

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Corso di dottorato in Scienze Pediatriche

**Curriculum: Malattie muscolari, Neurodegenerative e metaboliche
dell'età evolutiva (XXXVIII ciclo)**

Tesi dottorato

UOC Neurologia Pediatrica e Malattie muscolari

UOSD Miologia Traslazionale e Sperimentale

**“Analisi proteomica in pazienti con atrofia muscolare spinale
trattati con Nusinersen.”**

Relatore:

Prof. Claudio Bruno

Candidata:

Dott.ssa Sara Casalini

Direttore del corso di dottorato: Prof. Pasquale Striano

INDICE

SOMMARIO.....	3
BACKGROUND	5
Epidemiologia	6
Genetica	6
Clinica	7
Standard di cura	9
Terapie specifiche	11
Terapie SMN-indipendenti	16
Screening neonatale	17
I BIOMARCATORI	19
I biomarcatori nella SMA	20
ANALISI PROTEOMICA.....	24
Ruolo delle scienze omiche nella scoperta di biomarcatori	24
Ruolo delle scienze omiche nella SMA	24
Ruolo dell'intelligenza artificiale e del machine learning nell'analisi dei dati omici	26
MATERIALI E METODI	28
Caratteristiche dei pazienti	28
Preparazione dei campioni e analisi proteomica	29
Validazione funzionale dei biomarcatori identificati in modelli di <i>C. elegans</i>	31
Algoritmo Machine Learning	31
Analisi statistica	32
RISULTATI	34
Disegno dello studio e descrizione della popolazione	34
Identificazione di potenziali biomarcatori prognostici mediante <i>machine learning</i>	35
Modificazioni del profilo proteomico indotte dal trattamento con nusinersen al T302	41
Modificazione del proteoma nei pazienti <i>responder</i> rispetto ai <i>non responder</i>	47
Modificazione dei pathway infiammatori dopo trattamento con nusinersen	49
DISCUSSIONE.....	54
CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA	62

SOMMARIO

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa autosomica recessiva causata da mutazioni del gene SMN1, caratterizzata da una marcata eterogeneità clinica. La disponibilità di nuove terapie e l'avvento dei programmi di screening neonatale hanno reso indispensabile l'identificazione di biomarcatori affidabili, cruciali per migliorare la stratificazione fenotipica e il monitoraggio della risposta terapeutica. L'obiettivo di questo studio è identificare biomarcatori proteici prognostici nel liquido cerebrospinale (cerebrospinal fluid, CSF) di pazienti affetti da SMA al baseline (T0) e caratterizzare le modificazioni del profilo proteomico indotte dal trattamento con la molecola nusinersen dopo dieci mesi di terapia (T302), con particolare attenzione alla descrizione dei processi biologici e pathway molecolari coinvolti, inclusi i processi neuroinfiammatori. In questo studio sono stati arruolati 61 pazienti SMA (19 SMA 1, 19 SMA 2, 23 SMA 3) trattati con nusinersen presso quattro Centri italiani di terzo livello che si occupano dello studio di patologie neuromuscolari. L'analisi proteomica è stata condotta mediante un approccio "non mirato" (*untarget*) con l'ausilio della spettrometria di massa abbinata alla cromatografia liquida (liquid chromatography mass spectrometry- LC-MS). Per l'analisi dei dati sono stati applicati l'algoritmo di machine learning Random Forest (RF) e l'analisi di arricchimento dei pathway biologici. L'analisi proteomica ha identificato 1625 proteine al T0 e 1399 al T302. I profili proteomici a T0 hanno evidenziato una significativa differenza tra i sottotipi SMA, identificando nove proteine chiave in grado di distinguere la forma più severa da quelle più lievi. L'analisi delle variazioni dei profili proteomici ha identificato un totale di 147 proteine espresse in modo differenziale dopo il trattamento con nusinersen nella SMA1, 135 nella SMA2 e 289 nella SMA3. Il trattamento con nusinersen ha indotto significative modificazioni del proteoma del CSF, con una risposta comune caratterizzata dalla regolazione di pathway associati all'assonogenesi e modulazioni specifiche legate alla gravità della malattia, ovvero alterazioni di pathway coinvolti nel metabolismo

energetico e nella risposta allo stress ossidativo nella SMA1, nonché della cascata della coagulazione e del complemento nelle forme SMA2 e SMA3.

Questo studio dimostra che il profilo proteomico del CSF rappresenta una potenziale fonte di biomarcatori prognostici e di risposta terapeutica nella SMA. L'integrazione di proteomica 'non mirata' con tecniche di machine learning ha permesso di identificare differenze proteiche nei pazienti naïve e di caratterizzare le modificazioni biologiche indotte dal trattamento con nusinersen, fornendo nuove evidenze sul coinvolgimento dei processi neuroinfiammatori nella risposta alla terapia.

BACKGROUND

L'atrofia muscolare spinale è una malattia autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene SMN1 sul cromosoma 5, che determinano una ridotta espressione della proteina SMN (*survival motor neuron*). Questa carenza causa disfunzione e degenerazione degli alfa motoneuroni nel midollo spinale e nel tronco encefalico, portando ad una progressiva atrofia muscolare e debolezza dei muscoli degli arti, del tronco e dei muscoli respiratori.

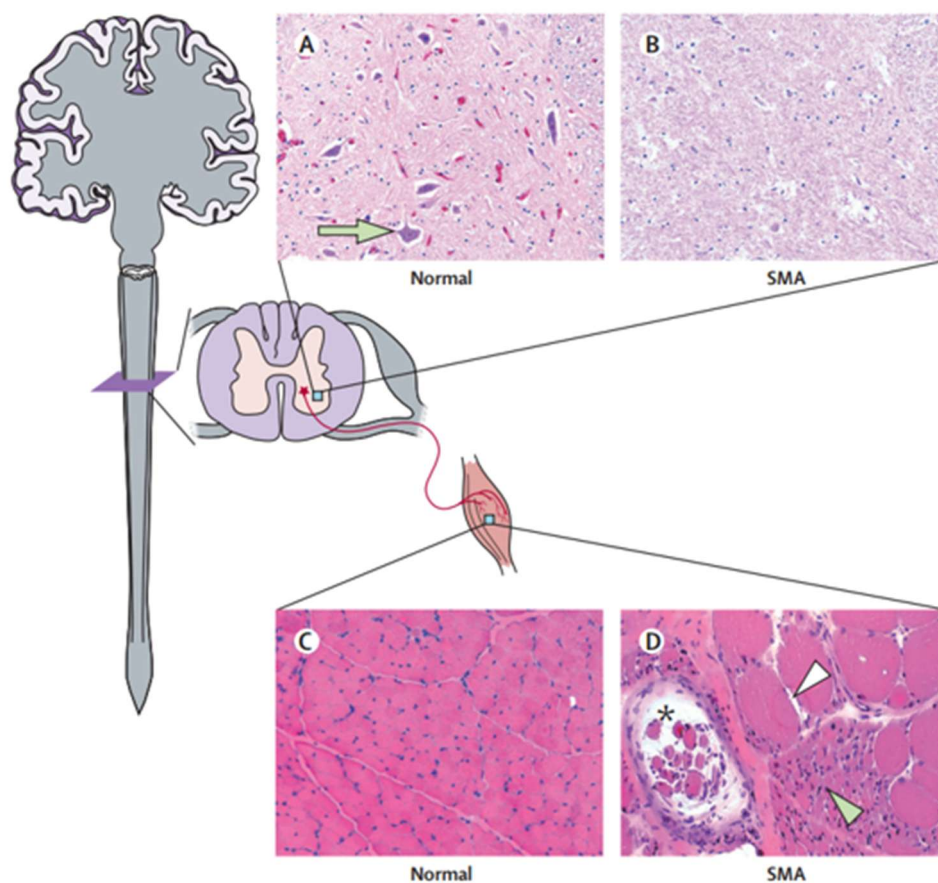


Figura 1. Istopatologia dell'atrofia muscolare spinale. I comandi motori generati nella corteccia cerebrale vengono trasmessi attraverso i motoneuroni α del midollo spinale (cellula rossa nel corno anteriore del midollo spinale e freccia verde in (A)). La regione del corno anteriore del midollo spinale mostra un'assenza di motoneuroni in un paziente (B) rispetto a quelli presenti nel controllo sano (A). Il muscolo scheletrico di un paziente (D) mostra fibre ipertrofiche (punta di freccia cava) circondate da atrofia a gruppi (punta di freccia verde), rispetto alle fibre sane con morfologia uniforme nel muscolo infantile normale (C). Nonostante l'atrofia delle fibre muscolari nell'atrofia muscolare spinale, i fusi neuromuscolari (asterisco nero) non sono interessati e diventano più evidenti (D). Lunn M.R. et al, 2008.

Epidemiologia

La SMA è la malattia neurodegenerativa più frequente in età infantile. La prevalenza della SMA varia tra le diverse popolazioni, colpendo tipicamente circa un neonato ogni 6.000–10.000 (Efimova et al., 2024). L'incidenza mondiale della SMA è stimata intorno a 1 caso ogni 10.000 nati vivi, corrispondente a circa 7,8–10 casi ogni 100.000 nati vivi. In Europa, l'incidenza varia approssimativamente da 1 caso ogni 3.900 a 16.000 nati vivi (mediana: 11,9 casi ogni 100.000 nati vivi), sulla base dei dati raccolti sia dai laboratori di genetica sia da un registro internazionale nell'ambito delle attività della rete globale TREAT-NMD. (Mercuri et al. 2022).

Genetica

La SMA è causata, nel 95% dei casi, da delezioni in omozigosi dell'esone 7 o degli esoni 7–8 del gene *SMN1*, localizzato sul cromosoma 5 (5q11.2–q13.3), che codifica per la proteina SMN, ubiquitariamente espressa. Nei restanti casi, la patologia è determinata da mutazioni puntiformi in eterozigosi composta con la delezione comune (*SMN1*) (Wirth et al., 2020). Sul cromosoma 5q è presente il gene *SMN2*, paralogo di *SMN1*, situato in posizione centromerica e differente da *SMN1* per un singolo nucleotide nell'esone 7; il numero di copie di *SMN2* è variabile da una a cinque. Di particolare rilevanza funzionale è la presenza di una timina (T) in posizione c.840 dell'esone 7 di *SMN2*, che determina lo skipping dell'esone e induce, in circa il 90% dei trascritti di pre-RNA messaggero, la produzione di una proteina tronca e non funzionale. Il gene *SMN1*, al contrario, non è soggetto a skipping dell'esone 7 e produce una proteina completa e funzionale (Calucho et al., 2018). L'attività residua del gene *SMN2* è in grado di influenzare il fenotipo della SMA in relazione al numero di copie geniche, mostrando una correlazione inversa tra il numero di copie di *SMN2* e la gravità del fenotipo clinico (Costa-Roger et al., 2021).

Clinica

La SMA è suddivisa in tre principali fenotipi a insorgenza pediatrica (SMA di tipo 1, 2 e 3) e in due fenotipi meno comuni: uno con insorgenza prenatale (tipo 0) e uno con insorgenza in età adulta e fenotipo più lieve (tipo 4) (Mercuri et al. 2022).

La suddivisione in questi fenotipi è basata sull'età di esordio e le abilità motorie acquisite (D'Amico et al. 2011).

Tipo 0 (anche noto come tipo 1a, SMA congenita). Si manifesta nel periodo neonatale con ipotonia, insufficienza respiratoria precoce, debolezza grave e riduzione dei movimenti fetali con artrogriposi associata. La morte avviene di solito alla nascita o entro il primo mese di vita; si tratta di un fenotipo raro (Burr et al. 2025).

Tipo 1 (nota anche come malattia di Werdnig-Hoffman). È la forma più comune e più severa. Si presenta prima dei sei mesi di età con ipotonia, scarso controllo del capo e riflessi tendinei ridotti o assenti. Per definizione, i bambini affetti non raggiungono mai la capacità di sedersi senza supporto. La marcata ipotonia può manifestarsi con una postura “a rana” quando sono sdraiati e con un controllo del capo scarso o assente. La debolezza dei muscoli intercostali, con relativa conservazione del diaframma, produce un torace a forma di campana e un modello di respirazione paradossa, talvolta definita “respirazione addominale”. I lattanti con SMA di tipo 1 sviluppano debolezza della lingua e della deglutizione, e sono spesso presenti fibrillazioni linguali. Si sviluppa anche debolezza facciale, sebbene di solito non sia evidente nelle prime fasi della malattia. Con l'indebolimento dei muscoli della lingua e della faringe, questi bambini sono a rischio di aspirazione e ridotta crescita. I lattanti con SMA di tipo 1 di solito sviluppano insufficienza respiratoria prima dei 2 anni di vita. Nonostante la grave debolezza, gli aspetti cognitivi sono conservati (Arnold et al. 2015, Kolb et al. 2015). La SMA di tipo I può essere ulteriormente suddivisa in Ia (o tipo 0), Ib: esordio <3 mesi, Ic: esordio 3-6 mesi (Darras et al. 2015).

Tipo 2 (nota anche come malattia di Dubowitz). Si manifesta tra i 6 e i 18 mesi di età; i pazienti sono in grado di assumere la posizione seduta. Per definizione, questi bambini non acquisiscono mai la capacità di stare in piedi né di camminare in modo indipendente, ma alcuni pazienti possono riuscire a stare in posizione eretta con l'aiuto di tutori o di un deambulatore. Presentano ipotonia, areflessia e una debolezza prossimale progressiva che colpisce in misura maggiore gli arti inferiori rispetto agli arti superiori. La difficoltà di deglutizione è frequente. Un tremore fine (minipolimiocloni) è spesso evidente, principalmente agli arti distalmente. L'atrofia della lingua con fascicolazioni è anch'essa caratteristica. La scoliosi progressiva e la debolezza dei muscoli intercostali determinano una malattia polmonare restrittiva. L'aspettativa di vita si estende fino alla prima età adulta; la compromissione respiratoria rappresenta la principale causa di mortalità (Jones et al. 2020).

Tipo 3. (nota anche come malattia di Kugelberg-Welander). Tipicamente si manifesta dopo i 18 mesi di vita, si presenta con affaticamento muscolare, debolezza progressiva e atrofia muscolare degli arti inferiori, una volta che il paziente ha già acquisito l'andatura autonoma. Il coinvolgimento viscerale, frequente nei sottotipi di tipo 1 e 2, è raro nella SMA3. L'ipotonia, l'iperlassità e l'assenza dei riflessi osteo-tendinei sono caratteristiche tipiche. Per definizione, il paziente riesce a stare in piedi o camminare senza supporto, ma la maggior parte dei pazienti con SMA3 perde la capacità di deambulare con il tempo. L'aspettativa di vita è normale (Salort-Campana et al. 2020).

Tipo 4. L'esordio è in età adulta (>21 anni) e rappresenta il fenotipo più lieve della SMA. I pazienti sono ambulantici e presentano una leggera debolezza agli arti inferiori, con un progressivo indebolimento dei muscoli prossimali. L'aspettativa di vita generalmente non è influenzata (Piepers et al. 2008).

Con l'avvento delle nuove terapie, la classificazione tradizionale della SMA sta diventando meno funzionale per gli studi clinici attuali. Per garantire la coerenza e l'uniformità delle *outcome measures* e del follow-up terapeutico, è stato proposto di riclassificare i pazienti in *non-sitters*,

sitters e *walkers*. Questo approccio riconosce il fenotipo della SMA come un continuum e si concentra sullo stato funzionale attuale e sulla risposta alla terapia (Wirth et al. 2020) (Fig.2).

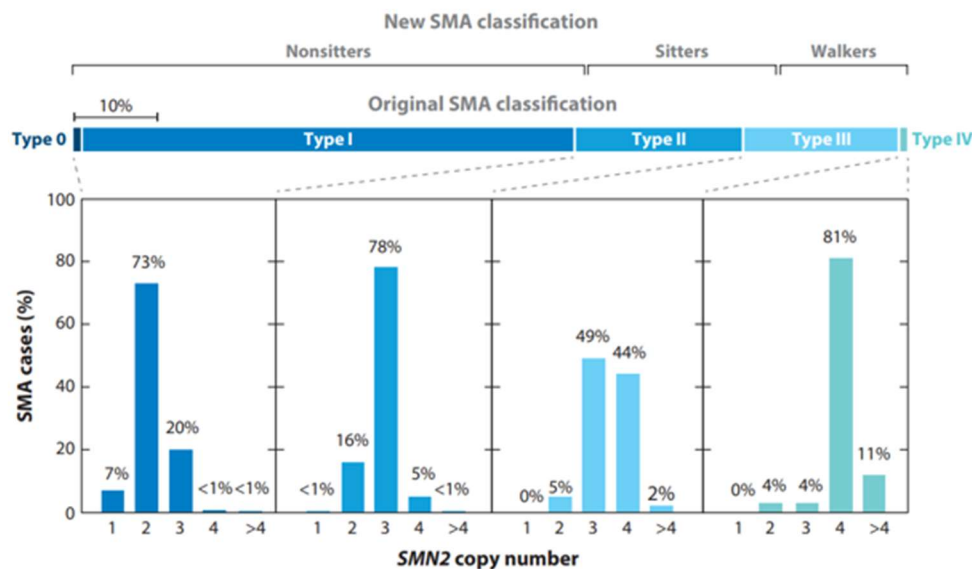


Figura 2. Le forme cliniche della SMA secondo le nuove classificazioni per il follow-up terapeutico e le loro correlazioni con il numero di copie di SMN2. Tutti i pazienti di tipo 0 e di tipo I, e alcuni pazienti di tipo II che non sono in grado di sedersi autonomamente, rientrano nella nuova categoria dei non-sitters. Gli altri pazienti di tipo II e alcuni pazienti di tipo III che non sono in grado di camminare autonomamente rientrano nella categoria dei sitters. Gli altri pazienti di tipo III e tutti i pazienti di tipo IV rientrano nella categoria dei walkers. Le correlazioni tra la gravità clinica e il numero di copie di SMN2 sono rappresentate secondo la classificazione originale, poiché non sono disponibili studi di correlazione per la nuova classificazione. Wirth B. et al. 2020. Calucho M. et al. 2018.

