate rispettivamente in Tabella 3.1.1, Tabella 3.1.2 e Tabella 3.1.3.

Gruppo	N	Nazionalità	Sesso	Età media ± SD (range)
HC	94	Ger	36 F, 58 M	64.6 ± 6.8 (44-84)
dnPD	114	Ger	41 F, 73 M	63.6 ± 9.5 (40-84)
aPD	57	Ger	21 F, 36 M	69.8 ± 9.1 (39-87)

Tabella 3.1.1. Campioni analizzati per l'analisi glicomica.

Gruppo	N	Nazionalità	Sesso	Età media ± SD (range)
HC	186	Ita (120) + Ger (66)	99 F, 87 M	66.5 ± 15.1 (25-98)
dnPD	88	Ita (6) + Ger (82)	32 F, 56 M	65.1 ± 9.7 (40-84)
aPD	54	Ita (27) + Ger (27)	20 F, 34 M	65.2 ± 8.2 (43-81)

Tabella 3.1.2. Campioni analizzati per l'analisi di metilazione genome-wide.

Gruppo	N	Nazionalità	Sesso	Età media ± SD (range)
HC	92	Ita + Ger	35 F, 56 M	64.5 ± 6.9 (44-84)
dnPD	106	Ita + Ger	38 F, 67 M	63.6 ± 9.5 (40-84)
aPD	55	Ita + Ger	20 F, 35 M	69.1 ± 9.2 (39-87)

Tabella 3.1.3. Campioni analizzati per l'analisi di metilazione gene-targeted.

3.2 Analisi degli N-glicani

Il pool proteico totale presente in 2 ul di plasma viene incubato con 2 ul di acqua MilliQ (MQ) e 2 ul di tampone denaturante (5% SDS in 10 mM NH4HCO3) in una piastra da 96 pozzetti, per la denaturazione delle proteine. La piastra viene incubata per 5 min a 95 °C e poi raffreddata per 15 min a 4°C. Gli N-glicani sono scissi mediante digestione enzimatica con 3 µl di una miscela di rilascio contenente 3,33% Nonidet P-40 (NP-40) e 6,6 unità di peptide-Nglicosidasi F ricombinante (PNGase F) (New England Biolabs) in tampone denaturante e incubazione per 3 h a 37 ° C. La reazione viene bloccata aggiungendo 100 µl di acqua.

Gli N-glicani plasmatici rilasciati sono quindi derivatizzati con il fluoroforo 8-acido ammino-1,3,6-pirenetrisolfonico (APTS). Una quota (6 ul) di miscela di N-glicani rilasciata viene essiccata completamente in una nuova piastra, a 60 °C per 1 h. Al pellet essiccato vengono aggiunti 2 µl di tampone di marcatura APTS, costituito mediante una miscela 1:1 di APTS 20 mM in acido citrico 1,2 M e NaCNBH3 1M in Dimetilsolfossido (DMSO). La reazione di marcatura è seguita da un'incubazione a 37 °C per una notte, sigillando la piastra per evitare l'evaporazione, e poi fermata aggiungendo 200 µl di acqua per pozzetto.

Poiché la maggior parte dei glicani del plasma/siero termina con gli acidi sialici, che contengono cariche negative, la loro rimozione, prima della corsa elettroforetica, rende più chiara la profilazione finale. In questa fase, gli N-glicani sono desialilati aggiungendo in 2 µl di zuccheri marcati APTS, 0,25 µl 100 mM NH4AC, 0,2 µl neuraminidasi di Arthrobacter ureafaciens (Roche) e 2,55 µl di acqua, con un'incubazione notturna a 37°C. La reazione di

desialilazione è quindi interrotta aggiungendo 160 µl di acqua in ogni pozzetto.

10 µl di glicani marcati con APTS e digeriti sono quindi analizzati usando un Sequenziatore di DNA capillare ABI 3130 basato su elettroforesi (CE) (Applied Biosystem) dotato di un capillare standard da 36 cm riempito con il POP-7 polimero lineare di poliacrilammide. I dati vengono elaborati con il GeneMapper software (Applied Biosystem). I livelli degli N-glicani misurati sono quantificati calcolando l'area sottostante il picco ottenuto dall'elettroferogramma.

3.3 Estrazione del DNA da sangue intero

L'estrazione del DNA è stata eseguita con il mini kit QiAmp Blood DNA (QIAGEN), secondo le istruzioni del produttore come segue:

1. Dispensare 20 ul di Qiagen proteasi (o proteinasi K) in un tubo da 1,5 ml

2. Aggiungere 200 ul di campione di sangue alla precedente provetta da 1,5 ml già contenente proteinasi K

3. Aggiungere il tampone AL e vortexare per 15 secondi

4. Incubare nel termo blocco a 56°C per 10 minuti

5. Centrifugare brevemente per rimuovere le gocce dal tappo

6. Aggiungere 200 ul di etanolo (96-100%) a ciascun campione e vortexare per 15 secondi

Centrifugare brevemente per eliminare le gocce dal tappo

7. Trasferire il campione nella colonna QIAmp Mini, che si trova all'interno del tubo di raccolta da 2 ml. Chiudere il tappo della provetta e centrifugare a 6000 g per 1 minuto. Al termine della centrifugazione del campione, eliminare il composto filtrato all'interno del tubo di raccolta ed eliminare il tubo di raccolta.

8. Inserire la colonna QIAmp Mini in una nuova provetta di raccolta da 2 ml e aggiungere 500 ul di tampone AW1. Centrifugare nuovamente a 6000g per 1 minuto.

9. Aprire la colonna QIAamp Mini e aggiungere 500 µl di tampone AW2 e centrifugare alla massima velocità (16000 g) per 5 minuti. Al termine della centrifugazione, rimuovere il tubo di raccolta insieme al composto filtrato

10. Inserire la colonnina QIAmp Mini all'interno di una nuova provetta di raccolta da 2 ml e centrifugare nuovamente per 1 minuto per rimuovere tutti i possibili residui derivanti dal tampone AW2.

11. Inserire la colonna spin in una nuova provetta da 1,5 ml, aggiungere 100 ul di tampone AE; incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Centrifugare a 6000g per 1 minuto per eluire il DNA (1a eluizione)

12. Mettere la colonnina in una nuova provetta da 1,5 ml, aggiungere 50 ul di tampone AE e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Centrifugare a 6000g per 1 minuto per eluire il restante DNA (2a eluizione).

3.4 Quantificazione del DNA

I campioni sono stati quantificati utilizzando il kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher), utilizzando 2 ul di DNA e 198 ul di soluzione di lavoro Qubit, preparata secondo le istruzioni del produttore.

3.5 Conversione del DNA tramite bisulfito

La conversione tramite bisulfito consiste in un trattamento che converte le citosine non metilate in uracili. La conversione con bisolfito è stata eseguita su 500 ng di DNA genomico tramite il kit di metilazione del DNA EZ (ZymoResearch), secondo le istruzioni del produttore come segue:

1. Preparare il reagente di conversione CT: aggiungere 750 µl di acqua e 210 µl di tampone di diluizione M a una provetta del reagente di conversione CT, agitare a temperatura ambiente su vortex per 10 minuti

2. Preparare il tampone M-Wash: aggiungere la quantità richiesta di etanolo al 100% alla soluzione M-Washing

3. Aggiungere 5 µl di tampone di diluizione M al campione di DNA (DNA totale: 500 ng, aggiungere acqua per raggiungere il volume finale di 50 µl se necessario) e miscelare il campione

4. Incubare il campione a 37°C per 15 minuti

5. Aggiungere 100 µl del reagente di conversione CT preparato a ciascun campione e miscelare

6. Inserire le provette PCR nel termociclatore e impostare il programma:

a. 95°C per 30''

b. 50°C per 15 minuti (21 cicli delle fasi a e b)

c. 4°C∞

7. Aggiungere 400 µl di tampone M-Binding alla colonna Zymo-Spin IC e inserire la colonna in un tubo di raccolta

8. Caricare il campione (vedere il passaggio 2) nella colonna Zymo-Spin IC contenente il tampone M-Binding

9. Mescolare e risospendere il campione

10. Centrifugare alla massima velocità (16000g) per 30 secondi. Scartare l'eluato

11. Aggiungere 100 ul di M-Wash Buffer alla colonna. Centrifugare a 16000g per 30 secondi

12. Aggiungere 200 ul di tampone di desolfonazione M alla colonna e lasciare a temperatura ambiente per 15-20 minuti. Dopo l'incubazione, centrifugare a 16000 g per 30 secondi

13. Aggiungere 200 ul di soluzione tampone M-Wash alla colonna. Centrifugare a 16000g per 30 secondi.

Aggiungere nuovamente 200 ul di M-Wash Buffer e centrifugare a 16000 g per 30 secondi

14. Posizionare la colonna in una nuova provetta da 1,5 ml. Aggiungere 100 ul di acqua distillata direttamente alla matrice della colonna. Centrifugare per 30 secondi a 16000 g per eluire il DNA.

3.6 Analisi della metilazione del DNA genome-wide

La metilazione del DNA genome-wide è stata eseguita utilizzando il microarray HumanMethylationEPIC BeadChip (Illumina), che consente di valutare più di 850000 siti CpG sparsi nel genoma. Mille ng di DNA convertito con bisolfito sono stati utilizzati come input e processati secondo le istruzioni del produttore, randomizzando i campioni nelle slide utilizzate. I campioni sono stati analizzati in 3 sedute sperimentali (batch). I dati grezzi in formato .idat sono stati estratti utilizzando il pacchetto di Bioconductor *minfi* (Aryee et al. 2014) e normalizzati utilizzando la funzione *preprocessFunnorm*. L'algoritmo ComBat implementato nel pacchetto di Bioconductor SVA è stato utilizzato per correggere la presenza di bacth effects.

3.7 Analisi della metilazione del DNA di sequenze genomiche target

La metilazione del DNA delle regioni genomiche selezionate sulla base dei risultati dell'analisi genome-wide è stata valutata utilizzando un approccio *di targeted bisulfite sequencing* su piattaforma Illumina (MiSeq).

I primer utilizzati per amplificare le regioni bersaglio su DNA genomico convertito con

bisolfito sono stati disegnati utilizzando il software MethPrimer 2.0 (http://www.urogene.org/methprimer2/), impostando una lunghezza massima dell'amplicone di 250 bp.

La Tabella 3.7.1 riporta le sequenze dei primer e la regione genomica amplificata per ciascuna regione target.

Regione target	**Posizione in GRCh37/hg19**	**Lunghezza**	**Primer**	**Sequenza**
PDE4D	chr5:59,559,089-59,559,325	237	Forward	TGTTTGGTTGGAAATTAAGA
			Reverse	TCTCCCACTACTACTAAAAACAATAATTC
cg24473594	chr19:46,714,751-46,714,999	249	Forward	TATGGGTGAGAGGTTAGGAGAT
			Reverse	AAAAAAAATTCCTTCTATTTTTTCCT
cg25566285	chr7:158,114,488-158,114,724	237	Forward	TAGGGAAGATAGAGGGAGAAGGTA
			Reverse	TATATARGTATCAATCCTTATACAAAAACA
cg03991297	chr16:30,429,722-30,429,970	249	Forward	TTYGATTTGGTTGTATTAATTTAGG
			Reverse	AAAACCCCAACTTTCTTCCTCT
cg26033520	chr10:74,003,862-74,004,113	252	Forward	GGTTTAGAGTTTAGAAGGAAGGTT
			Reverse	AACCAAAAATCCCAACTTACACA
SNCA		234	Forward	GGGGTGTGGTTTAAATTTAGGTAA
			Reverse	AAAATACAAAAAAACCAAATCAACAA

Tabella 3.7.1. Caratteristiche della regione genomica amplificata da ciascuna coppia di primer.

Le sequenze dell'adattatore Illumina sono state aggiunte ai primer forward e reverse (forward primer: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGN; reverse primer: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG).

La preparazione delle librerie per l'analisi della metilazione delle regioni target mediante next-generation sequencing è stata eseguita utilizzando il procedimento precedentemente descritto (Morandi et al. 2017), che si basa sui seguenti passaggi:

a) Amplificazione delle regioni target mediante PCR su DNA genomico convertito con bisolfito. La reazione di PCR è stata condotta in un volume di 5ul utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: 0.08 U di Phusion U Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher), Buffer 1X, dNTPs 200 uM, betaina 1M, MgCl2 1 mM, 150 nM di ciascun primer e 1 ul di DNA. La miscela è stata incubata nel termociclatore utilizzando il programma riportato in Tabella 3.7.2 ed i prodotti di amplificazione sono stati controllati su gel di agarosio al 2%.