Standard di cura

L'approccio multidisciplinare rappresenta l'elemento chiave nella gestione dei pazienti affetti da SMA. La valutazione clinica nella SMA comprende l'esecuzione di un esame obiettivo, con particolare attenzione all'apparato muscoloscheletrico e alle relative compromissioni funzionali. Questa dovrebbe includere la misurazione della forza muscolare e dell'ampiezza del movimento articolare, l'utilizzo di scale funzionali motorie validate e di test temporizzati. Tali valutazioni dovrebbero essere eseguite con cadenza semestrale, salvo la presenza di circostanze particolari che

richiedano un follow-up differente. Il monitoraggio regolare di questi parametri consente di rilevare eventuali cambiamenti nel tempo, identificare gli ambiti che necessitano di intervento e valutare la risposta ai trattamenti.

Per quanto riguarda l'aspetto riabilitativo, sono emerse crescenti evidenze secondo cui un approccio proattivo, che includa sessioni regolari di fisioterapia, possa influenzare positivamente l'outcome. L'obiettivo primario dei programmi di riabilitazione è migliorare la tolleranza nelle diverse posizioni, prevenire le retrazioni e la scoliosi e mantenere, ripristinare o promuovere la funzionalità e la mobilità.

Dal punto di vista nutrizionale, è importante effettuare valutazioni regolari della crescita e coinvolgere un nutrizionista esperto per promuovere una dieta appropriata, monitorando non solo il peso, ma anche l'apporto di liquidi, macronutrienti e micronutrienti, in particolare l'assunzione di calcio e vitamina D.

È ben noto come la diagnosi precoce dell'insufficienza respiratoria nella SMA sia fondamentale. La gravità del coinvolgimento respiratorio dipende in gran parte dal tipo di SMA e, più precisamente, dal grado di perdita della funzione muscolare. Lo screening dei pazienti non-sitters per l'insufficienza respiratoria dovrebbe includere la valutazione mediante pulsossimetria e capnografia o misurazione della CO₂ transcutanea in veglia, nonché l'esecuzione di uno studio del sonno con registrazione della CO₂ in presenza anche di un minimo sospetto di ipoventilazione. I pazienti sitters o walkers in grado di eseguire la spirometria dovrebbero sottoporsi a tale esame ad ogni visita. La fisioterapia respiratoria, combinata con l'insufflazione-esufflazione meccanica, dovrebbe costituire il principale approccio terapeutico per la rimozione delle secrezioni nei non-sitters. Nei sitters e nei walkers, tale metodica dovrebbe essere resa disponibile a tutti i pazienti con tosse inefficace, infine la ventilazione non invasiva a pressione positiva (NIV) dovrebbe essere utilizzata in tutti i pazienti sintomatici (Finkel et al., 2018; Mercuri et al., 2018).

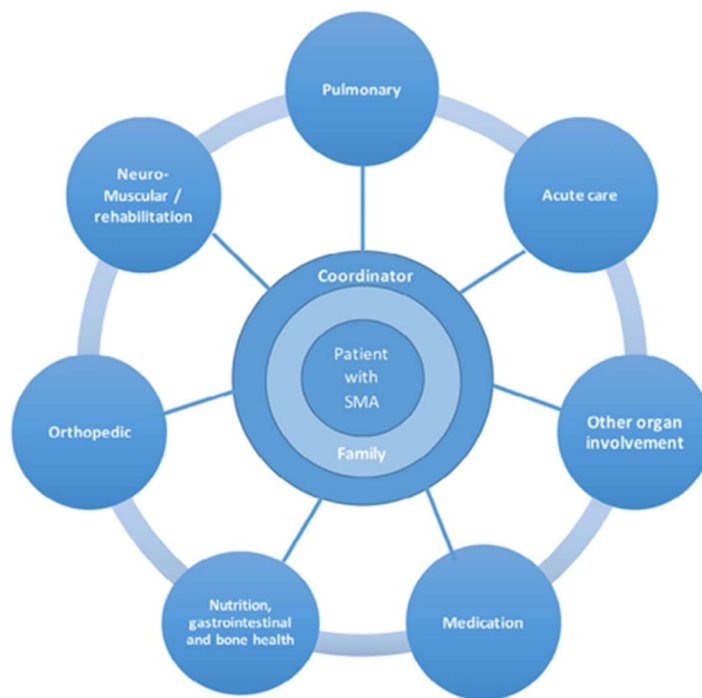


Figura 3: Approccio multidisciplinare nella SMA. Mercuri et al. 2018

Terapie specifiche

Negli ultimi anni si sono rese disponibili diverse opzioni terapeutiche per questa patologia che in precedenza non era trattabile con terapie specifiche. Poiché l'espressione della proteina SMN è ubiquitaria in tutto l'organismo, la SMA può coinvolgere i tessuti periferici oltre ai motoneuroni. Un approccio terapeutico multidisciplinare, in combinazione con trattamenti modificanti la malattia, è fondamentale (Day et al. 2022).

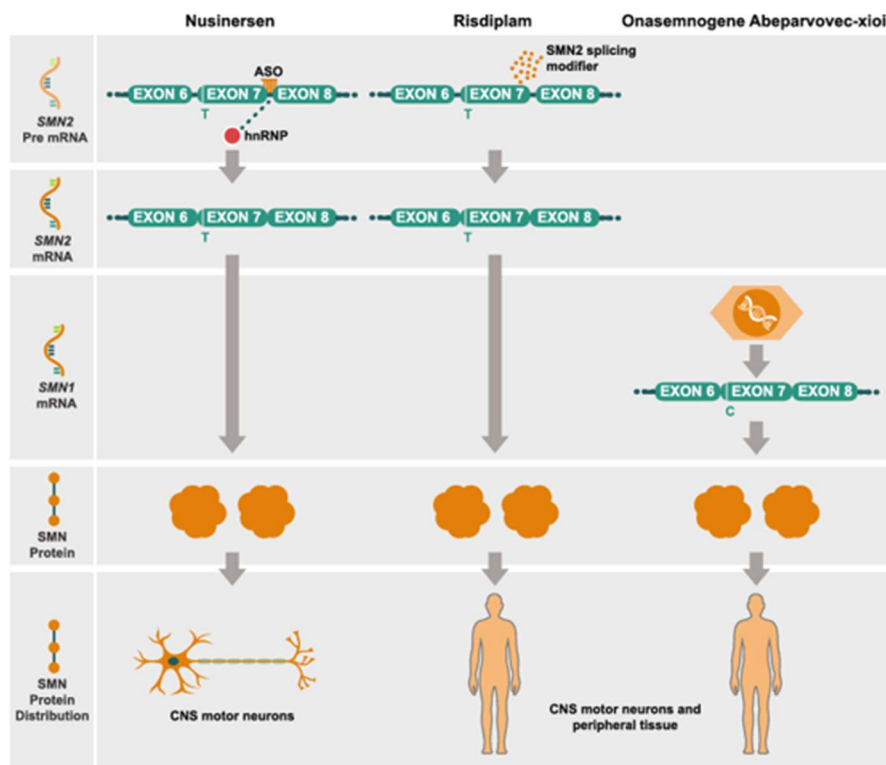


Figura 4. John W. Day et. al 2022. Figure property of Scholar Rock, Inc.

Nusinersen

Nusinersen è un oligonucleotide antisenso che modula lo splicing del pre-RNA messaggero del gene *SMN2* al fine di aumentare la produzione di trascritti a lunghezza intera, determinando livelli più elevati di proteina SMN funzionale (Mercuri et al., 2018).

Un aspetto clinicamente rilevante riguarda la modalità di somministrazione di nusinersen, che avviene per via intratecale a causa dell'incapacità del farmaco di attraversare la barriera emato-encefalica. Nei pazienti non deambulanti, spesso affetti da scoliosi severa o sottoposti a chirurgia vertebrale, l'accesso intratecale può risultare complesso. Uno studio retrospettivo condotto su pazienti con SMA non deambulanti ha evidenziato che le iniezioni transforaminali guidate da TC rappresentano una tecnica efficace, sebbene associate a un'elevata incidenza di dolore post-procedurale (Lee et al., 2025).

Recentemente, l'attenzione si è inoltre concentrata sull'ottimizzazione del dosaggio di nusinersen. I dati provenienti dallo studio DEVOTE indicano che un regime ad alto dosaggio (dose di carico costituita da due dosi da 50 mg somministrate a distanza di 14 giorni e dose di mantenimento di 28 mg ogni quattro mesi) può determinare ulteriori miglioramenti funzionali in pazienti precedentemente trattati con il dosaggio standard di 12 mg, mantenendo un profilo di sicurezza comparabile. Gli effetti avversi sono in gran parte limitati alla procedura di somministrazione intratecale, come cefalea e rachialgia. Le potenziali complicanze associate alla terapia con oligonucleotidi antisenso, che includono trombocitopenia, anomalie della coagulazione e proteinuria, risultano rare (Yeo et al., 2024). Studi clinici recenti hanno dimostrato che nusinersen migliora la sopravvivenza, la funzione motoria e la stabilità clinica in un ampio spettro di pazienti (Matesanz et al., 2025; Hagenacker et al., 2025). Per quanto riguarda la popolazione pediatrica, le evidenze cliniche confermano un profilo di efficacia e sicurezza favorevole. In uno studio retrospettivo condotto in Cina su 42 pazienti pediatrici trattati con nusinersen, sono stati osservati miglioramenti significativi delle scale di valutazione motoria nei pazienti con SMA di tipo I e II. Gli eventi avversi sono risultati prevalentemente lievi o moderati, con la febbre come reazione più frequente (Li et al., 2025).

Risdiplam

Risdiplam è il primo farmaco orale sviluppato per trattare la SMA. Si tratta di una piccola molecola, in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e di distribuirsi sia nel sistema nervoso centrale sia nei tessuti periferici. Il meccanismo d'azione di risdiplam si basa sulla modulazione dello splicing del pre-RNA messaggero del gene *SMN2*, determinando un aumento della produzione di proteina SMN a lunghezza intera e funzionale (Virata et al. 2025). La dose raccomandata è basata sull'età e sul peso corporeo del paziente (0,20 mg/kg di peso corporeo per i bambini di età < 2 anni; 0,25 mg/kg per quelli di età ≥ 2 anni e con peso < 20 kg; 5 mg per i pazienti di età ≥ 2 anni e con

peso ≥ 20 kg). Nel 2025 la Food And Drug Administration (FDA) ha approvato una nuova formulazione in compresse di risdiplam, che può essere ingerita intera o dispersa in acqua. La bioequivalenza con la soluzione orale è stata confermata, determinando una maggiore aderenza terapeutica nei pazienti di età ≥ 2 anni. L'efficacia clinica di risdiplam è stata inizialmente dimostrata negli studi FIREFISH e SUNFISH, che hanno evidenziato miglioramenti significativi delle funzioni motorie nei pazienti con SMA a esordio infantile e a esordio tardivo, rispetto alla storia naturale della malattia. Lo studio RAINBOWFISH ha dimostrato che il trattamento presintomatico con risdiplam, iniziato entro le prime sei settimane di vita, è associato a risultati funzionali e di sopravvivenza nettamente superiori rispetto alla storia naturale della malattia. La maggior parte dei pazienti ha raggiunto tappe motorie maggiori (seduta, stazione eretta e deambulazione) ed è sopravvissuta senza ventilazione permanente. Infine, la terapia ha mostrato un profilo di sicurezza favorevole, con eventi avversi per lo più lievi (Finkel te al. 2025). Gli eventi avversi riportati comprendono disturbi gastrointestinali (come diarrea e nausea), fotosensibilità cutanea e transitori aumenti degli enzimi epatici. Gli eventi avversi gravi correlati al trattamento risultano infrequenti (Alonge et al. 2025).

Terapia genica: Onasemnogene abeparvovec

La terapia genica con onasemnogene abeparvovec costituisce un approccio innovativo basato sulla somministrazione sistemica di una copia funzionale del gene *SMN1* mediante un vettore virale adeno-associato di sierotipo 9 (AAV9), in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (Weiß et al. 2024). Il trattamento viene somministrato come singola infusione endovenosa ed è attualmente approvato in Europa per pazienti SMA con fino a tre copie del gene *SMN2* o con diagnosi clinica di SMA di tipo 1 (Kirschner et al. 2024). La FDA ha approvato onasemnogene abeparvovec-brve, una nuova terapia genica intratecale, per il trattamento di bambini, adolescenti e adulti con SMA di età ≥ 2 anni con mutazione confermata del gene *SMN1*. Questo amplia notevolmente la popolazione

trattabile rispetto al regime endovenoso originale. La terapia è stata sviluppata per fornire un'unica infusione intratecale, con il vantaggio di non richiedere adeguamento di dose in base al peso corporeo. L'approvazione si basa sui dati di trial clinici di Fase III (come STEER) e Fase IIIb (STRENGTH) che hanno dimostrato miglioramenti della funzione. Recenti studi hanno dimostrato che la terapia genica migliora significativamente la sopravvivenza libera da ventilazione permanente e consente il raggiungimento di tappe motorie maggiori nei pazienti con SMA di tipo 1 trattati precocemente. Dati di follow-up a lungo termine indicano che tali benefici risultano duraturi nel tempo, con mantenimento delle acquisizioni motorie per diversi anni dopo la somministrazione (Weiß et al. 2024). Una recente revisione sistematica e metanalisi che ha incluso oltre 3.400 pazienti con SMA di tipo 1 e 2 ha evidenziato che onasemnogene abeparvovec è associato al più elevato tasso di sopravvivenza globale e a una significativa riduzione della necessità di supporto ventilatorio (Chongmelaxme et al. 2024).

Per quanto riguarda la sicurezza, la terapia genica presenta un profilo di rischio specifico che richiede un attento monitoraggio clinico. Gli eventi avversi più frequenti includono alterazioni transitorie degli enzimi epatici, mentre eventi trombotici o cardiaci risultano rari e generalmente gestibili con adeguate misure preventive e di follow-up (Weiß et al. 2024).

La ricerca si sta orientando verso l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche combinate, in cui la terapia genica può essere associata ad altre terapie modificanti la malattia. In particolare, studi clinici come lo studio RESPOND hanno esplorato l'efficacia della somministrazione di nusinersen dopo terapia genica in pazienti che non avevano ottenuto benefici ottimali dalla sola terapia genica, indicando miglioramenti della funzione motoria e riduzioni nei biomarcatori neurodegenerativi come i neurofilamenti in età pediatrica (Proud et al. 2025). Questo approccio combinato riflette una crescente consapevolezza che nessuna singola terapia possa essere completamente risolutiva per tutte le forme di SMA, soprattutto nei casi con risposta sub-ottimale a un'unica modalità di

trattamento (Haque et al. 2024). Infatti, oltre alle strategie basate sulla sostituzione del gene *SMN1*, persistono opzioni di modulazione dello splicing di *SMN2* (come nusinersen e risdiplam) che, se utilizzate in sequenza o in combinazione, possono contribuire a migliorare la produzione di proteina SMN e potenzialmente massimizzare gli effetti clinici complessivi (Mercuri et al. 2025).

Terapie SMN-indipendenti

Dopo l'approvazione di queste tre terapie, permane il bisogno clinico di ulteriori trattamenti in grado di aumentare l'espressione funzionale della proteina SMN oppure di agire in modo indipendente, prendendo come bersaglio il muscolo o la giunzione neuromuscolare (NMJ) (Weng et al. 2022). Recentemente, salanersen (BIIB115), un nuovo oligonucleotide antisenso con potenziale elevata efficacia e somministrazione annuale, ha mostrato risultati incoraggianti nello studio di fase 1. Inoltre, l'inibizione della miostatina, che favorisce la crescita muscolare e riduce l'atrofia muscolare, rappresenta un'altra strategia promettente (Wetzlich et al. 2020). Attualmente sono in sviluppo tre farmaci: apitegromab (SRK-015), RO7204239 (MANATEE) e taldefgrobep alfa (RESILIENT) (Servais et al. 2024).

Il secondo approccio indipendente da SMN consiste nel facilitare la trasmissione a livello della giunzione neuromuscolare (NMJ) mediante l'uso dell'inibitore dell'acetilcolinesterasi piridostigmina (Stam et al. 2022) oppure dell'agonista del recettore β 2-adrenergico salbutamolo. NMD670, un inibitore del canale del cloro specifico del muscolo scheletrico (ClC-1) che potenzia la trasmissione della NMJ nella miastenia grave, è attualmente in fase di studio nei pazienti con atrofia muscolare spinale (studio SYNAPSE-SMA).

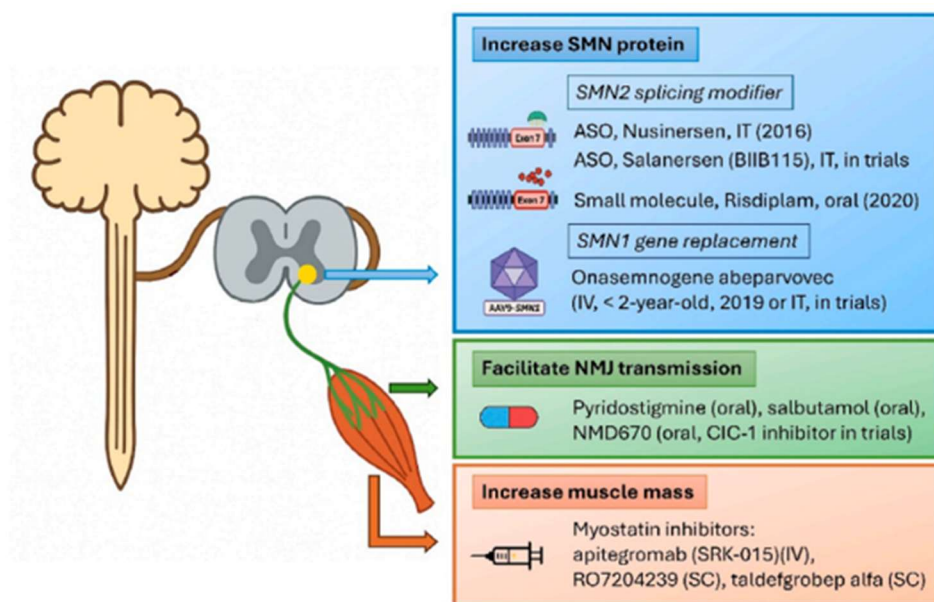


Figura 5. Illustrazione schematica delle diverse strategie di trattamento in base ai rispettivi meccanismi d'azione. Weng et al, 2025.

Screening neonatale

Lo screening neonatale per la SMA costituisce un programma di sanità pubblica finalizzato all'identificazione pre-sintomatica dei neonati affetti da SMA, consentendo così l'avvio tempestivo delle terapie in una fase della malattia in cui l'efficacia clinica è massima e può alterare in modo significativo il decorso naturale della patologia (Masson et al., 2025). A livello europeo la diffusione dello screening neonatale per la SMA è cresciuta rapidamente: dati recenti riportano che, a partire dall'agosto 2024, circa il 66% dei neonati in Europa ha accesso allo screening neonatale per la SMA (Varone et al. 2025). Il modello operativo più comune prevede l'analisi del DNA estratto da una goccia di sangue essiccata (*dried blood spot* - DBS) mediante tecniche basate su PCR per la delezione omozigote dell'esone 7 di *SMN1* e, in alcuni protocolli, la quantificazione del numero di copie *SMN2* (Ambrosio et al. 2025). In Italia, l'implementazione dello screening per la SMA è avvenuta inizialmente attraverso progetti pilota regionali, tra i quali l'esperienza ligure rappresenta un modello organizzativo rilevante. Il programma pilota ligure è stato avviato nel settembre 2021 e ha coinvolto progressivamente tutti i punti nascita regionali, con il coordinamento

dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini quale laboratorio e centro clinico di riferimento. Nel corso del biennio sperimentale sono stati sottoposti a screening oltre 4.000 neonati nei primi mesi e decine di migliaia complessivamente, con una percentuale di dissenso pari a circa lo 0,12%, indicativa di un elevato tasso di adesione da parte delle famiglie.

Durante il periodo biennale di raccolta dati sono stati registrati complessivamente cinque profili patologici rilevati dallo screening combinato SMA-SCID (Immunodeficienza Grave Combinata): due casi compatibili con SMA, un caso di SCID e due casi di linfopenia CD3 non-SCID.

Sulla base dei risultati clinici, organizzativi ed epidemiologici emersi dal progetto pilota, la Regione Liguria ha deliberato l'inserimento strutturale dello screening neonatale per la SMA a carico del Servizio Sanitario Regionale, confermando il valore dello screening come intervento costo-efficace e in grado di ridurre significativamente la morbidità e la disabilità associate alla malattia.

I BIOMARCATORI

I biomarcatori sono definiti come indicatori misurabili in modo oggettivo che riflettono processi biologici normali, patologici o risposte farmacologiche a un intervento terapeutico. Secondo la definizione condivisa da National Institutes of Health (NIH) e Food and Drug Administration (FDA), un biomarcatore può essere una molecola, una caratteristica genetica, un parametro biochimico o un'immagine che fornisce informazioni sullo stato di salute o di malattia di un individuo. I biomarcatori trovano applicazione in numerosi ambiti della medicina, tra cui la diagnosi precoce, la stratificazione prognostica, il monitoraggio della progressione di malattia e la valutazione della risposta a un trattamento (Strimbu et al. 2010). In ambito clinico, l'impiego dei biomarcatori consente di migliorare l'accuratezza diagnostica e di supportare decisioni terapeutiche personalizzate, contribuendo allo sviluppo della medicina di precisione (Pavlou et al., 2013). Dal punto di vista funzionale, i biomarcatori possono essere classificati in biomarcatori diagnostici, prognostici, predittivi, di monitoraggio e di sicurezza, a seconda del contesto clinico e dell'obiettivo di utilizzo. Affinché un biomarcatore possa essere utilizzato nella pratica clinica, è necessario che soddisfi criteri rigorosi di validità analitica e clinica. Pertanto, lo sviluppo e la validazione dei biomarcatori rappresentano un processo complesso ma essenziale per migliorare l'efficacia dei programmi di prevenzione, diagnosi e trattamento in sanità pubblica.

I biomarcatori nella SMA

Negli ultimi anni, i significativi progressi terapeutici nel trattamento della SMA e l'introduzione dello screening neonatale hanno reso cruciale lo sviluppo e la validazione di biomarcatori affidabili per la stratificazione prognostica, il monitoraggio della progressione di malattia e la valutazione della risposta terapeutica. In questo contesto, la letteratura recente converge sull'importanza di un approccio multimodale che integri differenti categorie di biomarcatori, includendo biomarcatori genetici, biochimici, molecolari emergenti, funzionali ed elettrofisiologici, nonché tecniche di imaging quantitativo del muscolo (Lapp et al., 2023; Yan et al., 2025). Il biomarcatore genetico più consolidato nella SMA è rappresentato dal numero di copie del gene *SMN2*. È ampiamente dimostrato che un maggior numero di copie di *SMN2* sia associato a fenotipi clinici più lievi e a una prognosi migliore; per questo motivo, tale parametro viene largamente utilizzato nella pratica clinica per la stratificazione dei pazienti e per supportare le decisioni terapeutiche (Calucho et al., 2018). Tuttavia, studi più recenti hanno evidenziato una significativa variabilità interindividuale, che limita il valore predittivo del solo numero di copie di *SMN2* e rende necessaria l'integrazione con biomarcatori dinamici e funzionali (Abiusi et al., 2024; Yan et al., 2025). Tra i biomarcatori biochimici, la catena leggera dei neurofilamenti (*neurofilament light chain*, NfL) è emersa come indicatore promettente di danno assonale. Studi di revisione e analisi di coorti pediatriche hanno mostrato che i livelli plasmatici o sierici di NfL sono significativamente più elevati nei pazienti con SMA non trattati rispetto ai controlli sani e che, dopo l'avvio di terapie modificanti la malattia, si osserva una riduzione progressiva dei livelli di NfL (Bayoumy et al., 2024), suggerendo che questo biomarcatore possa riflettere la riduzione del danno assonale in risposta alla terapia (Pitarch-Castellano et al., 2025; Jin et al., 2026). Rimangono tuttavia aperte importanti questioni relative alla definizione di range di riferimento specifici per età, alla standardizzazione dei metodi analitici e all'interpretazione individuale dei valori misurati (Bayoumy et al., 2024). I microRNA (miRNA) circolanti rappresentano una classe di biomarcatori molecolari emergenti nella SMA. Numerosi

studi hanno dimostrato che specifici miRNA muscolo- e neurone-associati risultano deregolati nei pazienti con SMA rispetto ai controlli sani e che alcuni di essi mostrano variazioni in seguito al trattamento. In particolare, miRNA come miR-1, miR-133a/b e miR-206 sono stati proposti come potenziali biomarcatori per la comprensione della patogenesi, la stratificazione dei pazienti e il monitoraggio della risposta terapeutica. Nonostante il loro potenziale, l'applicazione clinica routinaria dei miRNA è attualmente limitata da una marcata eterogeneità metodologica, da dimensioni campionarie ridotte e dalla mancanza di studi prospettici multicentrici di conferma (Barbo et al., 2024). Le misure elettrofisiologiche costituiscono un'importante categoria di biomarcatori funzionali nella SMA. Tra queste, il potenziale d'azione muscolare composto (*compound muscle action potential*, CMAP) rappresenta un indicatore diretto dell'integrità delle unità motorie e della funzione neuromuscolare. Diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra i valori di CMAP e gli esiti funzionali, suggerendo che questo parametro possa essere utile nel monitoraggio longitudinale dei pazienti, in particolare per valutare la conservazione o il recupero delle unità motorie dopo trattamento (Lapp et al., 2023; Corti et al., 2025). L'elettrofisiologia, pur richiedendo competenze tecniche specifiche, rimane un valido strumento complementare ai biomarcatori molecolari. Infine, le tecniche di imaging muscolare quantitativo, in particolare la risonanza magnetica con analisi della composizione tissutale e quantificazione della sostituzione adiposa, stanno emergendo come strumenti non invasivi per valutare i cambiamenti strutturali muscolari nel tempo. Queste metodiche consentono di documentare la progressione della perdita di massa muscolare e possono essere integrate con biomarcatori biochimici ed elettrofisiologici per una valutazione più completa dello stato di malattia e della risposta terapeutica (Lapp et al., 2023).

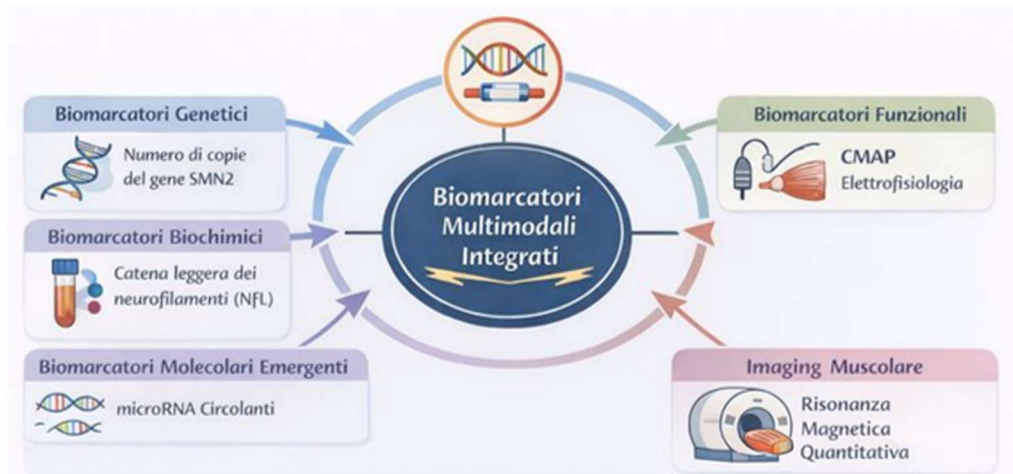


Figura 6. Biomarcatori nella SMA

Nella tabella 1 è riportata una panoramica dei principali biomarcatori diagnostici e prognostici studiati in differenti fluidi biologici nei pazienti SMA (Babić et al. 2023).

Biomarcatore	Materiale biologico	Metodica utilizzata	Numero di pazienti	Ruolo	Studio di riferimento
NfL	Siero, CSF	SiMoA, ELISA	21–155	Prognostico, farmacodinamico	Olsson et al., 2019
pNfH	Siero, CSF, plasma	SiMoA, ELISA	39–155	Diagnostico, prognostico	Darras et al., 2019
SMN protein	Sangue, PBMC, fibroblasti	ELISA, imaging flow cytometry	39–443	Diagnostico, prognostico	Kolb et al., 2016
SMN mRNA	Sangue	RT-PCR, ddPCR	53–130	Diagnostico, prognostico	Sumner et al., 2006
HSPA7 mRNA	Sangue	RT-PCR, RNA sequencing	52	Diagnostico, prognostico	Kolb et al., 2019
HSP70B protein	Siero	ELISA	52	Diagnostico, prognostico	Kolb et al., 2019
IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α	Siero, CSF	Multiplex immunoassay	44	Diagnostico	Kwon et al., 2021
IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , G-CSF	CSF	Multiplex immunoassay	48	Farmacodinamico	Finkel et al., 2021
CHIT1	CSF	ELISA	109	Diagnostico, farmacodinamico	Wurster et al., 2020
Tau totale / p-tau	CSF	ELISA	21–23	Prognostico	Faravelli et al., 2020
GFAP	CSF	ELISA	23	Prognostico	Faravelli et al., 2020
Proteoma totale	CSF, plasma	2D-PAGE, LC-MS/MS, WB	6–288	Diagnostico, prognostico	Bianchi et al., 2020
miRNAome	Siero, CSF	NGS, qRT-PCR	27–88	Diagnostico, prognostico	Zaharieva et al., 2013
Transcriptoma	Sangue, fibroblasti	L1000, microarray, RT-PCR	65	Diagnostico	Walter et al., 2018
Metabolomica	Urina, plasma	1H-NMR, GC/MS, LC/MS	130–491	Diagnostico, prognostico	Abela et al., 2019
Creatinina	Siero	Analisi biochimica standard	21–238	Diagnostico, prognostico	Crawford et al., 2019

Tabella 1. Abbreviazioni: CSF, liquido cerebrospinale; NfL, neurofilamento leggero; pNfH, neurofilamento pesante fosforilato; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

ANALISI PROTEOMICA

Ruolo delle scienze omiche nella scoperta di biomarcatori

Negli ultimi anni, le scienze omiche hanno trasformato la scoperta di biomarcatori, permettendo l'analisi sistematica di molteplici livelli di regolazione biologica in patologie complesse come tumori e malattie neurodegenerative (Dong et al. 2025). L'approccio multi-omico, che integra dati genomici, trascrittomici, proteomici e metabolomici, aumenta la capacità di identificare firme molecolari significative e riproducibili rispetto ai singoli marker tradizionali. La proteomica occupa una posizione centrale nel panorama omico poiché analizza direttamente le proteine, che spesso riflettono meglio i processi biologici effettivi rispetto al solo dato genetico o trascrittomico. La spettrometria di massa è la tecnologia di riferimento per queste analisi: piattaforme ad alta risoluzione consentono di identificare e quantificare migliaia di proteine da fluidi biologici complessi, fornendo informazioni su variazioni proteiche legate a stati di malattia o a risposte terapeutiche (Aebersold et al. 2016). L'integrazione dei dati omici richiede strumenti bioinformatici avanzati e modelli di machine learning per gestire l'elevata dimensionalità e la complessità dei dataset generati. Metodi recentemente proposti combinano profili proteomici con reti di interazione tra proteine e informazioni cliniche per migliorare la rilevazione di biomarcatori specifici e la comprensione dei meccanismi di malattia (Park et al. 2025).

Ruolo delle scienze omiche nella SMA

Le scienze omiche rappresentano oggi un approccio fondamentale per la comprensione della fisiopatologia della SMA e per l'identificazione di nuovi biomarcatori utili alla stratificazione prognostica e al monitoraggio della risposta terapeutica (Yan et al., 2025). In particolare, l'integrazione multi-omica di dati genetici, proteomici e metabolomici consente una caratterizzazione più completa dei meccanismi biologici alla base della malattia rispetto all'utilizzo di singoli biomarcatori isolati (Corti, 2025). Recenti studi di profilazione multi-omica del liquido

cerebrospinale (CSF) hanno dimostrato che i pazienti con SMA presentano profili molecolari distinti rispetto ai controlli sani, con alterazioni coerenti in numerosi pathway biologici coinvolti nella neurodegenerazione e nella risposta infiammatoria (Zandl-Lang et al., 2025). Tali evidenze suggeriscono che i biomarcatori proteomici potrebbero integrare quelli già consolidati, come la catena leggera dei neurofilamenti, contribuendo a una valutazione più accurata dello stato di malattia, soprattutto nei pazienti trattati precocemente (Corti, 2025). La tabella 2 mostra una panoramica degli studi che hanno utilizzato scienze omiche per lo studio dei biomarcatori.

Autore, anno	Coorte di pazienti	Campione	Tecnica	Risultati principali
Finkel et al., 2012	108 SMA I–III + 22 controlli	Plasma, urine	Proteomica iTRAQ-MS; Metabolomica QTOF-MS	97 proteine plasmatiche, 59 metaboliti plasmatici, 44 urinari; osteopontina, DPP-IV, fetuina-A correlano con HFMSE
Kessler et al., 2020	10 SMA II–III + 10 controlli	CSF	Proteomica LC-MS	Cluster proteici associati alla risposta: ↑ NPTX1, SEMA7A, CPE, COL6A1 nei non-responders; ↓ CDH18 nei responders
Bianchi et al., 2021	10 SMA 1 + 10 controlli	CSF	Proteomica	↑ APOA1, APOE e TTR dopo terapia
Deutsch et al., 2021	25 SMA 1-3 in età pediatrica + 25 controlli	Urine, siero e CSF	Metabolomica	Nessun cambiamento nel metaboloma dopo terapia, livelli urinari di creatinina ridotta in pazienti SMA
Errico et al., 2022	27 SMA in età pediatrica	CSF	Metabolomica	Aumento del rate metabolico di glucosio in SMA 1, aumento dei chetoni in SMA 2, aumento del metabolismo degli amminoacidi in SMA 3 dopo trattamento
Schorling et al., 2022	SMA + controlli	Plasma	Proteomica MS	Cathepsin D alterata nei pazienti SMA; livelli associati alla risposta al trattamento
Beaudin et al., 2023	49 SMA I–III	CSF	Proteomica Olink (1113 proteine) + ML	ARSB, ENTPD2, NEFL, IFI30 predittive di miglioramento motorio (accuratezza ~79.6%)
Faravelli et al., 2023	10 SMA III (22 mesi)	CSF	Proteomica + Metabolomica nLC-HRMS	26 proteine modulate; ↓ SEMA6A, ↑ COL1A2, GRIA4; alterazioni metabolismo amminoacidi
Lu et al., 2024	40 SMA II–III	CSF	Metabolomica LC-MS	135 metaboliti associati ai tipi clinici; N-myristoyl arginine correlato con HFMSE
Zandl-Lang et al., 2025	13 SMA + 15 controlli	CSF	Multi-omics	>800 proteine e ~400 metaboliti/lipidi; profili lipidici parzialmente normalizzati dal trattamento

Tabella 2. Abbreviazioni: iTRAQ-MS: Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation–Spettrometria di Massa; QTOF-MS: Quadrupole Time-of-Flight Spettrometria di Massa; nLC-HRMS: nano-liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry; DPP-IV: dipeptidil-peptidasi IV; APOA1: apolipoproteina A1; APOE: apolipoproteina E; TTR: transtiretina; NPTX1: neuronal pentraxin 1; SEMA7A: semaforina 7A; SEMA6A: semaforina 6A; CPE: carbossipeptidasi E; COL6A1: collagene di tipo VI catena alfa 1; COL1A2: collagene di tipo I catena alfa 2; CDH18: caderina 18; ARSB: arilsulfatasi B; ENTPD2: ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi 2; NEFL: neurofilamento a catena leggera; IFI30: interferon gamma inducible protein 30; GRIA4: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4.