Numero di cicli	Temperatura	Durata
1	95 °C	1’ 40’’
1	98 °C	1’
1	58 °C	2’
1	72 °C	1’
36	98 °C	10’’
	58 °C	40’’
	72 °C	20’’
1	72 °C	5’
1	4 °C	hold

Tabella 3.7.2. Ciclo termico utilizzato per la reazione di amplificazione nel targeted bisulfite sequencing

b) Pool di tutti i prodotti di PCR relativi allo stesso campione: i prodotti PCR sono stati raggruppati in modo da avere per ciascun campione una miscela unica degli amplificati di tutte le regioni target.

c) Purificazione dei prodotti di PCR tramite biglie magnetiche. Questo passaggio è stato eseguito per rimuovere i primer non incorporati nella reazione di amplificazione e i dimeri di primer. A tal fine, sono state utilizzate le biglie magnetiche MagSi-NGS Prep Plus (Euroclone) a una concentrazione di 0,9 X, secondo le istruzioni del produttore:

- Vortexare le sfere per 30'' per ottenere una dispersione uniforme
- Aggiungere [0.9*PCR_Volume] di microsfere a ciascun campione e miscelare bene pipettando
- Incubare a temperatura ambiente per 5'
- Posizionare la piastra su un supporto magnetico per 2'

Con la piastra sul supporto magnetico:

- Rimuovere il surnatante
- Lavare le biglie per 30'' con 200ul 80% di etanolo fresco
- Lavare le biglie per 30'' con 200ul 80% di etanolo fresco
- Rimuovere l'etanolo rimanente e lasciare asciugare le sfere a temperatura ambiente per 15'

• Rimuovere la piastra dal supporto magnetico e aggiungere 52ul Tris-EDTA 0.1X e risospendere bene pipettando

• Incubare a temperatura ambiente per 5'

• Posizionare la piastra sul supporto magnetico per 2'

• Trasferire 50 ul di surnatante in una nuova piastra etichettata.

• Conservare a +4°C

d) Indicizzazione: gli index Nextera XT v2 Index A e Nextera XT v2 Index D sono stati utilizzati per indicizzare in maniera univoca ciascun pool di amplificati corrispondente ad un campione. La reazione di indicizzazione è stata eseguita in 50 ul utilizzando le seguenti condizioni: 5 ul di indice N7, 5 ul di indice S5, 25 ul di KAPA HiFi HotStart 2X, 10 ul di DNA precedentemente purificaot, 5 ul di H2O. La miscela è stata incubata nel termociclatore utilizzando il programma riportato in Tabella 3.7.3.

Numero di cicli	**Temperatura**	**Durata**
1	95 °C	3’
8	95 °C	30’’
	63 °C	30’’
	72 °C	3’
1	72 °C	2’
1	4 °C	hold

Tabella 3.7.3. Ciclo termico utilizzato per la reazione di indicizzazione nel targeted bisulfite sequencing

f) Purificazione dei prodotti indicizzati mediante biglie magnetiche: la purificazione è stata eseguita come precedentemente descritto ma utilizzando una concentrazione di biglie 0,8X e risospondendo il DNA in H2O.

g) Quantificazione e normalizzazione: le librerie sono state quantificati utilizzando il kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher), utilizzando 2 ul di DNA e 198 ul di soluzione di lavoro Qubit, preparata secondo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni in ng/µl sono state convertite in concentrazioni in nM considerando una lunghezza media della libreria di 400 bp. I campioni sono stati normalizzati a 8nM.

h) Pool dei campioni e quantificazione: 5 µl di libreria di ciascun campione sono stati quindi miscelati. La concentrazione del pool è stata misurata utilizzando il kit Qubit™ dsDNA HS Assay

(Thermo Fisher) e il pool è stato diluito a una concentrazione finale di 4 nM.

i) Sequenziamento su piattaforma MiSeq: la libreria è stata denaturata e diluita a 6 pM secondo le linee guida del produttore. La libreria è stata quindi sequenziata mediante il kit MiSeq Reagent Kit v2 Micro 300PE, utilizzando una concentrazione della libreria di controllo PhiX pari al 5%. I 276 campioni analizzati nella presente tesi sono stati analizzati in 2 esperimenti separati, randomizzando i gruppi sperimentali nelle 2 sedute, al fine di garantire una profondità di lettura teorica di circa 2000X. Il demultiplexing è stato esegutio automaticamente dalla piattaforma MiSeq, che restituisce i dati grezzi in formato *.fastq*.

3.8 Analisi bioinformatica e statistica

L'analisi degli orologi epigenetici è stata eseguita a partire dai dati di metilazione genome-wide utilzzando il tool online https://dnamage.genetics.ucla.edu/ (Horvath 2013b) e lo script allegato alla pubblicazione di Higgins-Chen (Higgins-Chen et al. 2022). Per ciascun predittore di età biologica, è stata calcolata la regressione lineare tra età epigenetica e età cronologica nei HC, considerando solo i soggetti tra 20 e 85 anni. Per ciascun campione è stata quandi calcolata l'accelerazione dell'età epigenetica (epigenetic age acceleration, EEA) come il residuo tra l'età epigenetica ottenuta sperimentalmente e quella calcolata sulla base della retta di regressione. I valori di EEA sono quindi stati confrontati tra i gruppi di interesse mediante analisi della varianza (test ANOVA), corereggendo per sesso, batch sperimentale e provenienza geografica dei campioni (Italia o Germania).

Le conte cellulari del sangue sono state stimate a partire dai dati di metilazione genome-wide utilzzando il tool online https://dnamage.genetics.ucla.edu/ e confrontate tra i gruppi di interesse mediante analisi della varianza (test ANOVA), corereggendo per sesso, batch sperimentale e provenienza geografica dei campioni (Italia o Germania).

I dati di metilazione del DNA genome-wide sono stati analizzati per identificare le posizioni differentemente metilate tra i dnPD e i HC utilizzando una pipeline di analisi statistica precedentemente messa a punto dal nostro gruppo. In breve, sono state rimosse le sonde sui cromosomi X e Y, le sonde aventi un detection p-value >0.05 in più dell' 1% dei campioni e le sonde non ritenute affidabili sulla base dei dati disponibili in letteratura (Zhou, Laird, e Shen 2017), restitudindo 805802 sonde. I valori di metilazione, espressi come beta-value, sono stati convertiti in M-value (trasformazione logit) e confrontati tra i dnPD e i HC utilzzando un approccio empirico bayesiano implementato nel pacchetto di Bioconductor *limma*,

correggendo per seduta sperimentale, sesso, età e conte cellulari del sangue stimate. Il pacchetto di Bioconductor *bacon* è stato quindi utilizzato per rimuovere possibili bias nella distribuzione dei p-value, che sono stati quindi corretti per test multipli mediante procedura di Benjamini-Hochberg.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati di *target bisulfite sequencing*, i file grezzi in formato .fastq sono stati prima di tutto valutati per la qualità delle reads di sequenziamento mediante il tool *fastQC* (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Il tool *Cutadapt* (https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/) è stato utilizzato per rimuovere le sequenze degli adattatori Illumina dalle reads, mentre il tool *Pear* (https://cme.h-its.org/exelixis/web/software/pear/) è stato utilizzare per appaiare la read 1 e la read 2 derivanti dal sequenziamento paired-end. Il tool Seqtk (https://github.com/lh3/seqtk) è stato utilizzato per convertire i dati dal formato *.fastq* al formato *.fasta*, che è stato utilizzato come input del tool *AmplimethProfiler* (Scala et al. 2016) che permette di calcolare la profondità di lettura della regione genomica target e il valore di metilazione di ciascun sito CpG contenuto nella regione stessa. I campioni con una profondità di lettura inferiore a 200X sono stati esclusi dalle analisi. Per confrontare i diversi gruppi di pazienti è stata applicata l'analisi della varianza (test ANOVA), correggendo per sesso, età e seduta sperimentale.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando la piattaforma R (versione 3.6.3).

4 RISULTATI

4.1 Stima dell'età biologica mediante marcatori epigenetici

I dati di metilazione del DNA genome-wide sono stati utilizzati per calcolare vari tipi di predittori di età epigenetica. In particolare, sono stati calcolati: 1) orologi epigenetici di prima generazione (Horvath, Intrinsic, Extrinsic, Hannum, Skin&Blood), in cui i siti CpG che compongono il predittore sono stati selezionati sulla base della loro associazione con l'età; 2) orologi epigenetici di seconda generazione (PhenoAge, GrimAge), in cui i siti CpG che compongono il predittore sono stati selezionati sulla base della loro associazione con misure surrogate di età biologica; 3) gli orologi recentemente proposti da Higgins-Chen et al. (Higgins-Chen et al. 2022), basati sul calcolo delle componenti principali (Principal Components, PC) dei siti CpG che costituiscono gli orologi epigenetici descritti al punto 1) e 2); questo approccio consente di aumentare l'affidabilità degli orologi epigenetici classici, riducendo i bias sperimentali. Le caratteristiche di ciascun orologio epigenetico sono riassunte nella Tabella 4.1.1.

Nome	**Descrizione**	**Ref**
Horvath	È calibrato sulla maggior parte dei tessuti umani.	(Horvath 2013b)
Intrinsic	È derivato dall'orologio di Horvath, correggendo per possibili differenze nelle conte cellulari.	(Horvath et al. 2015)
Extrinsic	È derivato dall'orologio di Hannum ed è informativo del processo di immunosenescenza.	(Horvath et al. 2015)
Hannum	È specifico per cellule del sangue.	(Hannum et al. 2013)
Skin&Blood	È specifico per cellule del sangue e colture primarie di fibroblasti.	(Horvath et al. 2018)
PhenoAge	Include siti CpG selezionati per la loro associazione con misure cliniche di età biologica, come i livelli di CRP, il BMI, la pressione sistolica, etc.	(Levine et al. 2018a)
GrimAge	Include siti CpG selezionati per la loro associazione con i livelli plasmatici di 7 proteine e con il numero di sigarette; è associato alla mortalità.	(Lu et al. 2019)
PC-Horvath	È basato sul calcolo delle PC sui siti CpG inclusi nell'orologio di Horvath	(Higgins-Chen et al. 2022)
PC-Hannum	È basato sul calcolo delle PC sui siti CpG inclusi nell'orologio di Hannum	(Higgins-Chen et al. 2022)
PC-Horvath2	È basato sul calcolo delle PC sui siti CpG inclusi nell'orologio Skin&Blood	(Higgins-Chen et al. 2022)
PC-PhenoAge	È basato sul calcolo delle PC sui siti CpG inclusi nell'orologio PhenoAge	(Higgins-Chen et al. 2022)
PC-GrimAge	È basato sul calcolo delle PC sui siti CpG inclusi nell'orologio GrimAge	(Higgins-Chen et al. 2022)

Tabella 4.1.1. Descrizione degli orologi epigenetici analizzati

Per ciascun orologio sono stati calcolati i valori di *epigenetic age acceleration* (EAA) dei campioni analizzati (Materiali e metodi; Tabella 4.1.2): valori positivi di EAA indicano

un'accelerazione dell'età epigenetica (in altre parole, un soggetto epigeneticamente più vecchio rispetto alla sua età cronologica), mentre valori negativi di EAA indicano una decelerazione dell'età epigenetica (in altre parole, un soggetto epigeneticamente più giovane). I valori di età epigenetica e di EAA risultanti da ciascun orologio sono riportati in Figura 4.1.1 (orologi di prima e seconda generazione) e in Figura 4.1.2 (orologi basati sulle PC). La Tabella 4.1.2 riporta invece per ciascun orologio i risultati dell'analisi statistica volta a confrontare i valori di EAA dei pazienti dnPD e aPD rispetto ai HC (analisi della varianza ANOVA correggendo per sesso, batch sperimentale e provenienza geografica dei campioni.