Ruolo dell'intelligenza artificiale e del machine learning nell'analisi dei dati omici

L'elevata dimensionalità e complessità dei dataset omici richiede approcci computazionali avanzati, nei quali l'intelligenza artificiale (IA) e il machine learning svolgono un ruolo centrale. Questi metodi consentono di integrare vari livelli di informazione molecolare e di individuare pattern biologici non evidenti con tecniche statistiche classiche, migliorando la caratterizzazione delle sottopopolazioni di pazienti e dei meccanismi patogenetici (Srivastava et al. 2012). L'IA è stata altresì impiegata per generare reti molecolari predittive, integrando informazioni da database biologici per individuare nuovi geni o proteine potenzialmente coinvolti nella patogenesi delle malattie. In uno studio recente, un algoritmo basato su IA ha previsto nuove associazioni geniche in SMA, le quali sono state poi validate sperimentalmente in modelli murini, dimostrando come i modelli computazionali possano guidare nuove scoperte biologiche (Tapken et al. 2024).

MATERIALI E METODI

Caratteristiche dei pazienti

Sono stati arruolati in questo studio pazienti affetti da SMA geneticamente determinata (il numero di copie del gene SMN2 era disponibile per tutti i pazienti, tranne uno). I pazienti, trattati con nusinersen, provenivano da quattro centri di malattie neuromuscolari italiani di III livello (IRCCS Istituto Gaslini di Genova, Centro Nemo di Milano, Ospedale Bambino Gesù di Roma e Policlinico G. Martino di Messina). Nusinersen è stato somministrato ai pazienti seguendo il protocollo standard.

Nel giorno della somministrazione del farmaco, sono state acquisite le misurazioni antropometriche, le informazioni sul supporto ventilatorio (necessità di ventilazione non invasiva o tracheostomia) e sulla modalità di alimentazione (orale, sondino nasogastrico o gastrostomia). Inoltre, le valutazioni funzionali sono state eseguite da fisioterapisti qualificati in ciascun centro.

I pazienti con SMA tipo 1 sono stati valutati mediante la scala CHOP INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders), la scala comprende 16 item con un punteggio totale tra 0 e 64 (Glanzman et al. 2010).

I pazienti con SMA tipo 2 e SMA tipo 3 sono stati valutati tramite la HFMSE (Hammersmith Functional Motor Scale – Expanded), questa è una scala di 33 item che valuta le abilità motorie. Il punteggio della scala va da un valore minimo di 0 a un massimo di 66 punti, i punteggi più alti indicano una migliore funzione motoria (O'Hagen et al. 2007).

I pazienti sono stati classificati come *Responder* (R) e *non-Responder* (non-R) in base alle modifiche nei punteggi della funzione motoria dal tempo T0 al tempo T302, seguendo criteri precedentemente descritti. In particolare, sono stati definiti *Responder* i pazienti con SMA1 che mostravano un aumento di 4 punti nel punteggio CHOP, e i soggetti con SMA2 e SMA3 che

raggiungevano un miglioramento di 3 punti nella scala HFMSE al tempo T302 (Pechmann et al. 2022).

Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e le linee guida ICH GCP. Tutti i soggetti e/o i loro tutori hanno fornito il consenso informato scritto per l'analisi dei campioni biologici, a seguito dell'approvazione dei comitati etici locali (Prot. SMALiQ_2022, 503/2022 - id 12319).

Preparazione dei campioni e analisi proteomica

Nel giorno della somministrazione di nusinersen, i campioni di liquido cerebrospinale (CSF) sono stati raccolti dopo un periodo di digiuno di 4–6 ore e conservati a -80 °C in ciascun centro. Ai fini di questo studio, solo i CSF raccolti al tempo 0 (T0; prima della prima somministrazione intratecale di nusinersen) e al giorno 302 (T302; prima della sesta infusione) sono stati centralizzati presso l'IRCCS Gaslini e successivamente sottoposti ad analisi proteomica.

Cento microlitri di CSF sono stati denaturati, ridotti e alchilati in 100 microlitri di soluzione tampone iST-LYSE (PreOmics) per 10 minuti a 95 °C, 1000 rpm. Le proteine sono state isolate mediante il metodo PAC (*protein aggregation capture*) (Batth et al. 2019).

L'aggregazione proteica è stata indotta mediante l'aggiunta del 70% di acetonitrile (ACN), per catturare le proteine aggregate sono state aggiunte 200 µg di perline magnetiche (*magnetic beads*). Le *beads* magnetiche sono state trattenute tramite magneti e il surnatante è stato rimosso. Le *beads* sono state lavate una volta con 1 ml di acetonitrile, seguite da due lavaggi con 1 ml di etanolo al 70%. Le *beads* lavate sono state risospese in 100 µl di TRIS 25 mM pH 8 e le proteine catturate sono state digerite overnight (O.N.) a 37 °C con 0,7 µg di tripsina e 0,3 µg di LysC. I peptidi ottenuti sono stati desalificati con Stage-Tips (Kulak et al. 2014) e analizzati mediante un sistema di nano-cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiato a spettrometria di massa tandem (*nano-*

Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry system - nano-UHPLC-MS/MS), utilizzando un Ultimate 3000 RSLC collegato a uno spettrometro di massa Orbitrap Fusion Tribrid. L'eluizione è stata eseguita utilizzando una colonna EASY spray ($75\ \mu\text{m} \times 50\ \text{cm}$, dimensione particelle $2\ \mu\text{m}$, Thermo Scientific) a un flusso di $250\ \text{nl/min}$, con un gradiente non lineare di 100 minuti che consiste in un aumento dal 7 al 27% della soluzione B (80% ACN e 20% H_2O , 5% DMSO, 0,1% FA) in 57 minuti, seguito da un ulteriore aumento al 45% di B in 15 minuti, un lavaggio di 1 minuto all'80% di B e una riequilibratura di 20 minuti al 2% di B. Le scansioni *Mass Spectrometry* (MS) sono state acquisite a una risoluzione di 120.000 tra 375 e 1.500 m/z , con un target AGC di $4,0 \times 10^5$ e un tempo massimo di iniezione di 50 ms. La determinazione avanzata dei picchi (Advanced Peak Determination) è stata abilitata per le misurazioni MS1. Gli spettri MS/MS sono stati acquisiti nel linear ion trap (modalità rapid scan) con un target AGC di $3,0 \times 10^4$ e un tempo massimo di iniezione di 30 ms. Per la selezione dei precursori, sono stati prioritizzati i segnali meno abbondanti nei tre intervalli 375–575 m/z , 574–775 m/z e 774–1500 m/z . È stata utilizzata l'isolazione quadrupolare con una finestra di isolamento di 0,7 m/z , e l'esclusione dinamica (Dynamic Exclusion) è stata impostata a 25 s. L'HCD è stata eseguita con un'energia di collisione del 30%. Il software MaxQuant versione 1.6.17.0 è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati (Cox et al. 2008). Il tasso di falsi positivi (FDR) è stato impostato a 0,01 per l'identificazione di proteine, peptidi e corrispondenze peptide-spettro (PSM). Per l'identificazione dei peptidi era richiesto un minimo di 6 amminoacidi. Il motore Andromeda, incorporato in MaxQuant, è stato utilizzato per cercare gli spettri MS/MS nel database umano Uniprot (release UP000005640_9606, dicembre 2020). Nella fase di elaborazione, le modificazioni variabili considerate sono state Acetilazione (terminale N della proteina), Ossidazione (M) e Deamidazione (NQ); mentre la Carbamidometilazione (C) è stata selezionata come modificazione fissa. Le intensità di quantificazione sono state calcolate tramite l'algoritmo predefinito fast MaxLFQ, con l'opzione "match between runs" attivata.

Validazione funzionale dei biomarcatori identificati in modelli di *C. elegans*

Sono stati utilizzati quattro diversi ceppi mutanti del gene *smn-1*, ortologo in *C. elegans* del gene *Smn1* responsabile della SMA, per ricapitolare lo spettro fenotipico della SMA umana, dalla forma più grave a quella più lieve. I quattro ceppi mutanti per *smn-1* erano: NA355 *smn-1(ok355)* (KO delezione completa), NA2335 *smn-1(gk118916)* (ipomorfo grave), NA1259 *smn-1(cb131)* (ipomorfo lieve) e NA1355 *smn-1(gbIs4 MNs RNAi)* (silenziamiento motoneurone-specifico). Sono stati testati alcuni biomarcatori identificati dall'analisi proteomica, tali marcatori omici, sono stati quantificati nel modello SMA severo utilizzando RT-qPCR. Sono stati quindi condotti esperimenti di genetica nei modelli SMA per validare questi biomarcatori in vivo, modulandone i livelli attraverso l'over-espressione genica in tutti i neuroni (ceppo creato in laboratorio) o la mutazione del gene coinvolto (ceppo ottenuto dallo stock center).

Algoritmo Machine Learning

L'algoritmo di machine learning *Random Forest* (RF), precedentemente applicato a dati di metabolomica e proteomica per analisi di classificazione e regressione (Bahado-Singh et al. 2019, Alakwaa et al. 2018), è stato adottato per classificare i tipi di SMA sulla base dei livelli di espressione proteica al tempo zero. I modelli di Random Forest sono stati addestrati per la classificazione dei sottotipi di SMA utilizzando i dati proteomici ottenuti al T0. Tutti i passaggi sono stati eseguiti nel software libero R, utilizzando i pacchetti caret (ver. 6.0–94) e Random Forest (ver. 4.7–1.1).

Per studiare gli effetti di diverse strategie di ottimizzazione degli iperparametri sulla precisione di classificazione ottenuta, sono stati variati: il rapporto di partizionamento dei dati, mtry (numero di caratteristiche selezionate casualmente a ogni split), numero di alberi e numero massimo di nodi. Oltre ai diversi set di parametri, nelle ottimizzazioni sono stati inclusi cross-validation e post-processing (normalizzazione, trasformazione, scaling) dei dati di training e test dopo la partizione,

per evitare possibili perdite di dati. Al termine delle ottimizzazioni, i dati proteomici al T0 normalizzati e scalati sono stati utilizzati e suddivisi in dataset di training e test con rapporti rispettivamente dell'80% e del 20%. L'addestramento del modello è stato effettuato usando 1000 alberi e numero massimo di nodi impostato a 3. La precisione di classificazione del modello addestrato sui dati di test è stata calcolata confrontando le classi SMA reali con quelle predette. La lista delle variabili importanti è stata registrata per il modello addestrato, estraendo le prime 30 caratteristiche ordinate per mean decrease in Gini coefficient. Ogni passaggio, dalla partizione dei dati alla selezione delle variabili importanti, è stato ripetuto 100 volte, impostando il seed su numeri da 1 a 100. Infine, è stato ottenuto un insieme di caratteristiche comuni a tutte le liste delle prime 30 variabili importanti dei 100 modelli addestrati.

Analisi statistica

Per le analisi statistiche successive sono stati utilizzati i valori di intensità trasformati in log2 e centrati sulla mediana. È stata utilizzata una PERMANOVA con metodo di distanza Euclidea per testare la significatività rispetto a sottotipo, sesso, età, numero di copie del gene *SMN2* e indice di massa corporea (BMI). Per il confronto della composizione proteica dei campioni dei sottotipi SMA1, SMA2 e SMA3 prima del trattamento, è stata utilizzata l'analisi della covarianza (ANCOVA), correggendo per età. Le caratteristiche con p-value grezzo < 0,05 sono state considerate significative e utilizzate per il clustering in ciascun confronto a coppie.

I confronti tra pazienti SMA1, SMA2 e SMA3 prima e dopo il trattamento sono stati effettuati individualmente, utilizzando il t-test appaiato a due code, e i p-value ottenuti sono stati corretti per test multipli con il metodo Benjamini-Hochberg. I *fold change* in log2 nei responder e non-responder sono stati calcolati sottraendo i valori a T302 da quelli a T0 per ciascun sottotipo di SMA, e per il confronto è stato utilizzato il t-test a due code non appaiato. Per la significatività sono stati considerati i p-value grezzi. Per ciascun confronto a coppie, i risultati sono stati rappresentati

tramite volcano plot utilizzando EnhancedVolcano (ver. 1.16.0). L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata eseguita con FactoMineR (ver. 2.9) e le visualizzazioni con diverse coppie di dimensioni sono state ottenute usando il pacchetto factoextra (ver. 1.0.7). Per l'analisi di correlazione tra età e nove biomarcatori candidati, è stata effettuata la correlazione di Spearman e i p-value ottenuti sono stati corretti con il metodo Benjamini-Hochberg.

RISULTATI

Disegno dello studio e descrizione della popolazione

Sono stati arruolati nello studio sessantuno pazienti affetti da SMA confermata geneticamente, trattati con nusinersen, di cui 19 erano soggetti affetti da SMA1, 19 SMA2 e 23 SMA3. Le caratteristiche demografiche e i dati clinici dei pazienti sono riportati nella Tabella 3. L'età mediana al T0 era di 2,1 anni (IQR: 0,7–4,9) nei pazienti con SMA1, 7,7 anni (IQR: 2,3–11,8) nei pazienti con SMA2 e 15,3 anni (IQR: 7–29,3) nei pazienti con SMA3. Sono state riscontrate differenze significative nell'età al T0 tra i diversi tipi di SMA (SMA1 vs SMA2, $p < 0,005$; SMA1 vs SMA3, $p < 0,0001$; SMA2 vs SMA3, $p < 0,005$; test di Kruskal-Wallis con confronti multipli), mentre il sesso non differiva tra i gruppi (test del chi-quadrato di Pearson, $p = 0,927$). Al tempo zero, il valore mediano della scala CHOP nella SMA1 era 13/64 (IQR: 3,7–24), mentre i punteggi mediani della HFMSE erano 9/66 (IQR: 2,7–13) nei pazienti con SMA2 e 47/66 (IQR: 29–58) nei pazienti con SMA3 (Fig. 8-9).

	SMA 1 (n= 19)	SMA 2 (n=19)	SMA 3 (n=23)	Totale (n=61)
Età al T0 (mediana, Q1-Q3)	2.1 (0.7–4.9)	7.7 (2.3–11.8)	15.3 (7-29.3)	6,9 (2.3–13)
Sesso (F/M)	11/8	12/7	12/11	30/26
Copie di SMN2 (n, %)				
2 SMN2	17 (89%)	2 (10%)	3 (13%)	22 (36%)
3 SMN2	2 (10%)	17 (89%)	10 (43%)	29 (48%)
>3 SMN2	0	0	9 (39%)	9 (15%)
Responders (n, %)	11 (52%)	6 (31%)	6 (23%)	23 (37%)
Supporto respiratorio (n, %)				
Ventilazione non invasiva	7 (37%)	8 (42%)	1 (4%)	16 (26%)
Tracheostomia	7 (37%)	1 (5%)	0	8 (13%)
Nutrizione (n, %)				
Orale	7 (37%)	19 (100%)	23 (100%)	49 (80%)
Sondino naso-gastrico	8 (42%)	0	0	8 (13%)
Gastrostomia	4 (21%)	0	0	4 (6%)

Tabella 3. Caratteristiche demografiche e dati clinici dei pazienti.

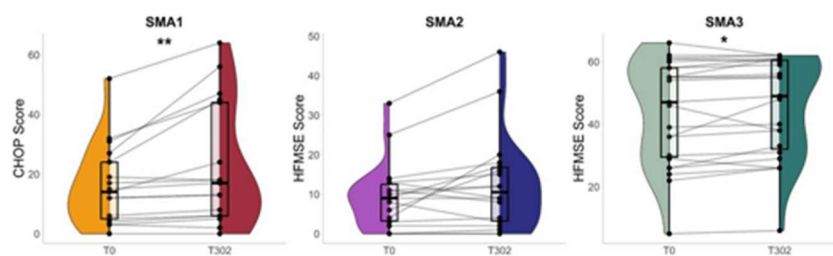


Figura 7. Variazioni dei punteggi CHOP nei pazienti con SMA1 (n = 19) e dei punteggi HFMSE nei pazienti con SMA2 (n = 19) e SMA3 (n = 23) prima (T0) e dopo (T302) il trattamento con nusinersen. I grafici mostrano i punti corrispondenti al punteggio di ciascun campione e i dati appaiati sono collegati da linee. Il *violin plot* rappresenta la distribuzione dei punteggi tramite la densità, mentre i *box plot* mostrano l'intervallo interquartile; il box ha i lati corrispondenti al quartile inferiore e superiore, con la mediana rappresentata da una linea orizzontale. La significatività è stata testata mediante il test di Wilcoxon per campioni appaiati. I risultati dei test di significatività sono indicati con “*” per p-value < 0,05 e “**” per p-value < 0,01.

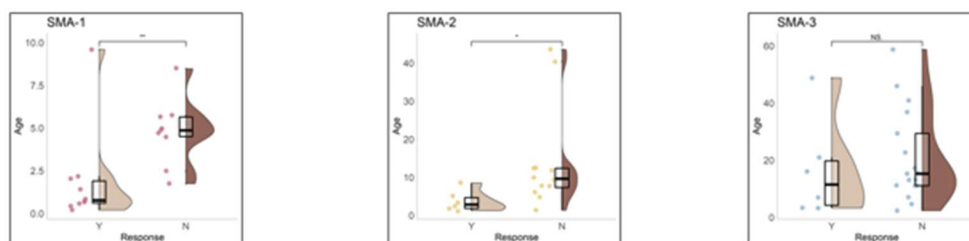


Figura 8.

SMA 1: *responders* (+4 punti alla scala CHOP al T302). 10/19 (52%).

SMA 2: *responders* (+3 punti alla scala HFMSE al T302). 6/19 (31%)

SMA 3: *responders* (+3 punti alla scala HFMSE al T302). 6/23 (26%)

Identificazione di potenziali biomarcatori prognostici mediante *machine learning*

L'analisi proteomica al T0 ha identificato 1625 proteine. L'analisi PCA (*Principal component analysis*) mostra una separazione dei profili proteomici nei diversi sottotipi di SMA (Fig. 9).