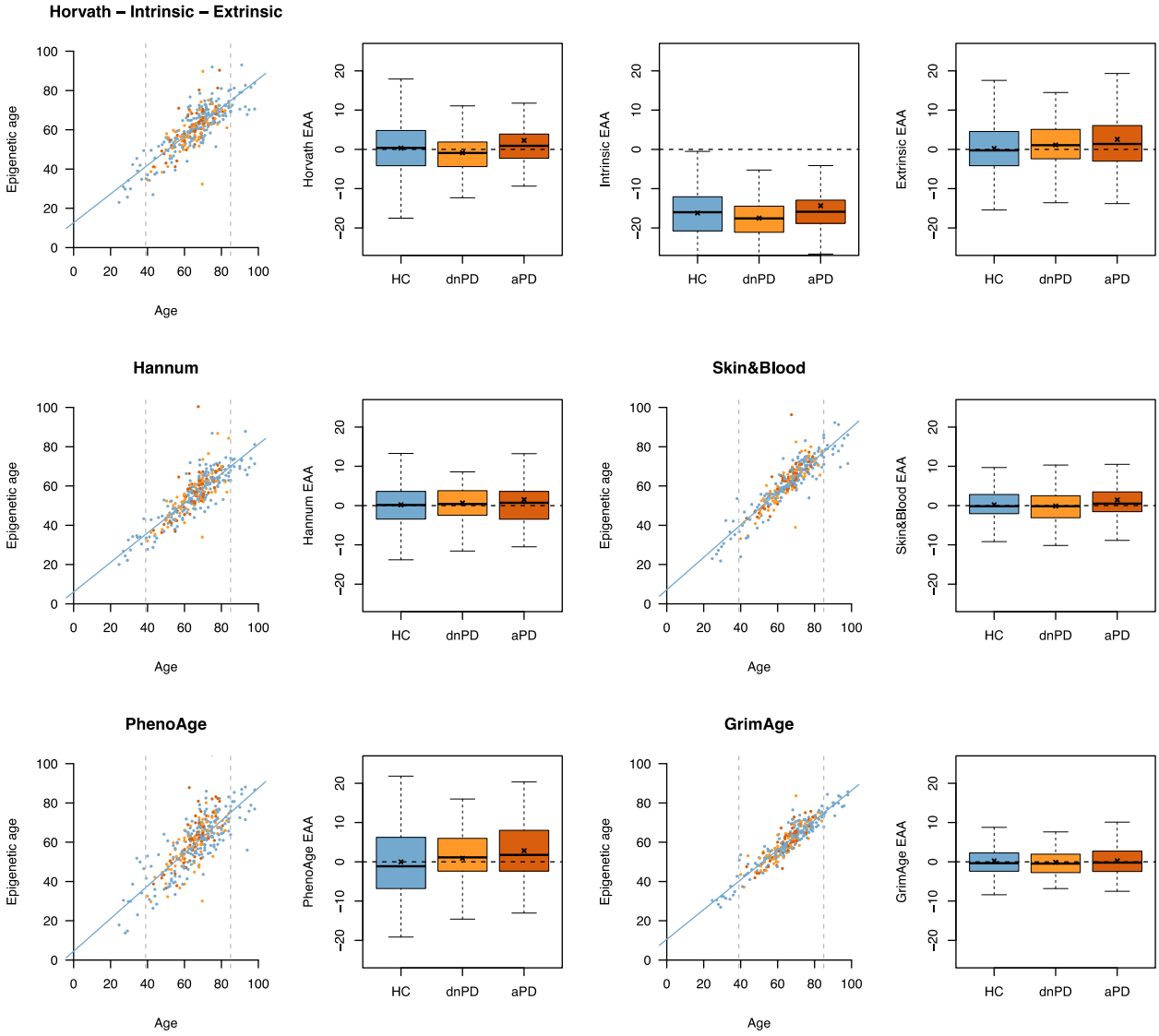


Figura 4.1.1. Risultati della stima dell'età epigenetica nei campioni HC, dnPD e aPD, derivanti dagli orologi epigenetici di prima e seconda generazione. Per ciascun orologio sono riportati uno scatter plot dell'età epigenetica rispetto all'età cronologica (espresse in anni) e una rappresentazione tramite boxplots dei valori di EAA (espressi in anni) nei 3 gruppi considerati. Negli scatter plot la regressione tra età epigenetica e cronologica è rappresentata da una linea blu, mentre le linee tratteggiate delimitano l'intervallo di età utilizzato per calcolare la

regressione. Nei boxplot, la croce rappresenta la media dei valori di EAA in ciascun gruppo. In entrambi i tipi di rappresentazione, i HC sono rappresentati in azzurro, i dnPD in arancione e i aPD in marroncino. Poiché gli orologi Intrinsic e Extrinsic sono derivati dagli orologi epigenetici di Horvath e Hannum, lo scatter plot è omesso.

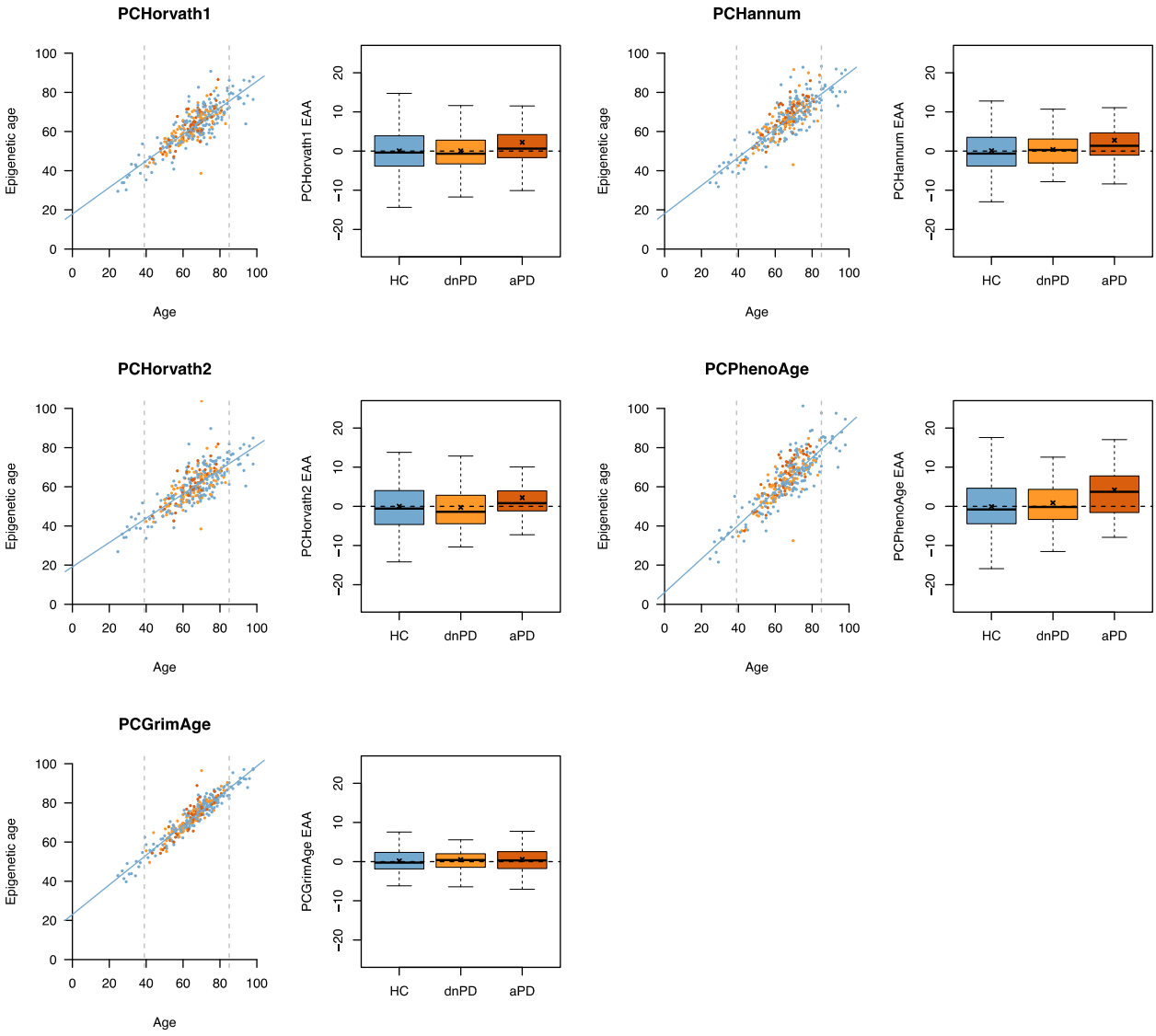


Figura 4.1.2. Risultati della stima dell'età epigenetica nei campioni HC, dnPD e aPD, derivanti dagli orologi epigenetici di basati sulle PC. Per ciascun orologio sono riportati uno scatter plot dell'età epigenetica rispetto all'età cronologica (espresse in anni) e una rappresentazione tramite boxplots dei valori di EAA (espressi in anni) nei 3 gruppi considerati. Negli scatter plot la regressione tra età epigenetica e cronologica è rappresentata da una linea blu, mentre le linee tratteggiate delimitano l'intervallo di età utilizzato per calcolare la regressione. Nei boxplot, la croce rappresenta la media dei valori di EAA in ciascun gruppo. In entrambi i tipi di rappresentazione, i HC sono rappresentati in azzurro, i dnPD in arancione e i aPD in marroncino.

I risultati ottenuti mostrano che i dnPD non differiscono dagli HC per nessuno degli orologi epigenetici stimati. Al contrario, i valori di EAA nei pazienti aPD tendono ad essere maggiori

di quelli degli HC per la maggior parte degli orologi analizzati, e raggiungono la significatività statistica (p-value <0.05) per il predittore PCPhenoAge.

Valore di EAA	dnPD vs HC coefficiente	dnPD vs HC p-value	aPD vs HC coefficiente	aPD vs HC p-value
Horvath	-1.84	0.06	1.05	0.37
Intrinsic	-1.85	0.06	1.03	0.39
Extrinsic	-0.17	0.88	1.33	0.3
Hannum	-0.4	0.65	0.44	0.67
Skin&Blood	-0.67	0.35	0.51	0.52
PhenoAge	0.27	0.85	1.98	0.16
GrimAge	-0.82	0.15	-0.56	0.37
PCHorvath1	-1.06	0.27	1.37	0.22
PCHannum	-0.67	0.46	1.82	0.12
PCHorvath2	-1.06	0.3	1.58	0.15
PCPhenoAge	0.04	0.97	3.09	**0.01**
PCGrimAge	-0.14	0.75	-0.03	0.96

Tabella 4.1.2. Risultati del'analisi della varianza (test ANOVA) sui valori di EAA ottenuti da ciascun orologio epigenetico nei confronti dnPD vs HC e aPD vs HC. Per ciascun confronto sono riportati i valori del coefficiente beta e del p-value ottenuti. I p-value significativi (<0.05) sono riportati in grassetto.

4.2 Stima dell'età biologica mediante marcatori glicomici

Il predittore di età glicomica GlycoAge è stato calcolato nei campioni riportati in Tabella 4.1.1. I valori di GlycoAge nei 3 gruppi sono rappresentati in Figura 4.2.1. Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi di pazienti (dnPD e aPD) rispetto ai controlli (HC) (p-value derivante dal test Anova > 0.05).

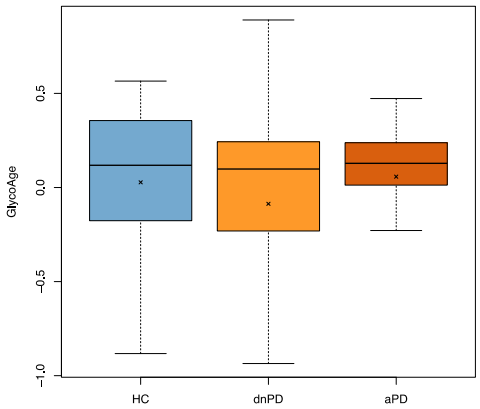


Figura 4.2.2. Valori di GlycoAge nei campioni HC, dnPD e aPD.

4.3 Predizione delle conte cellulari del sangue sulla base dei dati di metilazione

Il predittore di Horvath è stato utilizzato per stimare le proporzioni di alcuni tipi cellulari del sangue a partire dai dati di metilazione del DNA genome-wide, sulla base dell'algoritmo di deconvoluzione di Houseman (Houseman et al. 2012). In particolare, le proporzioni di linfociti T CD8, linfociti T CD4, linfociti B, monociti, cellule *natural killer* (NK), monociti e granulociti sono state stimate negli stessi campioni valutati per gli orologi epigenetici. La Figura 4.3.1 riporta i valori dei diversi tipi cellulari nei campioni HC, dnPD e aPD, mentre la Tabella 4.3.1 riporta i risultati del confronto tra i gruppi di pazienti e il gruppo HC mediante analisi della varianza, correggendo per età, sesso, batch sperimentale e provenienza geografica dei campioni.

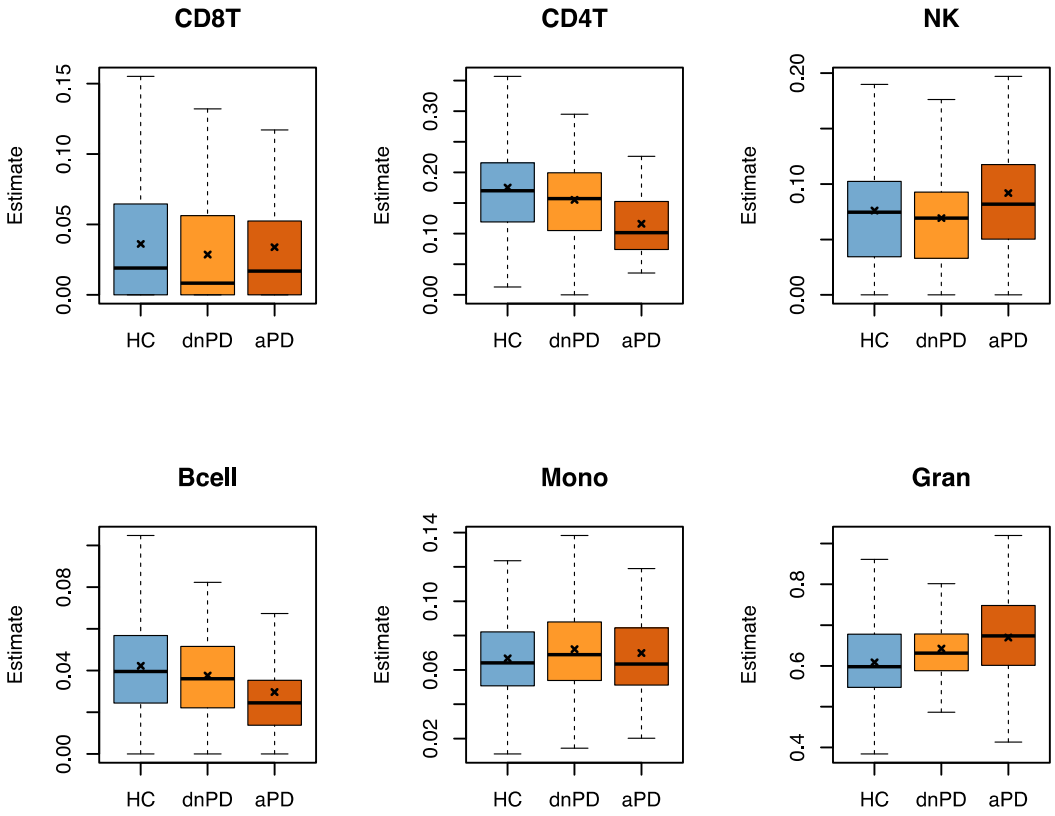


Figura 4.3.1. Stima delle proporzioni dei tipi cellulari del sangue nei campioni HC, dnPD e. La croce nei boxplot rappresenta la media dei valori di EAA in ciascun gruppo.

Valore di EAA	dnPD vs HC coefficiente	dnPD vs HC p-value	aPD vs HC coefficiente	aPD vs HC p-value
CD8T	-0.01	0.39	0	0.74
CD4T	-0.02	0.06	-0.06	**<0.01**
NK	-0.01	0.36	0.01	0.12
Bcell	0	0.52	-0.01	**<0.01**
Mono	0	0.43	0	0.74
Gran	0.03	**0.03**	0.07	**<0.01**

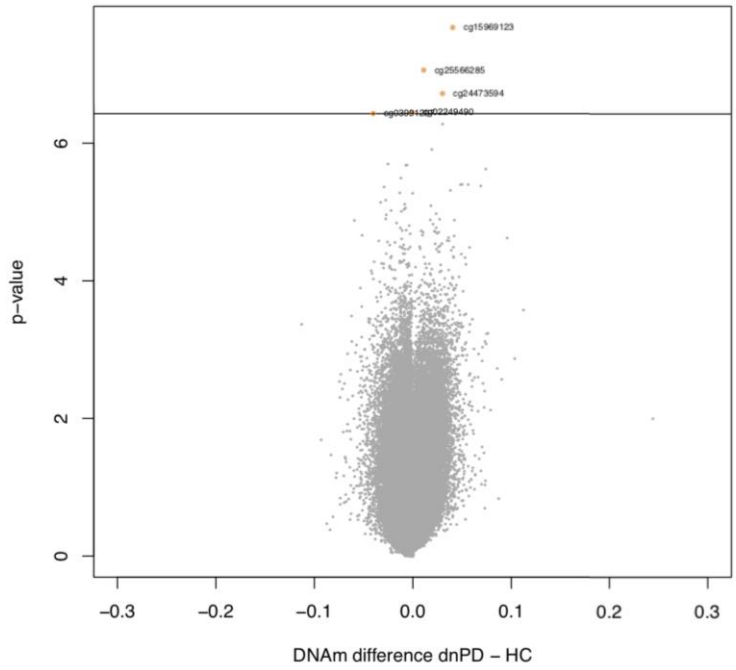
Tabella 4.3.1. Risultati del'analisi della varianza (test ANOVA) nei confronti dnPD vs HC e aPD vs HC, considerando le conte dei tipi cellulari del sangue predette sulla base dei dati di metilazione genome-wide. Per ciascun confronto sono riportati i valori del coefficiente beta e del p-value ottenuti. I p-value significativi (<0.05) sono riportati in grassetto.

I pazienti dnPD mostrano un aumento significativo nella proporzione di granulociti, che si accentua nella fase di malattia più avanzata. È interessante notare che vi sia un gradiente di incremento dalle fasi più precoci a quelle più tardive di malattia. Al contrario, i linfociti CD4T mostrano una progressiva diminuzione dai dnPd ai PD, anche se essa raggiunge la significatività statistica solo nei pazienti aPD. Infine, una diminuzione significativa dei linfociti B sembra caratterizzare esclusivamente la fase avanza di PD.

4.4 Analsi della metilazione del DNA genome-wide

I dati di metilazione del DNA genome-wide sono stati quindi analizzati al fine di indentificare siti CpG differentemente metilati (differential methylated positions, DMPs) tra i pazienti dnPD e gli HC. L'analisi differenziale è stata condotta applicando un modello lineare robusto, correggendo per età, sesso, proporzioni stimate delle conte cellulari e batch sperimentale, e controllando la distorsione nella distribuzione dei p-value mediante l'algoritmo *bacon* (Materiali e metodi). Il *volcano plot* in figura 4.4.1 mostra come le differenze tra i due gruppi sperimentali tendano ad essere piccole, con solo 3 sonde significative (p-value aggiustato per test multipli <0.05) ed altre 2 sonde marginalmente significative (p-value aggiustato per test multipli =0.05).

Figura 4.4.1. Volcano plot derivante dal confronto dnPD vs HC. L'asse x riporta la differenza tra i valori medi di metilazione tra i due gruppi, mentre l'asse y riporta il –log10(p-value). I siti CpG

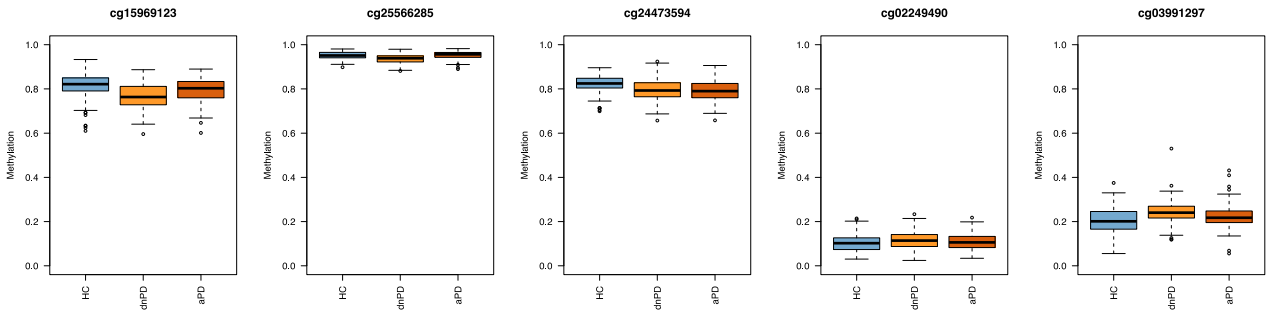


significativi o marginalmente significativi sono evidenziati in arancione.

Le caratteristiche delle 5 DMPs identificate sono riportate in tabella 4.4.1, mentre la figura 4.4.2 riporta i valori di metilazione del DNA delle DMPs nei 4 gruppi.

Probe	p-value	p-value aggiustato	Differenza di DNAm tra dnPD e HC	Chr	Posizione	Isola CpG	Posizione rispetto all'Isola	Gene
cg15969123	2.05E-08	0.014	0.041	16	51058696		OpenSea	LOC101927334
cg25566285	8.54E-08	0.03	0.011	7	158114605	chr7:158110569-158110881	S_Shelf	PTPRN2
cg24473594	1.87E-07	0.044	0.03	19	46714834		OpenSea	DKFZp434J0226
cg02249490	3.58E-07	0.052	-0.001	17	42004878		OpenSea	
cg03991297	3.72E-07	0.052	-0.04	16	30429837	chr16:30428870-30429799	S_Shore	ZNF771

Tabella 4.4.1. Caratteristiche delle DMPs emerse dal confronto dnPD vs HC.



4.5 Analisi della metilazione del DNA di regioni genomiche selezionate

I risultati descritti nel paragrafo precedente suggeriscono l'esistenza di piccoli ma significativi cambiamenti nella metilazione del DNA di alcune regioni genomiche nei pazienti dnPD rispetto ai controlli sani. Per validare le differenze osservate nell'analisi genome-wide, si è proceduto all'analisi di alcune delle potenziali regioni emerse mediante un approccio alternativo, il *targeted bisulfite sequencing* (Materiali e metodi). In particolare, è stato possibile disegnare i primer per la validazione di 3 su 5 siti CpG emersi dell'analisi genome-wide (cg25566285, cg24473594 e cg03991297). Nell'esperimento di validazione sono state inserite anche 2 regioni target emerse da un'attenta analisi della letteratura. La prima è costituita dal gene *SNCA*, in considerazione del suo fondamentale ruolo nel PD e dei risultati di studi precedenti che hanno dimostrato un'alterazione della metilazione del DNA di questo locus in campioni di sangue di pazienti con aPD (Miranda-Morales et al. 2017). La seconda mappa invece a cavallo del sito CpG del microarray cg26033520, identificato in una precedente meta-analisi come differentemente metilato in pazienti aPD rispetto a controlli sani.

Il saggio di *targeted bisulfite sequencing* messo a punto ha permesso di analizzare la metilazione di 14 siti CpG nell'amplicone cg25566285, 6 siti CpG nell'amplicone cg24473594, 10 siti CpG nell'amplicone cg03991297,14 siti CpG nell'amplicone SNCA e 4 siti CpG nell'amplicone cg26033520. I livelli di metilazione ottenuti sono stati confrontati tra i gruppi di pazienti (dnPD e aPD) rispetto agli HC tramite analisi della varianza (ANOVA), correggendo per età, sesso e seduta sperimentale. I risultati di questa analisi sono riportati in Tabella 4.4.1, mentre la Figura 4.4.1 riporta i profili di metilazione delle regioni analizzate nei 3 gruppi sperimentali.

Nella regione comprendente la sonda cg25566285 si osservano nel complesso 3 siti CpG la cui metilazione è significativamente diversa tra PD (dnPD o aPD) e HC. Tuttavia, il sito CpG 62 mostra una differenza tra aPD e HC estremamente ridotta (0.01%), mentre gli altri 2 siti CpG significativi (133 e 181) mostrano una distribuzione dei valori di metilazione molto ampia, che suggerisce che le differenze osservate siano dovute alla presenza di polimorfisimi genetici in queste posizioni. Possiamo quindi affermare che i risultati dell'analisi genome-wide non sono confermati per questa regione.

La stessa conclusione è applicabile alla regione genomica contenente la sonda cg24473594, per la quale nessun sito CpG mostra differenze significative tra i PD e gli HC.

Al contrario, nella regione bersaglio cg03991297 i siti CpG 38 e 202 sono significativamente ipometilati negli aPD rispetto agli HC (valori medi di metilazione inferiori del 2%-4%), mentre i dnPD non mostrano differenze significative rispetto ai controlli sani.

Per quanto riguarda SCNA, la regione analizzata cade nell'introne 1. L'analisi statistica ha evidenziato una significativa ipometilazione degli aPD rispetto agli HC nei siti CpG 71 e 130, mentre anche in questo caso non si osservano differenze significative nei dnPD.

I risultati più interessanti sono stati ottenuti per la regione genomica che comprende la sonda cg26033520. I siti CpG in posizione 28 e 41 mostrano infatti differenze significative sia nei dnPD che negli aPD rispetto agli HC. In particolare, si osserva una progressiva riduzione del livello di metilazione che si accentua con la progressione della malattia (ipometilazione pari a circa il 2% rispetto ai controlli nei dnPD e a circa il 5% negli aPD).