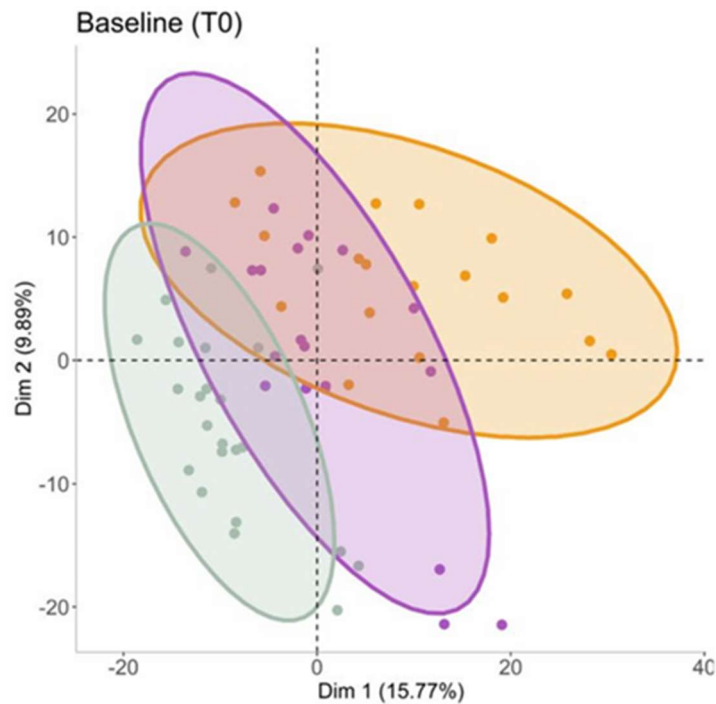


Figura 9 Grafico PCA mostra distinti pattern di clustering dei profili proteomici di SMA1 (arancione), SMA2 (viola) e SMA3 (verde) al T0. Nei grafici PCA, ogni campione è rappresentato da un punto e le ellissi corrispondono agli intervalli di confidenza al 95% per ciascun sottotipo.

Il test PERMANOVA, condotto sulla distanza euclidea dei dati proteomici al T0, ha rivelato che solo il sottotipo di SMA ($F = 5,1894$; $p = 0,001$) e l'età ($F = 3,4401$; $p = 0,001$) sono in grado di spiegare in modo significativo la varianza dei dati, mentre gli altri fattori — sesso, BMI, numero di copie di SMN2 e stato di risposta — non sono risultati significativi ($p > 0,05$). Pertanto, nell'analisi di abbondanza differenziale, l'informazione sull'età è stata utilizzata come fattore confondente. È stato quindi utilizzato un approccio di machine learning, l'algoritmo di classificazione Random Forest (RF), per verificare se l'espressione proteica al T0 potesse essere utilizzata per predire i sottotipi di SMA. Tutti i modelli RF addestrati hanno ottenuto un'accuratezza pari a 1, indicativa di overfitting, e lo stesso valore di accuratezza è stato ottenuto anche nella predizione sui dataset di test. Per eliminare i possibili effetti del post-processing dei dati e dell'ottimizzazione (hyper-tuning) dei parametri RF durante l'addestramento dei modelli, che potrebbero causare data leakage e

overfitting, sono state seguite diverse strategie, tra cui: la suddivisione del dataset grezzo in set di training e di test con applicazione indipendente delle procedure di normalizzazione, la variazione del rapporto tra dataset di training e di test e la modifica della dimensione delle griglie per l'ottimizzazione degli iperparametri. Tutti i modelli hanno fornito in modo coerente un'accuratezza pari a 1 sia sui dataset di training sia su quelli di test, a dimostrazione della forza dei dati proteomici nella classificazione dei sottotipi di SMA. Infine, per ridurre ulteriormente il potenziale bias del modello nella selezione delle caratteristiche per la classificazione, derivante dalla dimensione relativamente ridotta del campione, sono stati addestrati 100 diversi modelli RF variando i campioni nei dataset di training e di test, e sono state identificate le proteine comuni tra le prime 30 caratteristiche, ordinate in base alla riduzione media del coefficiente di Gini di tutti i 100 modelli RF. Di conseguenza, 9 proteine sono risultate caratteristiche comuni nei 100 modelli: *heat shock protein 90 beta family member 1* (HSP90B1), *serpin family F member 2* (SERPINF2), *Golgi membrane protein 1* (GOLM1), *contactin 1* (CNTN1), *PVR cell adhesion molecule* (PVR), *beta-1,4-glucuronyltransferase 1* (B4GAT1), *cathepsin F* (CTSF), *neurexin 3* (NRXN3) e *chromosome 16 open reading frame 89* (C16orf89) (Fig. 10). Il numero massimo di modalità per l'addestramento del modello è stato impostato a 3 e si è osservato che la classificazione dei tre sottotipi di SMA può essere ottenuta utilizzando combinazioni di due proteine, selezionate sulla base dei loro profili di abbondanza differenziale nei sottotipi di SMA. Tra le 9 proteine selezionate, CNTN1, B4GAT1, NRXN3 e C16orf89 sono state identificate come proteine chiave in grado di distinguere nettamente la forma più grave, SMA1, da quelle più lievi (Fig. 10). Sono state quindi valutate le correlazioni tra l'età e le 9 proteine sopra elencate. Ad eccezione di SERPINF2 e CTSF, 7 di esse mostrano una correlazione moderata e significativa con l'età ($p_{adj} < 0,05$). Tra queste, solo GOLM1 ($\rho = -0,45$) presenta una correlazione negativa, mentre le altre 6 proteine — HSP90B1 ($\rho = 0,61$), CNTN1 ($\rho = 0,48$), B4GAT1 ($\rho = 0,77$), PVR ($\rho = 0,56$), NRXN3 ($\rho = 0,47$) e C16orf89 ($\rho = 0,55$) mostrano associazioni positive.

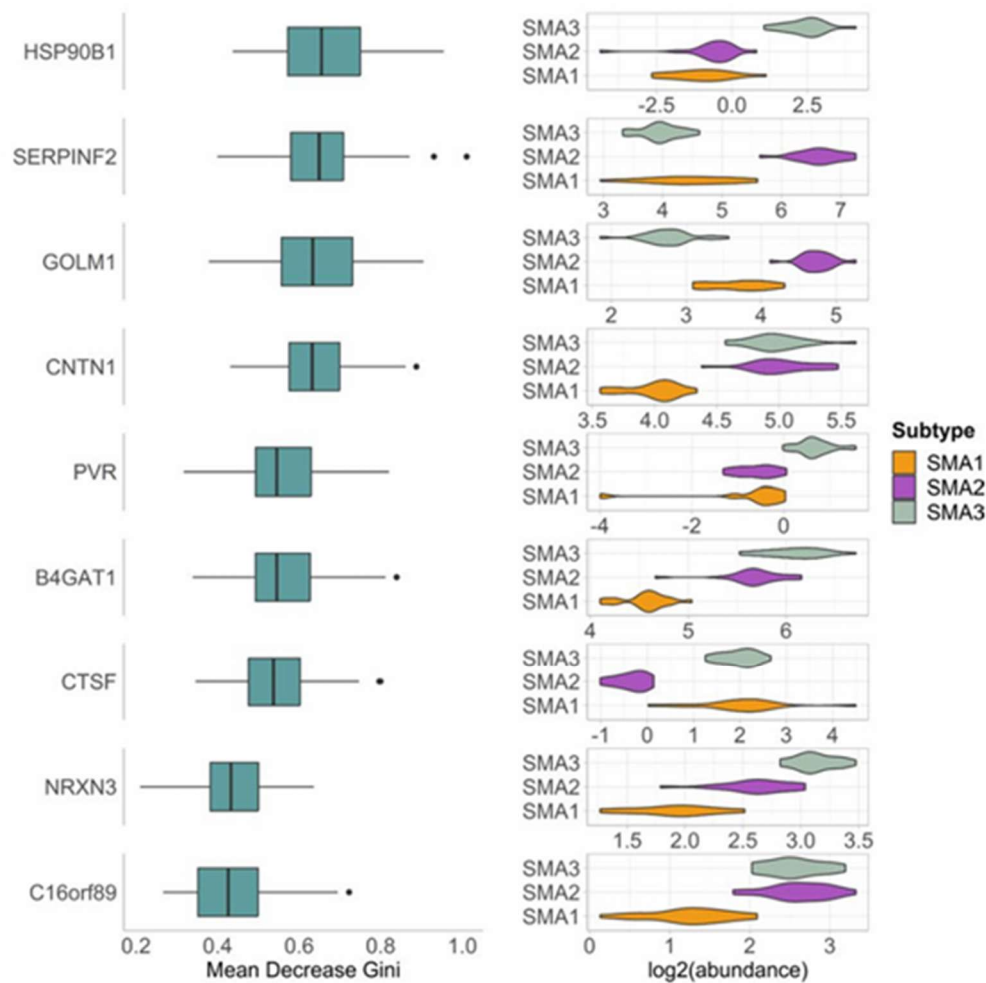


Figura 10. Nove proteine tra le prime 30 caratteristiche ottenute da 100 diversi modelli di Random Forest per la classificazione dei tipi di SMA al T0. Sul lato sinistro della figura, le distribuzioni dei punteggi di importanza (basati sulla riduzione media dell'indice di Gini) di ciascuna proteina, derivate dai 100 modelli, sono illustrate mediante box plot. Sul lato destro, l'abbondanza log2 di ciascuna proteina in ciascun tipo di SMA al T0 è rappresentata mediante violin plot. I box plot mostrano l'intervallo interquartile e gli outlier sono indicati da punti neri.

Successivamente è stata testata l'espressione e la possibile modulazione nei modelli SMA di *C. elegans* degli ortologhi di CNTN1 e NRXN3. Gli ortologhi di CNTN1 in *C. elegans* sono *lad-2* e *rig-6*, mentre l'ortologo di NRXN3 è *nrx-1*. Questi biomarcatori identificati sono stati quantificati utilizzando la RT-qPCR nel modello più grave di SMA in *C. elegans*, il KO *ok355*, che è quello che più ricorda la SMA di tipo 1 e in cui è stata osservata una forte downregolazione dell'espressione di *rig-6* e *lad-2* rispetto al wild-type ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$, rispettivamente) e up-regolazione di *nrx-1* ($p < 0,05$). Vista la nota funzione di *Smn1* nel regolare lo splicing abbiamo anche verificato

l'alterazione nello splicing delle due isoforme *nrx-1 ex24* e *nrx-1Dex24* per RT-PCR semiquantitativa, osservando un forte incremento della sola forma con l'esone incluso ($p < 0,05$). Abbiamo quindi confermato nei modelli di SMA l'alterazione nell'espressione di proteine e di isoforme trovate alterate nei pazienti. Sfruttando la potente genetica di *C. elegans*, abbiamo effettuato e caratterizzato la modulazione di *nrx-1* nei modelli di SMA, essendo questo l'unico biomarcatore risultato up-regolato nel KO per *Smn-1*. Attraverso la delezione (allele *wy778*) o l'over-espressione in tutti i neuroni di *nrx-1* abbiamo testato se potessimo modificare gli effetti devastanti causati dal silenziamento di *Smn-1*, come modello di forma severa di degenerazione, monitorando la vitalità dei neuroni marcati con proteine fluorescenti verdi in animali trasparenti viventi e la locomozione, come numero di piegamenti del corpo su piastra. In questi esperimenti non abbiamo però osservato alcuna modifica dei fenotipi tipici nel ceppo silenziato nei soli motoneuroni *gbIs4(MNs RNAi)* in termini di neurodegenerazione o di movimento alterato (Fig. 11).

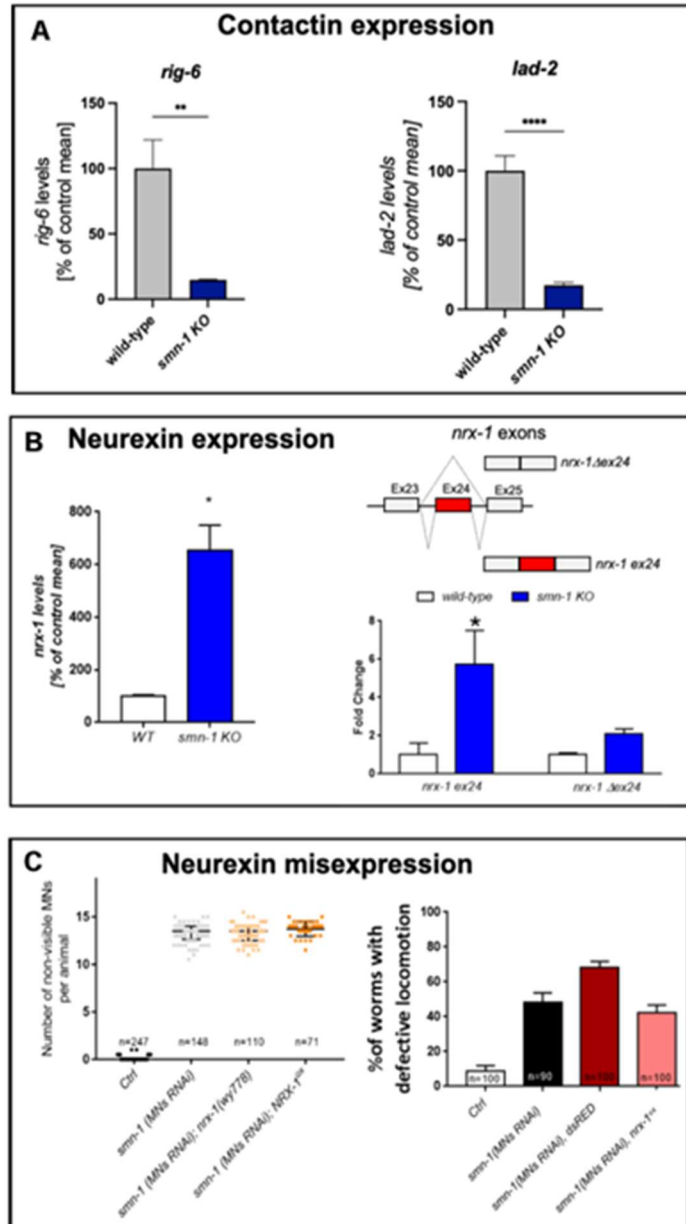


Figura 11. Validazione dei biomarcatori proteici identificati dalle analisi omiche. (A) L'analisi dell'espressione di Contactina (CNTN1) (ortologi *rig-6* e *lad-2*) mostrano la loro downregolazione nel mutante *ok355*. (B) L'analisi dell'espressione di Neurexina mostra, nel modello *Smn1* KO, l'upregolazione di *nrx-1* e l'alterazione dello splicing dell'esone 24. (C) Assenza di effetto della modulazione di *nrx-1* sulla degenerazione neuronale.

Modificazioni del profilo proteomico indotte dal trattamento con nusinersen al T302

L'analisi proteomica al T302 ha identificato 1399 proteine. Inizialmente, tutti i campioni di ciascun gruppo, indipendentemente dallo stato di risposta, sono stati inclusi nell'analisi delle variazioni proteiche tra T0 (prima del trattamento) e T302 (dopo 302 giorni di trattamento). Quando i grafici PCA sono stati generati utilizzando diverse coppie di assi, è stata osservata una separazione più marcata esaminando dimensioni diverse dalle prime due, poiché i risultati della PCA possono essere influenzati da bias originati in una qualsiasi delle fasi precedenti, dalla raccolta dei dati fino al termine dell'elaborazione (Elhaik et al. 2022) (Fig. 12).

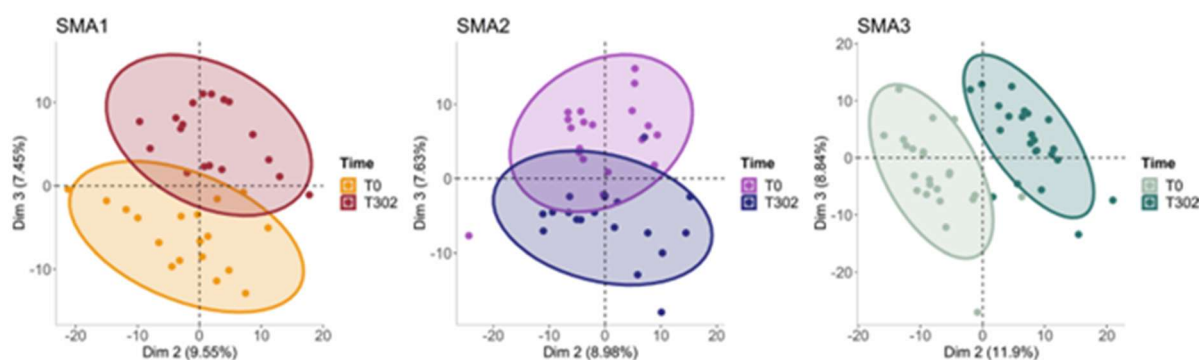


Figura 12. La variazione nel clustering basato sul proteoma tra T0 e T302 è mostrata per i pazienti con SMA1, SMA2 e SMA3, sulla base delle combinazioni della seconda e terza dimensione. I grafici PCA mostrano la distribuzione e il clustering dei campioni, e le ellissi corrispondono agli intervalli di confidenza al 95% per ciascun punto temporale.

Quando le variazioni significative dei profili proteomici in risposta al trattamento con nusinersen sono state analizzate confrontando T0 e T302 separatamente per ciascun sottotipo di SMA, sono state identificate 147, 135 e 289 proteine con variazioni significative rispettivamente in SMA1, SMA2 e SMA3. I volcano plot evidenziano le proteine down-regolate e up-regolate al T302 rispetto al basale (Fig. 13), mentre le heatmap mostrano il clustering gerarchico delle proteine che variano in modo significativo (Fig. 14).

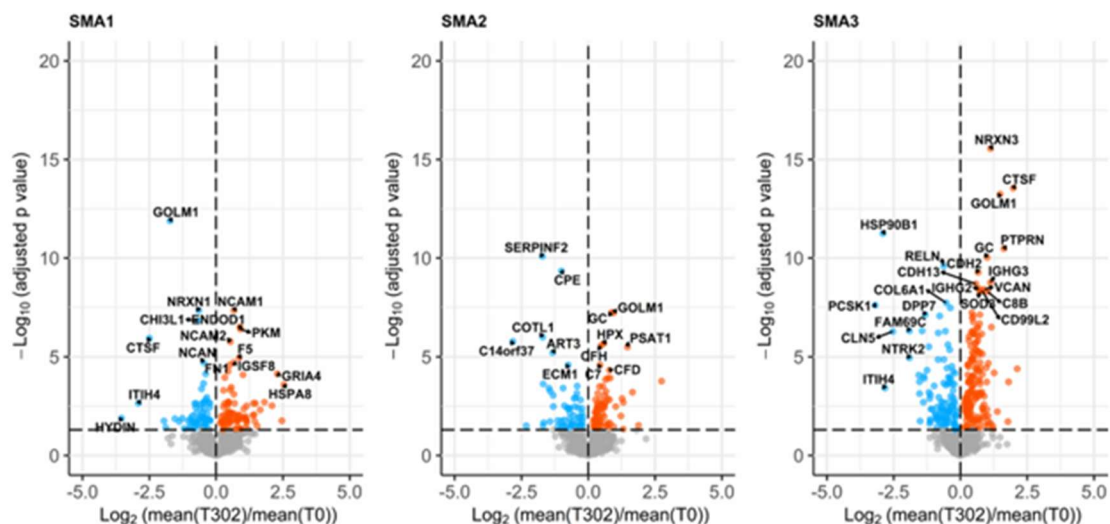


Figura 13. I volcano plot sono utilizzati per mostrare le proteine down-regolate o up-regolate dopo il trattamento con nusinersen nei campioni di SMA1, SMA2 e SMA3. Le proteine che presentano variazioni significative ($p_{adj} < 0,05$) sono evidenziate nei volcano plot in base alla loro maggiore (arancione) o minore (azzurro) abbondanza al T302 rispetto al T0.

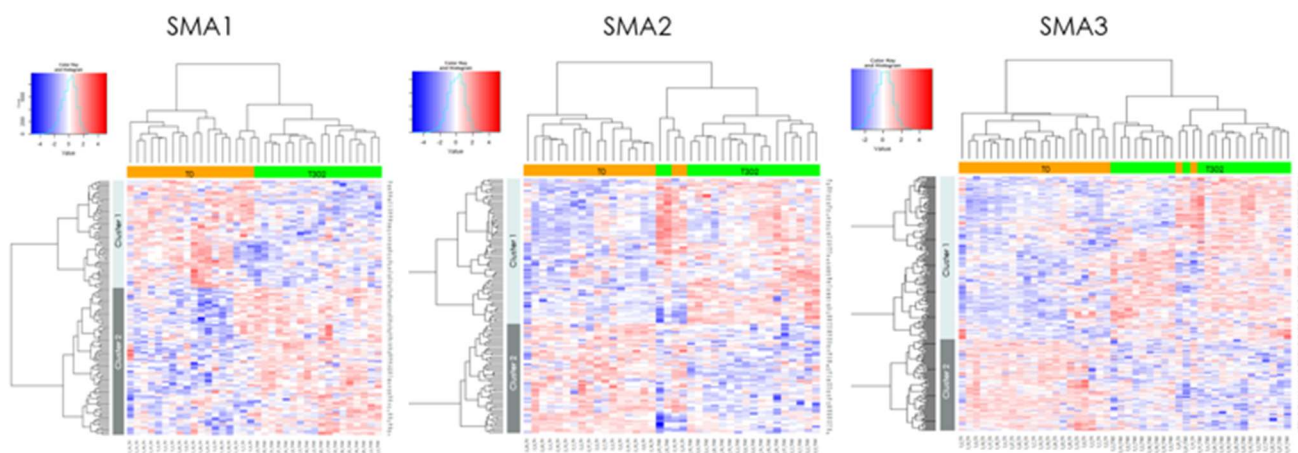


Figura 14. Clustering gerarchico dei campioni appartenenti ai gruppi SMA1, SMA2 e SMA3, utilizzando come base le proteine significativamente espresse in modo differenziale (DEP) identificate confrontando i livelli proteici al tempo T0 con quelli al tempo T302. I campioni sono raggruppati sull'asse x, mentre le proteine sono raggruppate sull'asse y in base ai profili di abbondanza. Le basse e alte abbondanze proteiche sono rappresentate rispettivamente da sfumature di colore blu e arancione. Le proteine sono state suddivise in due cluster in base alla loro abbondanza nei diversi time point.

L'analisi di arricchimento *Gene Ontology* (GO) dei processi biologici (BP) è stata eseguita per investigare i pathway delle proteine espresse in modo differenziale (DEP) dopo il trattamento con nusinersen. Complessivamente, è stata osservata una risposta comune in tutti i sottotipi di SMA per le proteine down-regolate dal trattamento, con i principali pathway maggiormente rappresentati correlati all'assonogenesi (termini GO: regolazione dell'assonogenesi, guida assonale, sviluppo dell'assone) (Fig. 15 a–c). Le proteine associate all'assonogenesi includevano componenti della famiglia delle semaforine (SEMA6A, SEMA7A, SEMA4B), *leucine-rich repeat and Ig domain containing 1* (LINGO1), *plexin-B2* (PLXNB2), *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM), *multiple EGF-like domains 8* (MEGF8), *dystroglycan 1* (DAG1) e *reelin* (RELN).

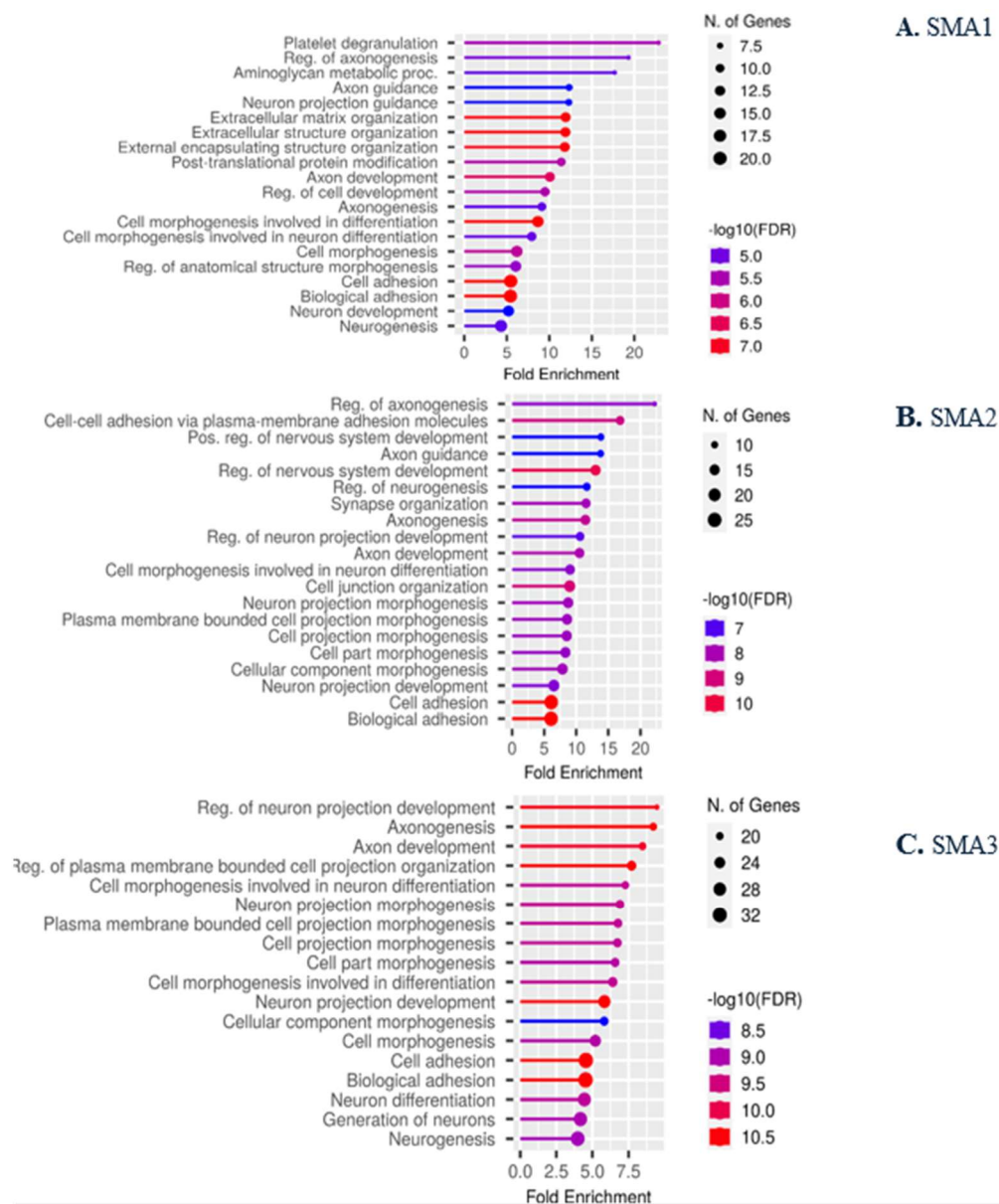


Figura 15. Le 20 principali vie GO legate ai processi biologici (BP). Queste vie risultano arricchite principalmente in DEP down-regolate (a–c), ottenute da due cluster per ciascuna heatmap. Sono mostrate mediante grafici a lollipop per ciascun tipo di SMA. L'arricchimento (*fold enrichment*) rappresenta il rapporto tra la percentuale di proteine corrispondenti nell'elenco di interrogazione associate a una determinata via e la percentuale dell'elenco di interrogazione rispetto al background. I colori delle barre corrispondono ai valori di p corretti per FDR (*false discovery rate*) per ciascuna via arricchita, mentre la dimensione dei punti è proporzionale al numero di proteine associate alla rispettiva via.

Oltre all'assonogenesi, nei soggetti SMA 1 sono risultate down-regolate le proteine espresse in modo differenziale associate ai processi biologici quali la degranulazione piastrinica e i processi metabolici degli aminoglicani. L'analisi di arricchimento delle vie biologiche delle proteine up-regolate dopo il trattamento con nusinersen ha rivelato risultati specifici per la SMA1 e un comportamento simile per i fenotipi più lievi SMA2 e SMA3 (Fig. 16 a-c). Nel proteoma dei pazienti SMA1 dopo il trattamento, i DEP up-regolati erano correlati al metabolismo del glucosio (termini GO: glicolisi canonica, rigenerazione del NADH, processi catabolici del glucosio verso il piruvato), includendo proteine quali la piruvato chinasi (PKM), l'enolasi 1 (ENO1), l'aldolasi, la fruttosio-bisfosfato aldolasi C (ALDOC) e la fosfoglicerato mutasi 1 (PGAM1). Nel proteoma di SMA2 e SMA3, i DEP up-regolati appartenevano principalmente a due cascate fortemente interconnesse, ovvero le vie della coagulazione e del complemento. Nel dettaglio, il proteoma dei soggetti SMA2 dopo il trattamento ha rivelato un aumento dei processi di coagulazione (termini GO: cascata di coagulazione proteica, coagulazione del sangue e fibrinolisi), identificati da proteine quali fibulina-1 (FBLN1), fattori della coagulazione II, IX e XII (F2, F9, F12), chininogeno-1 (KNG1), fibronectina-1 (FN1), *serpin family G member 1* (SERPING1), fibrinogeno A (FGA) e apolipoproteina E (APOE). Il proteoma dei pazienti SMA3 dopo il trattamento ha mostrato una maggiore attivazione del complemento (termini GO: regolazione dell'attivazione del complemento e risposta immunitaria umorale), includendo proteine quali le catene B e C di C1q (C1QB, C1QC), la catena beta del complemento C8 (C8B), molecole del complemento (C2, C3, C4A, C6, C7), C1r (C1R), C1s (C1S), il fattore I del complemento (CFI), clusterina (CLU) e SERPING1. L'attivazione del complemento (termini GO: attivazione del complemento, via classica) è emersa anche nell'analisi di arricchimento delle vie della SMA1, ma con una significatività inferiore per questo sottotipo. Le proteine coinvolte includevano C1S, CFI, C2 e C4A.

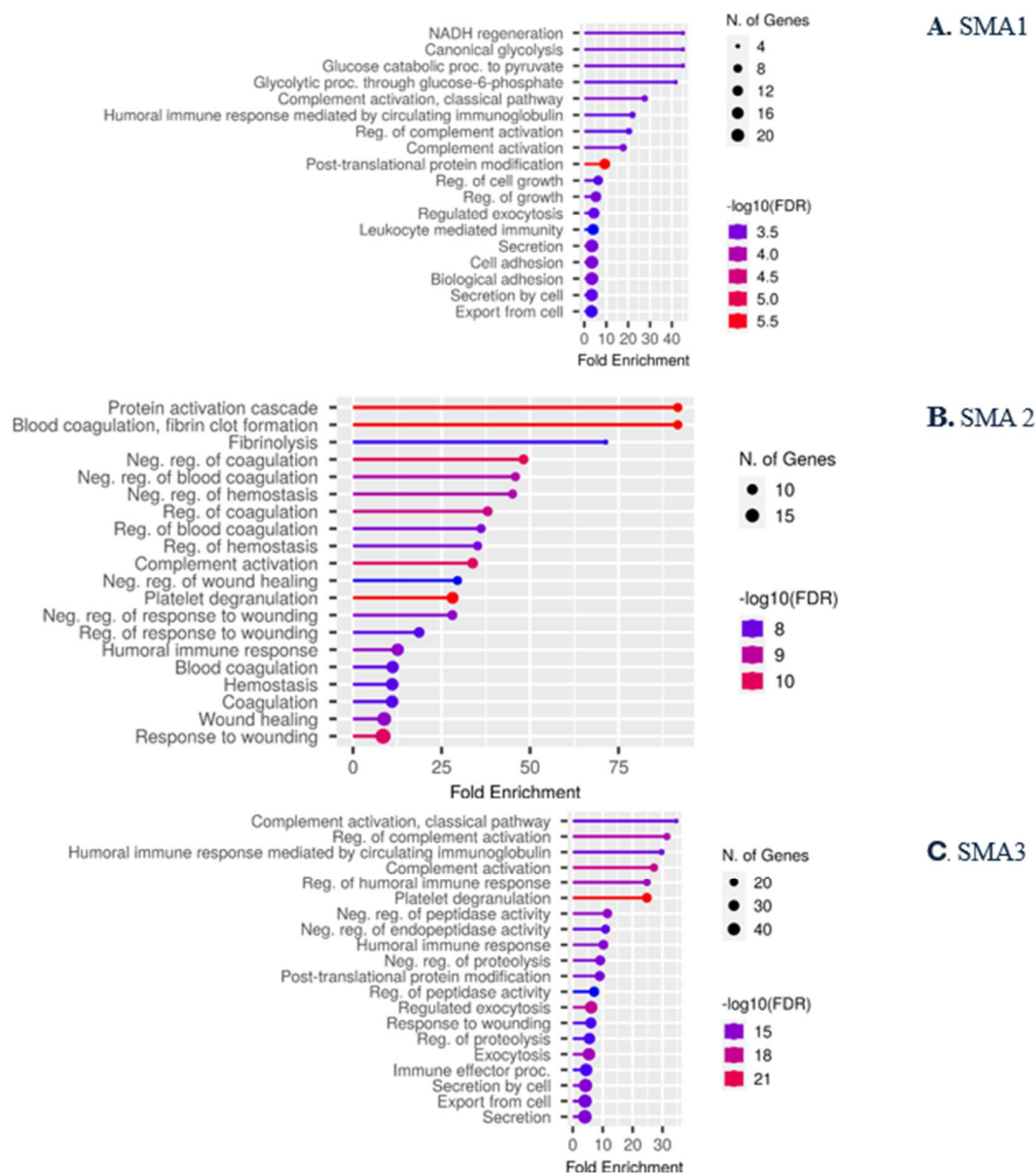


Figura 16. Le 20 principali vie GO legate ai processi biologici (BP). Queste vie risultano arricchite principalmente in DEP up-regolate (a–c).

Modificazione del proteoma nei pazienti *responder* rispetto ai *non responder*

Oltre a valutare i cambiamenti nei livelli proteici per ciascun sottotipo di SMA al T0 e al T302, è stato condotto un confronto delle variazioni dei livelli proteici tra il tempo zero (T0) e dopo 302 giorni di trattamento (T302) nei pazienti *responder* (R) e *non-responder* (non-R). In base al miglioramento delle misure di outcome a T302, abbiamo classificato come *responder* il 52,6% dei pazienti SMA1, il 33,3% dei pazienti SMA2 e il 26,1% dei pazienti SMA3.

Quando abbiamo verificato la significatività dello stato di risposta nei cambiamenti dei livelli proteici indotti dal trattamento tramite il test PERMANOVA per ciascun sottotipo di SMA, solo SMA1 ha mostrato una significatività prossima alla soglia ($F = 1,2544$, $p = 0,085$), mentre i cambiamenti proteici sono risultati simili tra R e non-R nei gruppi SMA2 ($F = 0,8361$, $p = 0,739$) e SMA3 ($F = 1,0221$, $p = 0,416$). Il confronto dei cambiamenti nell'espressione del proteoma tra pazienti *responder* (R) e *non-responder* (non-R) ha identificato 45 proteine differenzialmente espresse nel gruppo SMA1, 26 nel gruppo SMA2 e 26 nel gruppo SMA3. Il grafico a vulcano che evidenzia le proteine down-regolate e up-regolate a T302 in R rispetto ai non-R è stato rappresentato solo per SMA1 (Fig. 17).

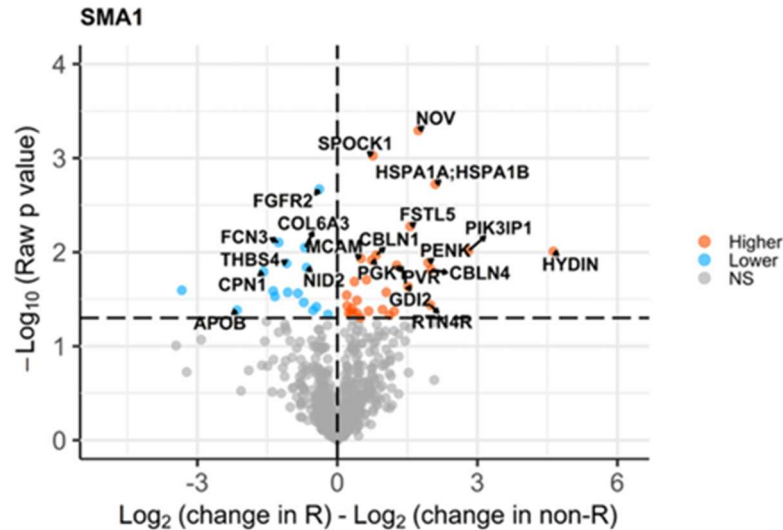


Figura 17. Grafico a vulcano per il confronto dei cambiamenti temporali nei livelli proteici in ciascun campione di *responder* e *non-responder*. Le differenze di *fold change* sono state calcolate sottraendo il *log₂ fold change* delle proteine tra T302 e T0 nei *non-responder* dal *log₂ fold change* tra T302 e T0 nei *responder*; le proteine che aumentano di più nei *responder* rispetto ai *non-responder* sono rappresentate in arancione, mentre le proteine che aumentano meno nei *responder* rispetto ai *non-responder* sono rappresentate in blu.