Target	CpG	HC Mean ± SD	dnPD Mean ± SD	aPD Mean ± SD	dnPDvsHC	adPDvsHC
cg25566285	24	0.95 ± 0.032	0.949 ± 0.027	0.947 ± 0.029	0.71	0.4
cg25566285	30	0.962 ± 0.021	0.957 ± 0.023	0.959 ± 0.018	0.195	0.631
cg25566285	36	0.952 ± 0.034	0.959 ± 0.021	0.956 ± 0.027	0.097	0.458
cg25566285	62	0.98 ± 0.014	0.975 ± 0.071	0.985 ± 0.009	0.296	**0.018**
cg25566285	64	0.982 ± 0.013	0.98 ± 0.013	0.98 ± 0.011	0.582	0.342
cg25566285	74	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.018	0.972 ± 0.018	0.923	0.548
cg25566285	92	0.978 ± 0.014	0.98 ± 0.013	0.978 ± 0.018	0.187	0.826
cg25566285	118	0.964 ± 0.015	0.967 ± 0.014	0.964 ± 0.017	0.22	0.735
cg25566285	133	0.368 ± 0.339	0.26 ± 0.285	0.351 ± 0.351	**0.025**	0.357
cg25566285	159	0.884 ± 0.05	0.879 ± 0.057	0.892 ± 0.054	0.795	0.608
cg25566285	165	0.975 ± 0.012	0.977 ± 0.02	0.977 ± 0.012	0.613	0.177
cg25566285	181	0.61 ± 0.332	0.716 ± 0.272	0.651 ± 0.336	**0.022**	0.197
cg25566285	205	0.921 ± 0.04	0.92 ± 0.032	0.924 ± 0.025	0.902	0.622
cg25566285	229	0.999 ± 0.001	0.998 ± 0.001	0.999 ± 0.001	0.066	0.555
cg24473594	42	0.882 ± 0.039	0.887 ± 0.033	0.89 ± 0.03	0.183	0.305
cg24473594	71	0.5 ± 0.12	0.513 ± 0.09	0.512 ± 0.099	0.192	0.631
cg24473594	95	0.485 ± 0.359	0.457 ± 0.311	0.457 ± 0.289	0.74	0.588
cg24473594	149	0.908 ± 0.036	0.908 ± 0.031	0.915 ± 0.033	0.712	0.235
cg24473594	164	0.831 ± 0.074	0.83 ± 0.056	0.83 ± 0.063	0.715	0.624
cg24473594	171	0.777 ± 0.063	0.784 ± 0.06	0.769 ± 0.053	0.13	0.439
cg03991297	2	0.473 ± 0.013	0.474 ± 0.014	0.476 ± 0.015	0.712	0.421
cg03991297	33	0.455 ± 0.096	0.463 ± 0.074	0.426 ± 0.093	0.594	0.08
cg03991297	38	0.458 ± 0.101	0.451 ± 0.078	0.415 ± 0.096	0.547	**0.01**
cg03991297	45	0.233 ± 0.08	0.235 ± 0.062	0.21 ± 0.067	0.981	0.102
cg03991297	67	0.368 ± 0.082	0.383 ± 0.067	0.335 ± 0.083	0.372	0.073
cg03991297	76	0.433 ± 0.09	0.447 ± 0.063	0.408 ± 0.082	0.288	0.196
cg03991297	115	0.551 ± 0.1	0.576 ± 0.071	0.551 ± 0.1	0.116	0.784
cg03991297	160	0.626 ± 0.09	0.653 ± 0.07	0.615 ± 0.103	0.053	0.789
cg03991297	165	0.47 ± 0.079	0.486 ± 0.067	0.437 ± 0.117	0.218	0.193
cg03991297	202	0.412 ± 0.085	0.413 ± 0.068	0.379 ± 0.08	0.952	**0.048**
SNCA	71	0.265 ± 0.084	0.264 ± 0.076	0.213 ± 0.086	0.938	**0.002**
SNCA	98	0.138 ± 0.072	0.135 ± 0.05	0.117 ± 0.072	0.753	0.113
SNCA	101	0.136 ± 0.075	0.132 ± 0.057	0.118 ± 0.066	0.928	0.21
SNCA	111	0.073 ± 0.061	0.062 ± 0.037	0.063 ± 0.045	0.174	0.19
SNCA	113	0.05 ± 0.062	0.037 ± 0.036	0.042 ± 0.051	0.093	0.369
SNCA	118	0.081 ± 0.062	0.072 ± 0.045	0.068 ± 0.045	0.359	0.172
SNCA	130	0.067 ± 0.063	0.052 ± 0.033	0.047 ± 0.04	0.068	**0.038**
SNCA	132	0.054 ± 0.055	0.044 ± 0.034	0.037 ± 0.03	0.25	0.064
SNCA	143	0.031 ± 0.049	0.029 ± 0.032	0.02 ± 0.025	0.55	0.059
SNCA	151	0.044 ± 0.053	0.036 ± 0.03	0.032 ± 0.029	0.287	0.084
SNCA	172	0.084 ± 0.069	0.076 ± 0.045	0.063 ± 0.053	0.401	0.095
SNCA	179	0.077 ± 0.068	0.064 ± 0.04	0.056 ± 0.043	0.166	0.061
SNCA	181	0.082 ± 0.069	0.07 ± 0.044	0.071 ± 0.048	0.337	0.342
SNCA	199	0.053 ± 0.057	0.057 ± 0.036	0.045 ± 0.034	0.659	0.214
cg26033520	28	0.578 ± 0.051	0.554 ± 0.068	0.525 ± 0.058	**0.004**	**0**
cg26033520	41	0.8 ± 0.048	0.787 ± 0.041	0.776 ± 0.044	**0.031**	**0.017**
cg26033520	176	0.774 ± 0.04	0.767 ± 0.039	0.769 ± 0.037	0.202	0.428
cg26033520	204	0.844 ± 0.03	0.835 ± 0.03	0.837 ± 0.03	0.054	0.292

Tabella 4.5.1. Risultati dell'analisi della varianza (test ANOVA) nei confronti dnPD vs HC e aPD vs HC, eseguita sui dati di metilazione derivanti dall'analisi della metilazione targeted. Per ciascun confronto sono riportati i valori del coefficiente beta e del p-value ottenuti. I p-value significativi (<0.05) sono riportati in grassetto.

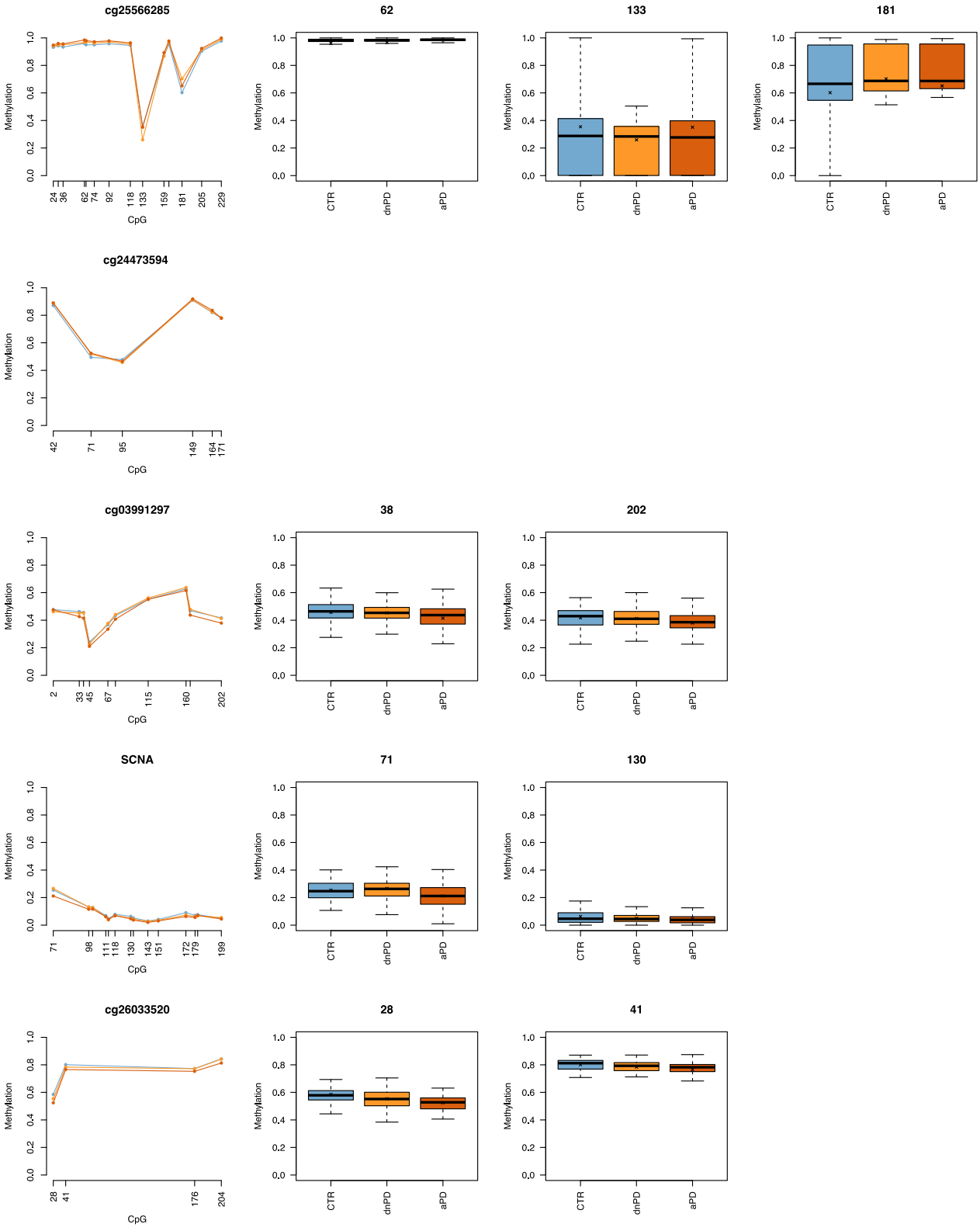


Figura 4.5.1. Risultati dell'analisi della varianza (test ANOVA) nei confronti dnPD vs HC e aPD vs HC, eseguita sui dati di metilazione derivanti dall'analisi della metilazione targeted. Per ciascuna regione target sono riportati una rappresentazione del profilo di metilazione nei 3 gruppi, considerando tutti i siti CpG presenti nella regione target, e i boxplot dei valori di metilazione per i siti CpG risultati significativamente differentemente metilati.

5 DISCUSSIONE

I risultati descritti nella presente tesi suggeriscono che:

1) **Le prime fasi del PD non sono accompagnate da un'accelerazione dell'età biologica, valutata mediante gli orologi epigenetici e il GlycoAge Test.**

   Come accennato nell'introduzione, studi precedenti hanno descritto un invecchiamento epigenetico accelerato in pazienti con PD in fase avanzata (Horvath e Ritz 2015). I nostri risultati confermano quest'osservazione, poiché il gruppo dei pazienti aPD mostra una tendenza all'accelerazione dell'età epigenetica per la maggior parte degli orologi epigenetici testati, raggiungendo però la significatività statistica solo per il PCPhenoAge. Al contrario, i pazienti dnPD non sono significativamente diversi rispetto ai controlli, né per gli orologi epigenetici né per il GlycoAge Test. Ovviamente, né gli orologi epigenetici né il GlycoAge Test possono essere considerati marcatori esaustivi di invecchiamento biologico, che può interessare altri meccanismi molecolari (per esempio, marcatori proteomici), né va dimenticato che la nostra analisi è stata eseguita su cellule del sangue, che potrebbero essere intaccate dal PD solo tardivamente. Se da una parte non è quindi possibile escludere un contributo del processo di invecchiamento, non rilevato dagli orologi di età epigenetica che abbiamo utilizzato, nelle prime fasi del PD, d'altra parte possiamo affermare che esistono delle differenze tra la fase precoce e la fase tardiva della malattia che vanno al di là degli orologi epigenetici e che sono rilevabili a livello sistemico (cellule del sangue). Analisi più approfondite, per esempio considerando il dosaggio del trattamento farmacologico, permetteranno di capire se l'invecchiamento accelerato osservato negli aPD sia dovuto al trattamento farmacologico stesso, che può alterare i profili di metilazione (Henderson-Smith et al. 2019), o alla progressione della malattia.