Tra le proteine up-regolate nei *responder* SMA1 dopo il trattamento, si evidenzia il fattore della rete di comunicazione cellulare 3 (NOV/CCN3, $p = 0,0005$), coinvolto nei processi immunomodulatori tramite le cellule T regolatorie (Naughton et al. 2020), SPOCK1 ($p = 0,00094$), un proteoglicano extracellulare appartenente alla famiglia delle proteine secrete acide e ricche in cisteina (SPARC) e coinvolto nella regolazione della permeabilità della barriera emato-encefalica (BBB) (O’Brown et al. 2023), e le proteine da shock termico HSPA1A/HSPA1B ($p = 0,002$), che modulano una risposta cellulare altamente conservata allo stress interno ed esterno (Lyon et al. 2019). Al contrario, il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGFR2, $p = 0,002$), coinvolto nell’infiltrazione di linfociti e macrofagi/microglia così come nella degenerazione della mielina e degli assoni (Rajendran et al. 2021), faceva parte del pool di proteine down-regolate.

Modificazione dei pathway infiammatori dopo trattamento con nusinersen

Dei pathway delle proteine espresse in modo differenziale (DEP) identificati mediante l'analisi di arricchimento GO dei processi biologici (BP), sono stati evidenziati quelli coinvolti nei processi infiammatori che risultano up-regolati o down-regolati dopo trattamento con nusinersen nei pazienti affetti da SMA 1, SMA 2 e SMA 3 (fig. 18 a-c)

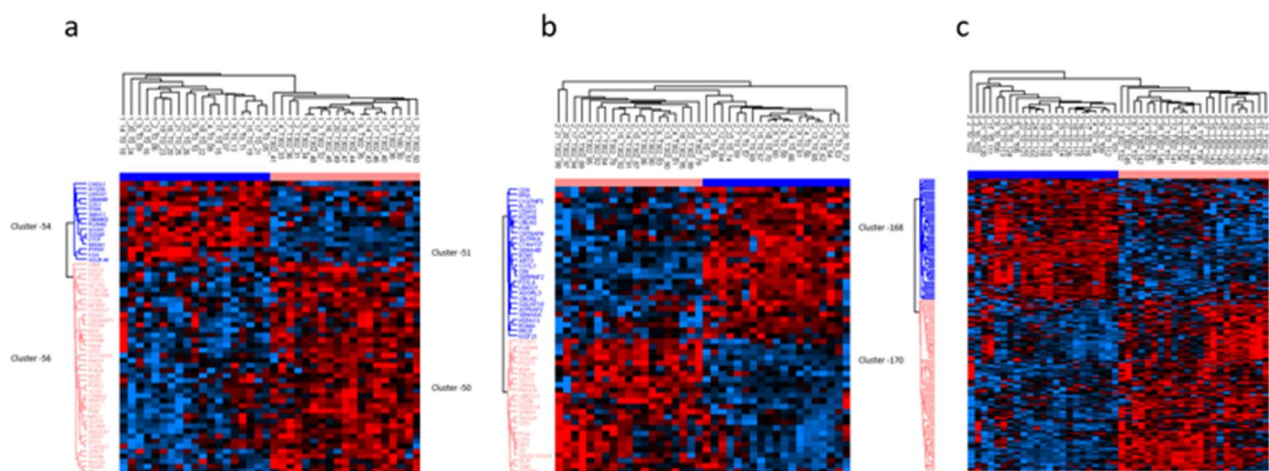


Figura 18. Clustering gerarchico dei campioni appartenenti ai gruppi SMA1 (a), SMA2 (b) e SMA3 (c) al T0 e T302. I campioni sono raggruppati sull'asse x (T0 e T302), mentre le proteine sono raggruppate sull'asse y in base ai profili di abbondanza. Le proteine up-regolate e down-regolate sono rappresentate rispettivamente da sfumature di colore rosso e blu. Le proteine sono state suddivise in cluster in base alla loro abbondanza.

SMA 1 al T0 vs T302

Nei pazienti SMA 1 le proteine coinvolte nei processi infiammatori (termini GO: attivazione leucociti mieloidi, immunità mediata dai leucociti, processo effettore della risposta immunitaria, migrazione transendoteliale dei leucociti e cascata del complemento e della coagulazione) sono state evidenziate solo nel cluster 56 (fig. 19) e risultano down-regolate al T0 e up-regolate al T302. In particolare, GPR37 (recettore accoppiato a proteine G), COLT1 (*coactosin-like protein 1*), C1QA (componente del complemento 1q, subcomponente A), MFAP4 (*microfibrillar-associated protein 4*), CD99L2 (*CD99 molecule-like 2*), MSN (*moesin*), JAM3 (*Junctional Adhesion Molecule 3*) e

fattore V della coagulazione (F5), sono coinvolte in processi che attivano la cascata infiammatoria, mentre le proteine PARK7, PRDX1 (*Peroxiredoxin 1*) e PRDX6 (*Peroxiredoxin 6*) proteggono dallo stress ossidativo e hanno quindi una funzione antinfiammatoria come anche le proteine P4HB (*Protein Disulfide Isomerase (PDI)*), HSP70 (*Heat Shock Proteins 70*).

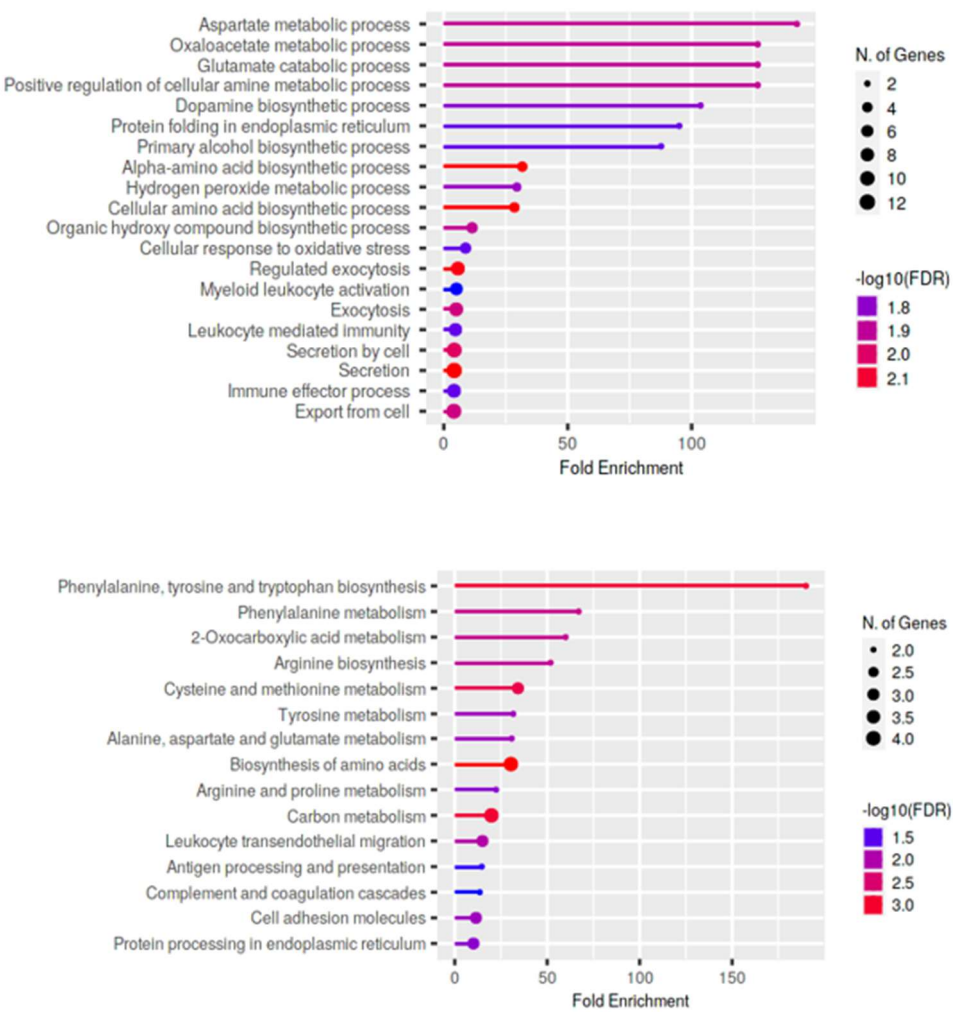


Figura 19

SMA 2 al T0 vs T302

Nei pazienti affetti da SMA 2 i pathway infiammatori identificati dai termini GO cascata coagulativa e del complemento e processazione e presentazione dell'antigene sono stati individuati solo nel cluster 50 (fig. 20). Le proteine coinvolte sono risultate up-regolate al T0 e down-regolate al T302. In particolare, la proteina CFD (*Complement Factor D*), FGA (*Fibrinogen Alpha Chain*) e B2M (*Beta-2-microglobulina*) hanno un'azione pro-infiammatoria mentre le proteine CFH (*Complement Factor H*) e HSP70-1 (*Heat Shock Protein 70 kDa 1A*) sono ad azione antinfiammatoria.

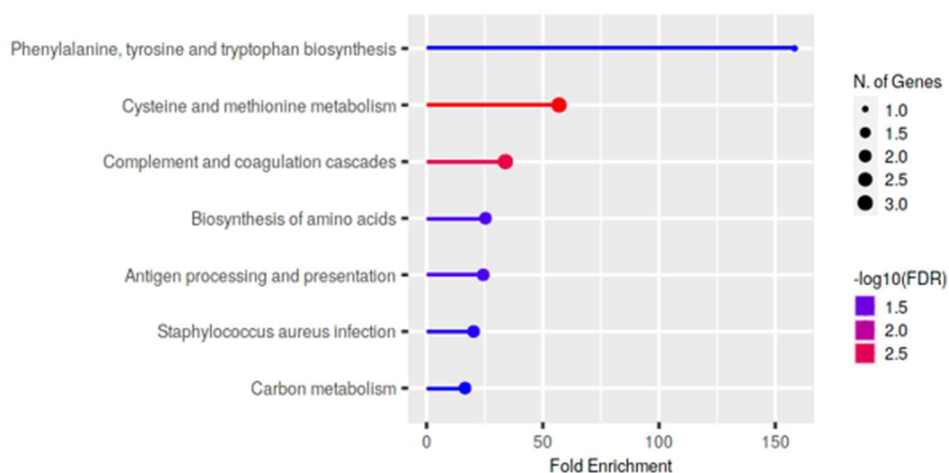


Figura 20

SMA 3 T0 vs T302

Nei pazienti SMA 3 le proteine coinvolte nei processi infiammatori sono state identificate nel cluster 170 con i termini GO: regolazione dell'attivazione del complemento, via classica di attivazione del complemento, attivazione del complemento, risposta immunitaria umorale mediata da immunoglobuline circolanti, regolazione della risposta immune umorale, degranulazione

piastrinica, risposta immunitaria umorale, risposta a danno tissutale, processo effettore della risposta immunitaria, cascata della coagulazione e del complemento (fig. 21). Queste risultano down-regolate al T0 e up-regolate al T302. In particolare, proteine ad azione pro-infiammatoria coinvolte nella via di attivazione del complemento (C8B, C6, C1S, C2, C4A, CFB, C1QB) e altre proteine pro-infiammatorie quali CTSC (*Cathepsin C*), COTL1 (*Coactosin-like protein 1*), KRT1 (*Keratin, type II cytoskeletal 1*), HSP70 (*Heat Shock Cognate 71 kDa protein*), NFASC (*Neurofascin*), TIMP1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), SERPINA3 (*Serpin Family A Member 3*), ORM1 (*Orosomucoid 1*), COL1A1 (*Collagen Type I Alpha 1 Chain*), COL1A2 (*Collagen Type I Alpha 2 Chain*), KLKB1 (*Kallikrein B1*), ABI3BP (*ABI Family Member 3 Binding Protein*). Proteine ad azione antinfiammatoria/regolatoria quali: APOA1 (*Apolipoprotein A-I*), APOE (*Apolipoprotein E*), APOD (*Apolipoprotein D*), SOD1 (*Superoxide dismutase*), AHSG (*Fetuin-A*), ITIH4 (*Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4*), ITIH3 (*Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3*), SERPIND1 (*Heparin cofactor II*), CADM4 (*Cell Adhesion Molecule 4*), DAG1 (*Dystroglycan 1*). Proteine inibitorie del complemento: CLU (*Clusterin*), A2M (*Alpha-2-Macroglobulin*), PROS1 (*Protein S*), VISG4 (*V-set and immunoglobulin domain containing 4*), AHSG (*Fetuin-A*), ORM1 (*Orosomucoid 1*), HPX (*Hemopexin*). Proteine coinvolte nel metabolismo e protezione tissutale: TF (*Transferrin*), RBP4 (*Retinol Binding Protein 4*), CSTB (*Cystatin B*), CANT1 (*Calcium-activated nucleotidase 1*).

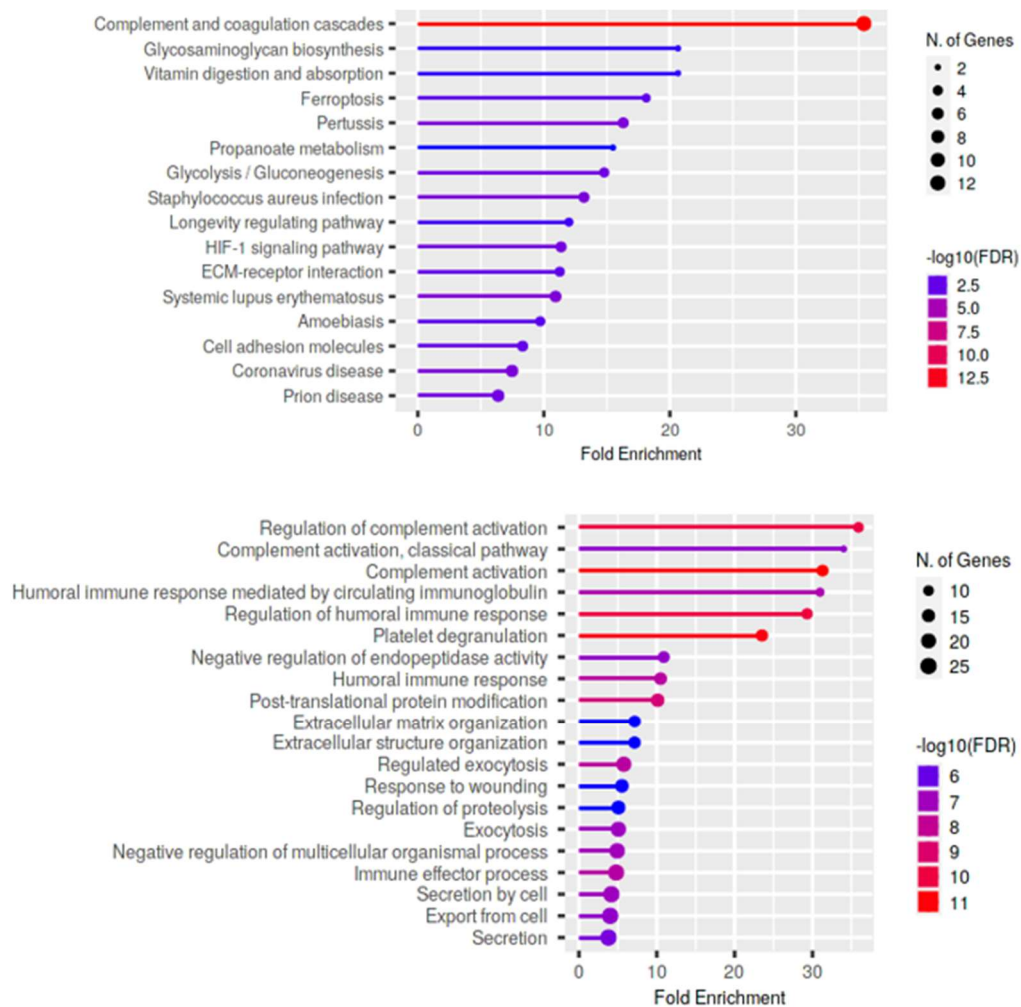


Figura 21

DISCUSSIONE

Gli algoritmi di *machine learning*, un sottoinsieme dell'intelligenza artificiale, si dimostrano particolarmente efficaci nella gestione dei dataset omici, catturando schemi complessi che potrebbero essere trascurati dai metodi statistici tradizionali (Mégret et al. 2022, Acharjee et al. 2020). Nella prima parte dello studio, è stato utilizzato l'algoritmo di *machine learning* per individuare nuovi biomarcatori prognostici per la SMA. L'algoritmo Random Forest, applicato al profilo di espressione proteica di pazienti naïve, ha identificato diverse proteine chiave in grado di classificare i differenti tipi di SMA sulla base della loro abbondanza differenziale. Tra queste, CNTN1 e NRXN3 distinguono chiaramente la forma grave da quelle più lievi.