2) **Il PD è caratterizzato da cambiamenti epigenetici riferibili a variazioni nelle popolazioni di cellule del sistema immunitario sin dalle prime fasi della malattia.**

   I nostri risultati suggeriscono che le proporzioni dei tipi cellulari del sangue, predette a partire dal profilo di metilazione del DNA, subiscano variazioni evidenti già nelle prime fasi della malattia. Questi dati confermano studi precedente, che hanno per esempio dimostrato una diminuzione dei linfociti T CD4 e dei linfociti B nei pazienti con PD (Kustrimovic et al. 2018; Stevens et al. 2012). Analogamente, alcuni studi hanno riportato un aumento dei granulociti neutrofili nel PD (Horvath e Ritz 2015; Henderson-Smith et al. 2019), e un recente studio ha dimostrato che un aumento del rapporto neutrofili/linfociti

caratterizza i pazienti con PD rispetto ai controlli sani (Muñoz-Delgado et al. 2021). I nostri dati contribuiscono in maniera innovativa a queste osservazioni, dimostrando che le alterazioni immunologiche sono presenti sin dalle prime fasi della malattia. Considerando che tali alterazioni sono osservate anche durante il processo di immunosenescenza (alterazione del rapporto CD4/CD8, diminuzione dei B, skewing verso lo stipite mieloide) i nostri dati suggeriscono che i pazienti PD mostrino fin dalle prime fasi della malattia un invecchiamento precoce del sistema immunitario. Se tale invecchiamento sia in relazione causale con la malattia o se ne sia un effetto o un aspetto concomitante rimane da definire.

3) **Il PD è caratterizzato da sottili ma riproducibili cambiamenti nella metilazione del DNA misurata nelle cellule del sangue, che in parte differiscono tra fase precoce e avanzata di malattia.**

L'analisi della metilazione del DNA genome-wide ha mostrato che il profilo epigenetico delle cellule del sangue è influenzato in maniera limitata dal PD nelle prime fasi della malattia. Questi risultati sono coerenti con quanto descritto in letteratura. Numerosi studi hanno infatti misurato la metilazione del DNA nel sangue di pazienti con PD, concentrandosi anche in questo caso su pazienti aPD, osservando cambiamenti piccoli e scarsamente riproducibili tra i vari studi (Masliah et al. 2013; Chuang et al. 2017; Vallerga et al. 2020; Henderson et al. 2021). Per questo, abbiamo ritenuto opportuno validare i nostri risultati utilizzando un approccio alternativo al microarray, cioè il *targeted bisulfite sequencing*. Tra i siti CpG identificati come differentemente metilati e validati con questa tecnica alternativa, solamente uno si è confermato effettivamente diverso tra PD e controlli sani. Questo sito CpG mappa nel gene ZNF771 (zinc finger protein 771), un probabile fattore di trascrizione che non ha un ruolo noto nel PD.

Nel nostro saggio di *targeted bisulfite sequencing* abbiamo incluso anche due regioni non emerse come statisticamente significative nell'analisi genome-wide, ma potenzialmente interessanti sulla base dei dati disponibili in letteratura.

La prima mappa nel gene SNCA, che codifica per l'alfa-sinucleina, la proteina i cui aggregati sono il tratto neuropatologico caratteristico del PD. Due siti CpG nella regione analizzata sono risultati significativamente ipometilati nei pazienti aPD. Questo risultato è in accordo con studi precedenti, condotti con approcci sperimentali differenti (Pihlstrøm et al. 2015; Jowaed et al. 2010; Song et al. 2014; Gu et al. 2021; Tan et al. 2014). Anche in questo caso

però non abbiamo osservato metilazione differenziale nei pazienti dnPD, il che suggerisce che il rimodellamento epigenetico di questo locus sia associato alla progressione della malattia e/o al trattamento farmacologico.

I risultati più interessanti sono stati ottenuti per la regione comprendente la sonda del microarray cg26033520. Questa sonda è stata identificata come ipometilata in pazienti aPD in una meta-analisi su più di 2000 campioni (Vallerga et al. 2020). I risultati sulla nostra coorte non solo confermano l'ipometilazione nei aPD, ma mostrano una significativa ipometilazione anche nei dnPD. In particolare, sembra che ci sia una progressiva ipometilazione con l'avanzare della malattia. La regione in cui mappa questo siti CpG non contiene geni noti, e studi funzionali futuri dovranno approfondire il coinvolgimento del suo profilo epigenetico nel PD. Al meglio delle nostre conoscenze, questo è il primo sito CpG identificato come differentemente metilato nel dnPD.

In conclusione, i dati ottenuti da questo studio indicano che le alterazioni osservate nei pazienti in fase avanzata non sono riscontrabili in larga misura nei pazienti de novo, ossia ancora vergini da trattamento. Questo suggerisce che le modifiche osservate nei pazienti in fase avanzata possano essere un marcatore di progressione ma non della malattia in quanto tale, oppure potrebbero essere conseguenze del trattamento farmacologico. Ulteriori studi sarebbero necessari per chiarire questo aspetto. D'altro canto, le prime fasi del PD risultano caratterizzate da specifiche alterazioni epigenetiche e da un (probabile) invecchiamento precoce del sistema immunitario, che però non si traducono in un'alterazione dei biomarcatori di invecchiamento epigenetici e glicomici.

Bibliografia

Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Christian Hansen, Jia-Yi Li, e Patrik Brundin. 2010. «Are Synucleinopathies Prion-like Disorders?» *The Lancet Neurology* 9 (11): 1128–38. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70213-1.

Armstrong, Melissa J., e Michael S. Okun. 2020. «Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review». *JAMA* 323 (6): 548–60. https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360.

Aryee, Martin J., Andrew E. Jaffe, Hector Corrada-Bravo, Christine Ladd-Acosta, Andrew P. Feinberg, Kasper D. Hansen, e Rafael A. Irizarry. 2014. «Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays». *Bioinformatics* 30 (10): 1363–69. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049.

Baldereschi, M., A. Di Carlo, W. A. Rocca, P. Vanni, S. Maggi, E. Perissinotto, F. Grigoletto, L. Amaducci, e D. Inzitari. 2000. «Parkinson's Disease and Parkinsonism in a Longitudinal Study: Two-Fold Higher Incidence in Men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging». *Neurology* 55 (9): 1358–63. https://doi.org/10.1212/wnl.55.9.1358.

Bell, Christopher G., Robert Lowe, Peter D. Adams, Andrea A. Baccarelli, Stephan Beck, Jordana T. Bell, Brock C. Christensen, et al. 2019. «DNA Methylation Aging Clocks: Challenges and Recommendations». *Genome Biology* 20 (1): 249. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y.

Belsky, Daniel W., Avshalom Caspi, Louise Arseneault, Andrea Baccarelli, David L. Corcoran, Xu Gao, Eiliss Hannon, et al. 2020. «Quantification of the Pace of Biological Aging in Humans through a Blood Test, the DunedinPoAm DNA Methylation Algorithm». *ELife* 9 (maggio): e54870. https://doi.org/10.7554/eLife.54870.

Berg, Daniela, Ronald B. Postuma, Charles H. Adler, Bastiaan R. Bloem, Piu Chan, Bruno Dubois, Thomas Gasser, et al. 2015. «MDS Research Criteria for Prodromal Parkinson's Disease». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 30 (12): 1600–1611. https://doi.org/10.1002/mds.26431.

Bloem, Bastiaan R., Michael S. Okun, e Christine Klein. 2021. «Parkinson's Disease». *The Lancet* 397 (10291): 2284–2303. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X.

Bocklandt, Sven, Wen Lin, Mary E. Sehl, Francisco J. Sánchez, Janet S. Sinsheimer, Steve Horvath, e Eric Vilain. 2011. «Epigenetic Predictor of Age». *PloS One* 6 (6): e14821. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821.

Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I. de Vos, Ernst N. H. Jansen Steur, e Eva Braak. 2003. «Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease». *Neurobiology of Aging* 24 (2): 197–211. https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9.

Brundin, Patrik, Ronald Melki, e Ron Kopito. 2010. «Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (4): 301–7. https://doi.org/10.1038/nrm2873.

Buchman, Aron S., Joshua M. Shulman, Sukriti Nag, Sue E. Leurgans, Steven E. Arnold, Martha C. Morris, Julie A. Schneider, e David A. Bennett. 2012. «Nigral Pathology and Parkinsonian Signs in Elders without Parkinson Disease». *Annals of Neurology* 71 (2): 258–66. https://doi.org/10.1002/ana.22588.

Butler, Robert N., Richard Sprott, Huber Warner, Jeffrey Bland, Richie Feuers, Michael Forster, Howard Fillit, et al. 2004. «Biomarkers of Aging: From Primitive Organisms to Humans». *The Journals of Gerontology.*

Series A, Biological Sciences and Medical Sciences 59 (6): B560-567. https://doi.org/10.1093/gerona/59.6.b560.

Cerbai, Francesca, Daniele Lana, Daniele Nosi, Polina Petkova-Kirova, Sandra Zecchi, Holly M. Brothers, Gary L. Wenk, e Maria Grazia Giovannini. 2012. «The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus». *PloS One* 7 (9): e45250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045250.

Chahine, Lana M., Thomas G. Beach, Michael C. Brumm, Charles H. Adler, Christopher S. Coffey, Sherri Mosovsky, Chelsea Caspell-Garcia, et al. 2020. «In Vivo Distribution of α-Synuclein in Multiple Tissues and Biofluids in Parkinson Disease». *Neurology* 95 (9): e1267–84. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010404.

Chuang, Yu-Hsuan, Kimberly C. Paul, Jeff M. Bronstein, Yvette Bordelon, Steve Horvath, e Beate Ritz. 2017. «Parkinson's Disease Is Associated with DNA Methylation Levels in Human Blood and Saliva». *Genome Medicine* 9 (1): 76. https://doi.org/10.1186/s13073-017-0466-5.

Collier, Timothy J., Nicholas M. Kanaan, e Jeffrey H. Kordower. 2017. «Aging and Parkinson's Disease: Different Sides of the Same Coin?» *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 32 (7): 983–90. https://doi.org/10.1002/mds.27037.

Collins, S. J., J. E. Ahlskog, J. E. Parisi, e D. M. Maraganore. 1995. «Progressive Supranuclear Palsy: Neuropathologically Based Diagnostic Clinical Criteria.» *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 58 (2): 167–73. https://doi.org/10.1136/jnnp.58.2.167.

Cornejo, Francisca, e Rommy von Bernhardi. 2016. «Age-Dependent Changes in the Activation and Regulation of Microglia». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 949: 205–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_10.

Costa, João Pinto da, Rui Vitorino, Gustavo M. Silva, Christine Vogel, Armando C. Duarte, e Teresa Rocha-Santos. 2016. «A Synopsis on Aging-Theories, Mechanisms and Future Prospects». *Ageing Research Reviews* 29 (agosto): 90–112. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005.

Costantini, Erica, Chiara D'Angelo, e Marcella Reale. 2018. «The Role of Immunosenescence in Neurodegenerative Diseases». *Mediators of Inflammation* 2018: 6039171. https://doi.org/10.1155/2018/6039171.

Dall'Olio, Fabio, Valerie Vanhooren, Cuiying Chitty Chen, P. Eline Slagboom, Manfred Wuhrer, e Claudio Franceschi. 2013. «N-Glycomic Biomarkers of Biological Aging and Longevity: A Link with Inflammaging». *Ageing Research Reviews* 12 (2): 685–98. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.002.

Dalziel, Martin, Max Crispin, Christopher N. Scanlan, Nicole Zitzmann, e Raymond A. Dwek. 2014. «Emerging Principles for the Therapeutic Exploitation of Glycosylation». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166): 1235681. https://doi.org/10.1126/science.1235681.

Duan, Ran, Qiaoyu Fu, Yu Sun, e Qingfeng Li. 2022. «Epigenetic Clock: A Promising Biomarker and Practical Tool in Aging». *Ageing Research Reviews* 81 (novembre): 101743. https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101743.

Ferrari, Carina C., e Rodolfo Tarelli. 2011. «Parkinson's Disease and Systemic Inflammation». *Parkinson's Disease* 2011 (febbraio): e436813. https://doi.org/10.4061/2011/436813.

Field, Adam E., Neil A. Robertson, Tina Wang, Aaron Havas, Trey Ideker, e Peter D. Adams. 2018. «DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences». *Molecular cell* 71 (6): 882–95. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008.

Franceschi, C., e M. Bonafè. 2003. «Centenarians as a Model for Healthy Aging». *Biochemical Society Transactions* 31 (2): 457–61. https://doi.org/10.1042/bst0310457.

Franceschi, Claudio, e Judith Campisi. 2014. «Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69 Suppl 1 (giugno): S4-9. https://doi.org/10.1093/gerona/glu057.

Franceschi, Claudio, Paolo Garagnani, Cristina Morsiani, Maria Conte, Aurelia Santoro, Andrea Grignolio, Daniela Monti, Miriam Capri, e Stefano Salvioli. 2018. «The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates». *Frontiers in Medicine* 5: 61. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061.

Garthwaite, J., e G. Garthwaite. 1983. «The Mechanism of Kainic Acid Neurotoxicity». *Nature* 305 (5930): 138–40. https://doi.org/10.1038/305138a0.

George, Sonia, Nolwen L. Rey, Nicole Reichenbach, Jennifer A. Steiner, e Patrik Brundin. 2013. «α-Synuclein: The Long Distance Runner». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 23 (3): 350–57. https://doi.org/10.1111/bpa.12046.

Gialluisi, Alessandro, Aurelia Santoro, Alfonsina Tirozzi, Chiara Cerletti, Maria Benedetta Donati, Giovanni de Gaetano, Claudio Franceschi, e Licia Iacoviello. 2021. «Epidemiological and Genetic Overlap among Biological Aging Clocks: New Challenges in Biogerontology». *Ageing Research Reviews* 72 (dicembre): 101502. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101502.

Gizaw, Solomon T., Toshiaki Koda, Maho Amano, Keiko Kamimura, Tetsu Ohashi, Hiroshi Hinou, e Shin-Ichiro Nishimura. 2015. «A Comprehensive Glycome Profiling of Huntington's Disease Transgenic Mice». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (9): 1704–18. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.04.006.

Gizaw, Solomon T., Tetsu Ohashi, Masakazu Tanaka, Hiroshi Hinou, e Shin-Ichiro Nishimura. 2016. «Glycoblotting Method Allows for Rapid and Efficient Glycome Profiling of Human Alzheimer's Disease Brain, Serum and Cerebrospinal Fluid towards Potential Biomarker Discovery». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860 (8): 1716–27. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.009.

Gu, Jeffrey, Julio Barrera, Young Yun, Susan K. Murphy, Thomas G. Beach, Randy L. Woltjer, Geidy E. Serrano, Boris Kantor, e Ornit Chiba-Falek. 2021. «Cell-Type Specific Changes in DNA Methylation of SNCA Intron 1 in Synucleinopathy Brains». *Frontiers in Neuroscience* 15. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.652226.

Halliday, Glenda Margaret, e Heather McCann. 2010. «The Progression of Pathology in Parkinson's Disease». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1184 (gennaio): 188–95. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05118.x.

Hannum, Gregory, Justin Guinney, Ling Zhao, Li Zhang, Guy Hughes, SriniVas Sadda, Brandy Klotzle, et al. 2013. «Genome-Wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates». *Molecular Cell* 49 (2): 359–67. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016.

Hatakeyama, Shingo, Maho Amano, Yuki Tobisawa, Tohru Yoneyama, Norihiko Tsuchiya, Tomonori Habuchi, Shin-Ichiro Nishimura, e Chikara Ohyama. 2014. «Serum N-Glycan Alteration Associated with

Renal Cell Carcinoma Detected by High Throughput Glycan Analysis». *Journal of Urology* 191 (3): 805–13. https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.10.052.

Heinzel, Sebastian, Daniela Berg, Thomas Gasser, Honglei Chen, Chun Yao, Ronald B. Postuma, e MDS Task Force on the Definition of Parkinson's Disease. 2019. «Update of the MDS Research Criteria for Prodromal Parkinson's Disease». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 34 (10): 1464–70. https://doi.org/10.1002/mds.27802.

Henderson, Adrienne R., Qi Wang, Bessie Meechoovet, Ashley L. Siniard, Marcus Naymik, Matthew De Both, Matthew J. Huentelman, Richard J. Caselli, Erika Driver-Dunckley, e Travis Dunckley. 2021. «DNA Methylation and Expression Profiles of Whole Blood in Parkinson's Disease». *Frontiers in Genetics* 12. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.640266.

Henderson-Smith, Adrienne, Kathleen M. Fisch, Jianping Hua, Ganqiang Liu, Eugenia Ricciardelli, Kristen Jepsen, Mathew Huentelman, et al. 2019. «DNA methylation changes associated with Parkinson's disease progression: outcomes from the first longitudinal genome-wide methylation analysis in blood». *Epigenetics* 14 (4): 365–82. https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1588682.

Higgins-Chen, Albert T., Kyra L. Thrush, Yunzhang Wang, Christopher J. Minteer, Pei-Lun Kuo, Meng Wang, Peter Niimi, et al. 2022. «A Computational Solution for Bolstering Reliability of Epigenetic Clocks: Implications for Clinical Trials and Longitudinal Tracking». *Nature Aging* 2 (7): 644–61. https://doi.org/10.1038/s43587-022-00248-2.

Hirsch, Etienne C., e Stéphane Hunot. 2009. «Neuroinflammation in Parkinson's Disease: A Target for Neuroprotection?» *The Lancet. Neurology* 8 (4): 382–97. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6.

Holzscheck, Nicholas, Cassandra Falckenhayn, Jörn Söhle, Boris Kristof, Ralf Siegner, André Werner, Janka Schössow, et al. 2021. «Modeling Transcriptomic Age Using Knowledge-Primed Artificial Neural Networks». *NPJ Aging and Mechanisms of Disease* 7 (1): 15. https://doi.org/10.1038/s41514-021-00068-5.

Horsager, Jacob, Karoline Knudsen, e Michael Sommerauer. 2022. «Clinical and Imaging Evidence of Brain-First and Body-First Parkinson's Disease». *Neurobiology of Disease* 164 (marzo): 105626. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105626.

Horvath, Steve. 2013a. «DNA methylation age of human tissues and cell types». *Genome Biology* 14 (10): 3156. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115.

———. 2013b. «DNA methylation age of human tissues and cell types». *Genome Biology* 14 (10): 3156. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115.

Horvath, Steve, Wiebke Erhart, Mario Brosch, Ole Ammerpohl, Witigo von Schönfels, Markus Ahrens, Nils Heits, et al. 2014. «Obesity Accelerates Epigenetic Aging of Human Liver». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (43): 15538–43. https://doi.org/10.1073/pnas.1412759111.

Horvath, Steve, Junko Oshima, George M. Martin, Ake T. Lu, Austin Quach, Howard Cohen, Sarah Felton, et al. 2018. «Epigenetic Clock for Skin and Blood Cells Applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and Ex Vivo Studies». *Aging* 10 (7): 1758–75. https://doi.org/10.18632/aging.101508.

Horvath, Steve, Chiara Pirazzini, Maria Giulia Bacalini, Davide Gentilini, Anna Maria Di Blasio, Massimo Delledonne, Daniela Mari, et al. 2015. «Decreased Epigenetic Age of PBMCs from Italian Semi-Supercentenarians and Their Offspring». *Aging* 7 (12): 1159–70. https://doi.org/10.18632/aging.100861.

Horvath, Steve, e Beate R. Ritz. 2015. «Increased Epigenetic Age and Granulocyte Counts in the Blood of Parkinson's Disease Patients». *Aging* 7 (12): 1130–42. https://doi.org/10.18632/aging.100859.

Houseman, Eugene Andres, William P. Accomando, Devin C. Koestler, Brock C. Christensen, Carmen J. Marsit, Heather H. Nelson, John K. Wiencke, e Karl T. Kelsey. 2012. «DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution». *BMC Bioinformatics* 13 (1): 86. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-86.

Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford, e A. J. Lees. 1992. «Accuracy of Clinical Diagnosis of Idiopathic Parkinson's Disease: A Clinico-Pathological Study of 100 Cases.» *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 55 (3): 181–84. https://doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181.

Ishibashi, Yusuke, Yuki Tobisawa, Shingo Hatakeyama, Tetsu Ohashi, Masakazu Tanaka, Shintaro Narita, Takuya Koie, et al. 2014. «Serum Tri- and Tetra-Antennary N-Glycan Is a Potential Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer». *The Prostate* 74 (15): 1521–29. https://doi.org/10.1002/pros.22869.

Johnson, Thomas E. 2006. «Recent Results: Biomarkers of Aging». *Experimental Gerontology*, Annual Reviews in Biogerontology, 41 (12): 1243–46. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.09.006.

Jowaed, A., I. Schmitt, O. Kaut, e U. Wullner. 2010. «Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson's Disease Patients' Brains». *Journal of Neuroscience* 30 (18): 6355–59. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010.

Jylhävä, Juulia, Nancy L. Pedersen, e Sara Hägg. 2017. «Biological Age Predictors». *EBioMedicine* 21 (luglio): 29–36. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046.

Kamiyama, Toshiya, Hideki Yokoo, Jun-Ichi Furukawa, Masaki Kurogochi, Tomoaki Togashi, Nobuaki Miura, Kazuaki Nakanishi, et al. 2013. «Identification of Novel Serum Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using Glycomic Analysis». *Hepatology* 57 (6): 2314–25. https://doi.org/10.1002/hep.26262.

Kasten, Meike, Corinna Hartmann, Jennie Hampf, Susen Schaake, Ana Westenberger, Eva-Juliane Vollstedt, Alexander Balck, et al. 2018. «Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 33 (5): 730–41. https://doi.org/10.1002/mds.27352.

Kaushik, Susmita, e Ana Maria Cuervo. 2015. «Proteostasis and Aging». *Nature Medicine* 21 (12): 1406–15. https://doi.org/10.1038/nm.4001.

Kennedy, Brian K., Shelley L. Berger, Anne Brunet, Judith Campisi, Ana Maria Cuervo, Elissa S. Epel, Claudio Franceschi, et al. 2014. «Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease». *Cell* 159 (4): 709–13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039.

Khan, Sadiya S., Benjamin D. Singer, e Douglas E. Vaughan. 2017. «Molecular and Physiological Manifestations and Measurement of Aging in Humans». *Aging Cell* 16 (4): 624–33. https://doi.org/10.1111/acel.12601.

Kustrimovic, Natasa, Cristoforo Comi, Luca Magistrelli, Emanuela Rasini, Massimiliano Legnaro, Raffaella Bombelli, Iva Aleksic, et al. 2018. «Parkinson's Disease Patients Have a Complex Phenotypic and Functional Th1 Bias: Cross-Sectional Studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in Drug-Naïve and Drug-Treated Patients». *Journal of Neuroinflammation* 15 (1): 205. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1248-8.

Lenart, Peter, e Julie Bienertová-Vašků. 2017. «Keeping up with the Red Queen: The Pace of Aging as an Adaptation». *Biogerontology* 18 (4): 693–709. https://doi.org/10.1007/s10522-016-9674-4.

Levine, Morgan E., Ake T. Lu, David A. Bennett, e Steve Horvath. 2015. «Epigenetic Age of the Pre-Frontal Cortex Is Associated with Neuritic Plaques, Amyloid Load, and Alzheimer's Disease Related Cognitive Functioning». *Aging* 7 (12): 1198–1211. https://doi.org/10.18632/aging.100864.

Levine, Morgan E., Ake T. Lu, Austin Quach, Brian H. Chen, Themistocles L. Assimes, Stefania Bandinelli, Lifang Hou, et al. 2018a. «An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan». *Aging (Albany NY)* 10 (4): 573–91. https://doi.org/10.18632/aging.101414.

———. 2018b. «An Epigenetic Biomarker of Aging for Lifespan and Healthspan». *Aging* 10 (4): 573–91. https://doi.org/10.18632/aging.101414.

Lowsky, David J., S. Jay Olshansky, Jay Bhattacharya, e Dana P. Goldman. 2014. «Heterogeneity in Healthy Aging». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69 (6): 640–49. https://doi.org/10.1093/gerona/glt162.

Lu, Ake T., Austin Quach, James G. Wilson, Alex P. Reiner, Abraham Aviv, Kenneth Raj, Lifang Hou, et al. 2019. «DNA Methylation GrimAge Strongly Predicts Lifespan and Healthspan». *Aging* 11 (2): 303–27. https://doi.org/10.18632/aging.101684.

Macchi, Zachary A., Claire E. Koljack, Janis M. Miyasaki, Maya Katz, Nick Galifianakis, Lindsay P. Prizer, Stefan H. Sillau, e Benzi M. Kluger. 2020. «Patient and Caregiver Characteristics Associated with Caregiver Burden in Parkinson's Disease: A Palliative Care Approach». *Annals of Palliative Medicine* 9 (Suppl 1): S24–33. https://doi.org/10.21037/apm.2019.10.01.

Maddock, Jane, Juan Castillo-Fernandez, Andrew Wong, Rachel Cooper, Marcus Richards, Ken K. Ong, George B. Ploubidis, et al. 2020. «DNA Methylation Age and Physical and Cognitive Aging». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 75 (3): 504–11. https://doi.org/10.1093/gerona/glz246.

Mariño, Karina, Jonathan Bones, Jayesh J. Kattla, e Pauline M. Rudd. 2010. «A Systematic Approach to Protein Glycosylation Analysis: A Path through the Maze». *Nature Chemical Biology* 6 (10): 713–23. https://doi.org/10.1038/nchembio.437.

Masliah, Eliezer, Wilmar Dumaop, Douglas Galasko, e Paula Desplats. 2013. «Distinctive Patterns of DNA Methylation Associated with Parkinson Disease: Identification of Concordant Epigenetic Changes in Brain and Peripheral Blood Leukocytes». *Epigenetics* 8 (10): 1030–38. https://doi.org/10.4161/epi.25865.

Matias, Isadora, Juliana Morgado, e Flávia Carvalho Alcantara Gomes. 2019. «Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease». *Frontiers in Aging Neuroscience* 11: 59. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059.

McCrory, Cathal, Giovanni Fiorito, Belinda Hernandez, Silvia Polidoro, Aisling M. O'Halloran, Ann Hever, Cliona Ni Cheallaigh, et al. 2021. «GrimAge Outperforms Other Epigenetic Clocks in the Prediction of Age-Related Clinical Phenotypes and All-Cause Mortality». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 76 (5): 741–49. https://doi.org/10.1093/gerona/glaa286.

Miranda-Morales, Ernesto, Karin Meier, Ada Sandoval-Carrillo, José Salas-Pacheco, Paola Vázquez-Cárdenas, e Oscar Arias-Carrión. 2017. «Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 225. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00225.

Mollenhauer, Brit, Ellen Trautmann, Friederike Sixel-Döring, Tamara Wicke, Jens Ebentheuer, Martina Schaumburg, Elisabeth Lang, et al. 2013. «Nonmotor and Diagnostic Findings in Subjects with de Novo Parkinson Disease of the DeNoPa Cohort». *Neurology* 81 (14): 1226–34. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a6cbd5.

Morandi, Luca, Davide Gissi, Achille Tarsitano, Sofia Asioli, Andrea Gabusi, Claudio Marchetti, Lucio Montebugnoli, e Maria Pia Foschini. 2017. «CpG location and methylation level are crucial factors for the early detection of oral squamous cell carcinoma in brushing samples using bisulfite sequencing of a 13-gene panel». *Clinical Epigenetics* 9 (1): 85. https://doi.org/10.1186/s13148-017-0386-7.

Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease. 2003. «The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): Status and Recommendations». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 18 (7): 738–50. https://doi.org/10.1002/mds.10473.

Muñoz-Delgado, Laura, Daniel Macías-García, Silvia Jesús, Juan Francisco Martín-Rodríguez, Miguel Ángel Labrador-Espinosa, María Valle Jiménez-Jaraba, Astrid Adarmes-Gómez, Fátima Carrillo, e Pablo Mir. 2021. «Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson's Disease». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 36 (10): 2426–30. https://doi.org/10.1002/mds.28685.

Nicoletti, A., R. Vasta, G. Mostile, G. Nicoletti, G. Arabia, G. Iliceto, P. Lamberti, et al. 2017. «Gender Effect on Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease: Are Men More at Risk?» *Parkinsonism & Related Disorders* 35 (febbraio): 69–74. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.12.008.

Nikodemova, Maria, Alissa L. Small, Rebecca S. Kimyon, e Jyoti J. Watters. 2016. «Age-Dependent Differences in Microglial Responses to Systemic Inflammation Are Evident as Early as Middle Age». *Physiological Genomics* 48 (5): 336–44. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00129.2015.

Nonnekes, Jorik, Bart Post, James W. Tetrud, J. William Langston, e Bastiaan R. Bloem. 2018. «MPTP-Induced Parkinsonism: An Historical Case Series». *The Lancet. Neurology* 17 (4): 300–301. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30072-3.

Nouso, Kazuhiro, Maho Amano, Yoichi M. Ito, Koji Miyahara, Yuki Morimoto, Hironari Kato, Koichiro Tsutsumi, et al. 2013. «Clinical Utility of High-Throughput Glycome Analysis in Patients with Pancreatic Cancer». *Journal of Gastroenterology* 48 (10): 1171–79. https://doi.org/10.1007/s00535-012-0732-7.

Noyce, Alastair J., Jonathan P. Bestwick, Laura Silveira-Moriyama, Christopher H. Hawkes, Gavin Giovannoni, Andrew J. Lees, e Anette Schrag. 2012. «Meta-Analysis of Early Nonmotor Features and Risk Factors for Parkinson Disease». *Annals of Neurology* 72 (6): 893–901. https://doi.org/10.1002/ana.23687.

Pihlstrøm, Lasse, Victoria Berge, Aina Rengmark, e Mathias Toft. 2015. «Parkinson's Disease Correlates with Promoter Methylation in the α-Synuclein Gene: Parkinson Risk Variants and *SNCA* Methylation». *Movement Disorders* 30 (4): 577–80. https://doi.org/10.1002/mds.26073.

Pizza, Vincenzo, Anella Agresta, Cosimo W. D'Acunto, Michela Festa, e Anna Capasso. 2011. «Neuroinflamm-Aging and Neurodegenerative Diseases: An Overview». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 10 (5): 621–34. https://doi.org/10.2174/187152711796235014.

Poewe, Werner, e Angelo Antonini. 2015. «Novel Formulations and Modes of Delivery of Levodopa». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 30 (1): 114–20. https://doi.org/10.1002/mds.26078.

Poewe, Werner, Klaus Seppi, Caroline M. Tanner, Glenda M. Halliday, Patrik Brundin, Jens Volkmann, Anette-Eleonore Schrag, e Anthony E. Lang. 2017. «Parkinson Disease». *Nature Reviews Disease Primers* 3 (1): 1–21. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13.

Postuma, Ronald B., Daniela Berg, Matthew Stern, Werner Poewe, C. Warren Olanow, Wolfgang Oertel, José Obeso, et al. 2015. «MDS Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 30 (12): 1591–1601. https://doi.org/10.1002/mds.26424.

Postuma, Ronald B., Alex Iranzo, Michele Hu, Birgit Högl, Bradley F. Boeve, Raffaele Manni, Wolfgang H. Oertel, et al. 2019. «Risk and Predictors of Dementia and Parkinsonism in Idiopathic REM Sleep Behaviour Disorder: A Multicentre Study». *Brain: A Journal of Neurology* 142 (3): 744–59. https://doi.org/10.1093/brain/awz030.

Rakovic, Aleksandar, Jonathan Ziegler, Christoph U. Mårtensson, Jannik Prasuhn, Katharina Shurkewitsch, Peter König, Henry L. Paulson, e Christine Klein. 2019. «PINK1-Dependent Mitophagy Is Driven by the UPS and Can Occur Independently of LC3 Conversion». *Cell Death and Differentiation* 26 (8): 1428–41. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0219-z.

Ransohoff, Richard M. 2016. «How Neuroinflammation Contributes to Neurodegeneration». *Science (New York, N.Y.)* 353 (6301): 777–83. https://doi.org/10.1126/science.aag2590.

Reeve, Amy, Eve Simcox, e Doug Turnbull. 2014. «Ageing and Parkinson's Disease: Why Is Advancing Age the Biggest Risk Factor?» *Ageing Research Reviews* 14 (100): 19–30. https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.004.

Russell, Alyce C., Mirna Šimurina, Monique T. Garcia, Mislav Novokmet, Youxin Wang, Igor Rudan, Harry Campbell, Gordan Lauc, Meghan G. Thomas, e Wei Wang. 2017. «The N-Glycosylation of Immunoglobulin G as a Novel Biomarker of Parkinson's Disease». *Glycobiology* 27 (5): 501–10. https://doi.org/10.1093/glycob/cwx022.

Santiago, Jose A., Virginie Bottero, e Judith A. Potashkin. 2017. «Biological and Clinical Implications of Comorbidities in Parkinson's Disease». *Frontiers in Aging Neuroscience* 9: 394. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00394.

Santos García, D., E. Suárez Castro, I. Expósito, T. de Deus, C. Tuñas, A. Aneiros, M. López Fernández, D. Núñez Arias, e M. Bermúdez Torres. 2017. «Comorbid Conditions Associated with Parkinson's Disease: A Longitudinal and Comparative Study with Alzheimer Disease and Control Subjects». *Journal of the Neurological Sciences* 373 (febbraio): 210–15. https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.12.046.

Scala, Giovanni, Ornella Affinito, Domenico Palumbo, Ermanno Florio, Antonella Monticelli, Gennaro Miele, Lorenzo Chiariotti, e Sergio Cocozza. 2016. «AmpliMethProfiler: A Pipeline for the Analysis of CpG Methylation Profiles of Targeted Deep Bisulfite Sequenced Amplicons». *BMC Bioinformatics* 17 (1): 484. https://doi.org/10.1186/s12859-016-1380-3.

Silveyra, Maria-Ximena, Maria-Salud García-Ayllón, Miguel Calero, e Javier Sáez-Valero. 2006. «Altered Glycosylation of Acetylcholinesterase in the Creutzfeldt-Jakob Cerebrospinal Fluid». *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 30 (1–2): 65–66. https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:65.

Song, Yang, Hui Ding, Jingfang Yang, Qingling Lin, Jinhua Xue, Yanli Zhang, Piu Chan, e Yanning Cai. 2014. «Pyrosequencing Analysis of SNCA Methylation Levels in Leukocytes from Parkinson's Disease Patients». *Neuroscience Letters* 569 (maggio): 85–88. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.076.

Stevens, Claire H., Dominic Rowe, Marie-Christine Morel-Kopp, Carolyn Orr, Tonia Russell, Madelaine Ranola, Christopher Ward, e Glenda M. Halliday. 2012. «Reduced T Helper and B Lymphocytes in Parkinson's Disease». *Journal of Neuroimmunology* 252 (1–2): 95–99. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.07.015.

Tan, Yu-yan, Li Wu, Zong-bo Zhao, Ying Wang, Qin Xiao, Jun Liu, Gang Wang, Jian-fang Ma, e Sheng-di Chen. 2014. «Methylation of α-Synuclein and Leucine-Rich Repeat Kinase 2 in Leukocyte DNA of Parkinson's Disease Patients». *Parkinsonism & Related Disorders* 20 (3): 308–13. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.12.002.

Tchkonia, Tamara, Yi Zhu, Jan van Deursen, Judith Campisi, e James L. Kirkland. 2013. «Cellular Senescence and the Senescent Secretory Phenotype: Therapeutic Opportunities». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 966–72. https://doi.org/10.1172/JCI64098.

Ten Harmsen, Bibet L., Anouke van Rumund, Marjolein B. Aerts, Mayra I. Bergkamp, Rianne A. J. Esselink, Edo Richard, Frederick J. A. Meijer, Bastiaan R. Bloem, e Daniel J. van Wamelen. 2018. «Clinical Correlates of Cerebral White Matter Abnormalities in Patients with Parkinson's Disease». *Parkinsonism & Related Disorders* 49 (aprile): 28–33. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.12.029.

Tolosa, Eduardo, Gregor Wenning, e Werner Poewe. 2006. «The Diagnosis of Parkinson's Disease». *The Lancet. Neurology* 5 (1): 75–86. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70285-4.

Twelves, Dominique, Kate S. M. Perkins, e Carl Counsell. 2003. «Systematic Review of Incidence Studies of Parkinson's Disease». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 18 (1): 19–31. https://doi.org/10.1002/mds.10305.

Vaiserman, Alexander, e Dmytro Krasnienkov. 2020. «Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives». *Frontiers in Genetics* 11: 630186. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.630186.

Vallerga, Costanza L., Futao Zhang, Javed Fowdar, Allan F. McRae, Ting Qi, Marta F. Nabais, Qian Zhang, et al. 2020. «Analysis of DNA Methylation Associates the Cystine–Glutamate Antiporter SLC7A11 with Risk of Parkinson's Disease». *Nature Communications* 11 (1): 1238. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15065-7.

Van Den Eeden, Stephen K., Caroline M. Tanner, Allan L. Bernstein, Robin D. Fross, Amethyst Leimpeter, Daniel A. Bloch, e Lorene M. Nelson. 2003. «Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity». *American Journal of Epidemiology* 157 (11): 1015–22. https://doi.org/10.1093/aje/kwg068.

Vanhooren, Valerie, Sylviane Dewaele, Claude Libert, Sebastiaan Engelborghs, Peter Paul De Deyn, Olivier Toussaint, Florence Debacq-Chainiaux, et al. 2010. «Serum N-Glycan Profile Shift during Human Ageing». *EXPERIMENTAL GERONTOLOGY* 45 (10): 738–43. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.009.

Vanhooren, Valerie, Wouter Laroy, Claude Libert, e Cuiying Chen. 2008. «N-Glycan Profiling in the Study of Human Aging». *Biogerontology* 9 (5): 351–56. https://doi.org/10.1007/s10522-008-9140-z.

Zhou, Wanding, Peter W. Laird, e Hui Shen. 2017. «Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes». *Nucleic Acids Research* 45 (4): e22. https://doi.org/10.1093/nar/gkw967.