CNTN1, una delle molecole di adesione asso-gliali, ha mostrato livelli di espressione più bassi nei pazienti con SMA1 e livelli più elevati nei pazienti con SMA2 e SMA3. CNTN1 è espressa sia nel sistema nervoso centrale sia in quello periferico (Kalafatakis et al. 2021) ed è localizzata principalmente nei paranodi, dove forma un complesso tripartito che contribuisce alla stabilizzazione della connessione tra l'assone e le anse di mielina (Rios et al. 2000). Un'anomala comunicazione intercellulare tra assoni e cellule di Schwann è stata recentemente associata ad assoni motori immaturi, disfunzionali e vulnerabili nei tessuti umani di pazienti con SMA grave e in un modello murino di SMA severa (topi SMA Δ 7) (Kong et al. 2021). Inoltre, l'ablazione genetica di *Cntn1* in un modello di *zebrafish* determina infertilità, ridotte dimensioni corporee, un comportamento di nuoto atassico e una colonna vertebrale curva, con neuroni ipomielinizzati rispetto ai soggetti *wild-type*. Analogamente, i topi *Cntn1*^{-/-} mostrano un deficit di crescita e gravi anomalie locomotorie, insieme a una riduzione del numero di assoni mielinizzati sia nel midollo spinale sia nel nervo ottico (Djannatian et al. 2019). Nel modello murino *Smn1*^{-/-}*Smn2*^{+/-}, un'analisi trascrittomica ha identificato la via tnfa-il6-cntn1 come una delle principali vie up-regolate nel sistema nervoso centrale, dove *Cntn1* potrebbe svolgere un ruolo protettivo per i

neuroni (Yang et al. 2016). Nel complesso, questi risultati indicano un ruolo cruciale di CNTN1 nello sviluppo del sistema nervoso, con possibili implicazioni nella patogenesi della SMA.

NRXN3, membro della famiglia delle neurexine (NRXN1, 2 e 3), molecole di adesione cellulare presinaptiche necessarie per la formazione e il mantenimento delle sinapsi (Kamal et al. 2023, Trotter et al. 2023), ha mostrato un aumento progressivo dei livelli di espressione, con i livelli più bassi osservati nei pazienti con SMA1 e i più elevati nei pazienti con SMA3 al T0. È interessante notare che una riduzione di NRXN2 è stata osservata sia in topi SMA transgenici sia nello *zebrafish* (See et al. 2014), mentre studi in vitro su motoneuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti con SMA hanno evidenziato una riduzione dell'espressione di NRXN2 rispetto ai controlli. Al contrario, la sovraespressione di NRXN2 ha migliorato la sopravvivenza dei motoneuroni SMA e aumentato la lunghezza dei neuriti, suggerendo che possa agire come gene modificatore nella SMA (Rizzo et al. 2019). È stata riscontrata una correlazione moderata tra questi marcatori e l'età al T0; di conseguenza, studi futuri dovrebbero concentrarsi su coorti più ampie con una distribuzione dell'età più uniforme.

Nella seconda parte dello studio, abbiamo dimostrato che, al tempo T302, nusinersen modula in modo significativo il proteoma del liquido cerebrospinale (CSF). L'obiettivo era fornire informazioni sui cambiamenti proteici dipendenti da nusinersen a livello dei processi biologici, piuttosto che sulle singole proteine espresse in modo differenziale. Attraverso l'analisi di Gene Ontology (GO) dei processi biologici, è stato riscontrato che nusinersen determina sia un effetto comune in tutti i tipi di SMA, indipendentemente dalla gravità, sia effetti specifici nelle diverse forme della malattia.

In particolare, nusinersen ha modulato i processi biologici correlati all'assonogenesi e allo sviluppo assonale in tutti i pazienti con SMA. È stato dimostrato che il deficit di SMN1 influenza in modo significativo lo sviluppo, la maturazione e la funzione degli assoni dei motoneuroni nei pazienti con SMA di tipo 1 e in un modello murino di SMA severa, questo determina un marcato ritardo nella

crescita radiale degli assoni dei motoneuroni SMA, che impedisce una corretta interazione con le cellule di Schwann, ed è stato associato a degenerazione e perdita assonale dopo la nascita (Kong et al. 2021). Di conseguenza, marcatori indiretti della degenerazione assonale vengono rilasciati dai motoneuroni sofferenti e risultano rilevabili nel CSF e nel circolo sanguigno, come la catena pesante dei neurofilamenti fosforilata (pNfH) e la catena leggera dei neurofilamenti (NfL), che risultano aumentate sia nei pazienti SMA presintomatici con 2 copie di SMN2 sia nei pazienti SMA sintomatici (Rich et al. 2022, Nitz et al. 2021, Olsson et al 2019). Questi risultati indicano che nusinersen modula i processi di assonogenesi, in linea con recenti studi elettrofisiologici che dimostrano miglioramenti parziali nella maturazione assonale nei pazienti SMA sottoposti a trattamento con nusinersen (Kariyawasam et al 2021). Attualmente, non sono disponibili biomarcatori biochimici in grado di rilevare una riduzione del deterioramento assonale in seguito al trattamento con nusinersen, ad eccezione dei neurofilamenti, il cui dosaggio ha tuttavia prodotto risultati discordanti (Faravelli et al. 2020, Wurster et al 2020). Tra le proteine espresse in modo differenziale appartenenti al termine GO “assonogenesi”, sono state individuate componenti della famiglia delle semaforine, in particolare SEMA4B, SEMA6A e SEMA7A, che risultavano down-regolate dal trattamento con nusinersen in tutti i pazienti. Questi risultati sono coerenti con recenti studi proteomici non mirati che hanno identificato una riduzione dei livelli di SEMA6A e SEMA7A nel CSF dei pazienti con SMA3 dopo 22 mesi di trattamento con nusinersen (Faravelli et al. 2023), e la down-regolazione di SEMA7A nei soggetti SMA3 responder dopo 10 mesi di trattamento (Kessler et al. 2020). Questi dati, combinati con quelli precedenti, suggeriscono che le semaforine, in particolare SEMA6A e SEMA7A, possano rappresentare una nuova classe di biomarcatori per monitorare il trattamento con nusinersen in tutti i pazienti con SMA, indipendentemente dalla gravità, riflettendo il mantenimento e il rimodellamento degli assoni, come già osservato in altre condizioni (Carulli et al. 2021). Oltre all’assonogenesi, nusinersen ha mostrato una modulazione delle vie bioenergetiche nei pazienti con SMA1 e delle vie infiammatorie.

È noto che i pazienti con SMA1 presentano una ridotta tolleranza al digiuno (Ørngreen et al. 2003, Berti et al. 2020, Deguise et al. 2021), inoltre uno squilibrio nel metabolismo del glucosio è stato riportato anche nei pazienti con SMA 2 (Ørngreen et al. 2021).

In precedenza, è stato dimostrato, utilizzando un'analisi metabolomica mediante Risonanza Magnetica Nucleare, che nusinersen influenzava selettivamente il metabolismo del glucosio nel CSF dei pazienti con SMA1 (Errico et al. 2022). Questi risultati nel presente studio vengono confermati a livello proteico, mostrando un aumento mediato da nusinersen nell'espressione proteica di enzimi glicolitici come PKM, ENO1, ALDOC e PGAM1. Questi risultati suggeriscono una possibile correzione dello squilibrio glucidico dopo trattamento con nusinersen, sebbene ulteriori studi su campioni ematici saranno necessari per comprendere se questo effetto sia specifico del CSF o sistemico.

Recenti studi hanno evidenziato come la patogenesi della SMA non sia limitata alla degenerazione dei motoneuroni, ma che diversi tipi cellulari e tessuti, in particolare quelli correlati al sistema immunitario, contribuiscano al processo patogenetico della SMA. Inoltre, è stato dimostrato che la disfunzione del sistema immunitario possa contribuire alla gravità della malattia attraverso meccanismi di neuroinfiammazione e risposte immunitarie aberranti (Arslan et al. 2025, Jordan et al. 2025).

Nei pazienti SMA 1, dopo dieci mesi di trattamento con nusinersen, le proteine coinvolte nei processi di protezione dallo stress ossidativo risultavano up-regolate (PARK7, PRDX1 e PRDX6). In un recente studio è stato dimostrato che la proteina SMN regola lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria nelle microglia in modelli murini di SMA (SMN Δ 7). L'oligonucleotide antisense (SMN-ASO), che aumenta l'espressione della proteina SMN, risulta attenuare la gravità dei fenotipi nei topi SMN Δ 7 e sopprimere l'attivazione delle microglia nel midollo spinale. È stato dimostrato un aumento dei marcatori di stress ossidativo nella microglia dei topi SMN Δ 7 e tali marcatori risultavano soppressi dal trattamento con SMN-ASO. Questi risultati suggeriscono che la perdita

della proteina SMN nella microglia promuove lo stress ossidativo, che potrebbe essere attenuato inducendo l'espressione della proteina SMN (Ando et al. 2020).

Inoltre, per quanto riguarda gli effetti di nusinersen sul proteoma dei pazienti con SMA2 e SMA3, sono state riscontrate un aumento delle proteine appartenenti alla cascata della coagulazione e del complemento, processi strettamente interconnessi, che condividono vie ancestrali comuni e contribuiscono a una complessa rete infiammatoria (Rittirsch et al. 2008). SERPING1, un inibitore della cascata classica del complemento, risultava up-regolato sia in SMA2 sia in SMA3 al tempo T302. Nei pazienti con SMA2 si è osservata una sovraregolazione di F12, un potente attivatore della molecola C1q nella via classica, mentre nei pazienti con SMA3 si è registrato un aumento di diversi componenti della cascata del complemento, come C1q, C1s, C2, C3, C4A, C6 e C7. Recentemente, Faravelli et al. hanno riportato che membri delle vie del complemento del sistema immunitario innato, incluso SERPING1, risultavano tra le proteine più abbondanti nel CSF dei pazienti con SMA3, come rilevato mediante LC-MS non mirata. Questi risultati sono in linea con dati recenti che suggeriscono che l'attivazione della cascata del complemento partecipa ai processi neuroinfiammatori e contribuisce alla patogenesi di diverse malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, l'Huntington, la Sclerosi Laterale Amiotrofica e la SMA (Magdalon et al. 2020). Inoltre, in un modello preclinico di SMA, l'up-regolazione aberrante delle proteine classiche del complemento C1q e C3 è stata associata a disfunzione ed eliminazione selettiva delle sinapsi, mentre un trattamento in vivo con un anticorpo anti-C1q ha determinato un recupero delle sinapsi (Vukojicic et al 2019).

Oltre all'attivazione del complemento, un aumento dei mediatori infiammatori è stato riportato sia nel CSF che nel siero in modelli preclinici e nei pazienti con SMA, indicando che disfunzioni immunitarie e processi di neuroinfiammazione sono coinvolti nella patogenesi della SMA (Deguise et al. 2017, Nuzzo et al. 2023). In questo contesto, abbiamo osservato una riduzione

dell'espressione di marcatori infiammatori, tra cui NOV/CCN3, le proteine da shock termico HSPA1A/HSPA1B e il FGFR2, al tempo T302 nei pazienti SMA1 responder.

Nei pazienti SMA 2 e SMA 3, dopo trattamento con nusinersen, risultavano up-regolate proteine coinvolte nei processi di regolazione dell'infiammazione suggerendo che il trattamento con nusinersen favorisca un migliore controllo dei processi pro-infiammatori; tuttavia, sono state identificate alcune proteine up-regolate dopo trattamento che hanno una chiara funzione pro-infiammatoria, in particolare proteine coinvolte nella via di attivazione del complemento come C8B, C6, C1S, C2, C4A, CFB, C1QB e altre proteine pro-infiammatorie come HSP70. Questo dato è in linea con quanto riportato da Zhang et al, in particolare in questo studio hanno osservato una risposta neuroinfiammatoria transitoria nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti con SMA in seguito alle somministrazioni intratecali di nusinersen dopo sei mesi di trattamento, rilevando fluttuazioni di diversi marcatori in vari momenti temporali (inclusi aumenti transitori di MCP-1, MDC, MIP-1 α , IL-12/IL-23p40 e IL-8). Gli autori ritengono che sia possibile che l'aumento di questi marcatori fosse transitorio e possa ridursi nel corso di un trattamento più prolungato (Zhang et al. 2024). Anche un altro recente studio ha riportato un'induzione transitoria e modesta di citochine pro-infiammatorie (IL-8, G-CSF, MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β) nel CSF di pazienti con SMA2 e SMA3, non associata ad alcuna manifestazione clinica (Nuzzo et al. 2023).

In sintesi, questo profilo proteomico LC-MS non mirato nel CSF dei pazienti con SMA ha evidenziato differenze nell'espressione proteica nei pazienti naïve e ha mostrato una modulazione legata a nusinersen in diversi processi biologici dopo dieci mesi di trattamento.

CONCLUSIONI

Nell'ambito delle neuroscienze, i progressi nelle tecnologie omiche hanno ampliato significativamente la nostra comprensione e l'esplorazione dei meccanismi biologici, facilitando la scoperta di biomarcatori (Schumacher-Schuh et al 2022). Nella SMA la scoperta di nuovi biomarcatori si rivela cruciale per garantire una diagnosi tempestiva e assicurare un intervento terapeutico precoce.

In quest'ottica abbiamo identificato alcune proteine, fondamentali per il corretto funzionamento dell'assone e delle sinapsi, in particolare CNTN1 e NRXN3. Considerando il ruolo che queste proteine svolgono nel sistema nervoso, possono essere considerati come potenziali biomarcatori prognostici per distinguere la SMA 1 grave dai fenotipi più lievi nell'ambito dei programmi di screening neonatale.

Per quanto riguarda invece la modulazione dei processi biologici indotta dal trattamento con nusinersen quello che abbiamo evidenziato è stato una modifica nella regolazione delle proteine legate all'assonogenesi, al metabolismo del glucosio e alle vie infiammatorie.

In particolare, membri della famiglia delle semaforine risultavano down-regolate dopo il trattamento con nusinersen in tutti i pazienti, queste, riflettendo il processo di rimodellamento assonale, possono essere considerate come nuovi biomarcatori per monitorare il trattamento con nusinersen.

Per quanto riguarda invece gli effetti di nusinersen sul metabolismo glucidico, quello che abbiamo osservato è un aumento degli enzimi glicolitici, indice di una possibile regolazione dello squilibrio glucidico indotta dal trattamento.

In riferimento alla modulazione dei processi infiammatori quello che abbiamo evidenziato è un aumento, nei pazienti SMA 1, delle proteine coinvolte nei processi di protezione dallo stress ossidativo dopo trattamento con nusinersen, suggerendo come aumentando l'espressione della

proteina SMN con il trattamento con nusinersen, si possa agire sull'attività della microglia riducendone l'attivazione e di conseguenza mitigando lo stress ossidativo. Nei pazienti con SMA di tipo 2 e 3 è meno chiara l'azione di nusinersen sulla modulazione nei processi infiammatori in quanto, nonostante sia stato evidenziato un aumento delle proteine ad azione antinfiammatoria dopo trattamento, risultavano up-regolate anche proteine ad azione chiaramente pro-infiammatoria. Questo, come già riportato in precedenti studi (Nuzzo et al. 2023, Zhang et al. 2024), può essere un fenomeno transitorio rilevabile nelle prime fasi della terapia con nusinersen con tendenza alla riduzione di queste proteine nel corso di un trattamento più prolungato.

L'integrazione dello studio di proteomica e del machine learning in un'ampia coorte di pazienti ha consentito l'identificazione di nuovi biomarcatori prognostici nel liquido cerebro spinale dei pazienti con SMA per la stratificazione della gravità della malattia, fornendo una possibile nuova strategia per supportare l'orientamento di trattamenti terapeutici di precisione.

In questo studio ci sono alcune limitazioni, tra cui l'assenza di campioni di liquido cerebrospinale da controlli sani, la dimensione relativamente ridotta del campione all'interno di ciascun sottotipo di SMA, la mancanza di un dosaggio di biomarcatori ampiamente utilizzati, come i neurofilamenti, per confrontare i risultati ottenuti, e il periodo limitato di follow-up di dieci mesi. Per confermare il valore prognostico dei biomarcatori identificati e comprendere meglio la durata degli effetti del trattamento osservati sono fondamentali ulteriori studi in coorti più ampie e indipendenti, con distribuzioni di età uniformi e un monitoraggio a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

- Acharjee et al., «A random forest based biomarker discovery and power analysis framework for diagnostics research», *BMC Medical Genomics*. 2020: 178.
- Abiusi et al., 270th ENMC International Workshop: Consensus for SMN2 genetic analysis in SMA patients 10-12 March, 2023, Hoofddorp, the Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2024;34:114-122.
- Aebersold et al., M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016 537, 347–355.
- Alakwaa et al., «Deep Learning Accurately Predicts Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Metabolomics Data», *Journal of Proteome Research*. 2018: 337–47.
- Alonge et al., Safety and effectiveness of risdiplam in adults with spinal muscular atrophy: a systematic review. *J Neurol*. 2025;273:10.
- Ambrosio et al., Newborn Screening Program for Spinal Muscular Atrophy in the Campania Region (Italy): Current Limitations and Potential Perspectives. *Int. J. Neonatal Screen*. 2025, 11, 64.
- Ando et al., «Survival Motor Neuron Protein Regulates Oxidative Stress and Inflammatory Response in Microglia of the Spinal Cord in Spinal Muscular Atrophy», *Journal of Pharmacological Sciences*. 2020: 204–11.
- Arnold et al., «Spinal Muscular Atrophy: Diagnosis and Management in a New Therapeutic Era», *Muscle & nerve*. 2015.
- Arslan et al., «Detection of inflammation and glial cell-related biomarkers in adults with spinal muscular atrophy receiving nusinersen therapy». *Neurol Sci*. 2025; 47:40.
- Babić et al., «Molecular Biomarkers for the Diagnosis, Prognosis, and Pharmacodynamics of Spinal Muscular Atrophy», *Journal of Clinical Medicine*. 2023: 5060.

- Bahado-Singh et al., «Artificial Intelligence and Amniotic Fluid Multiomics: Prediction of Perinatal Outcome in Asymptomatic Women with Short Cervix», *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2019: 110–18.
- Barbo et al., MicroRNAs as Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy. *Biomedicines* 2024, 12, 2428.
- Batth et al., «Protein Aggregation Capture on Microparticles Enables Multipurpose Proteomics Sample Preparation», *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 18. 2019.
- Bayoumy et al., Neurofilament light protein as a biomarker for spinal muscular atrophy: a review and reference ranges. *Clin Chem Lab Med.* 2024;62:1252-1265.
- Berti et al., «Hypoglycaemia in Patients with Type 1 SMA: An Underdiagnosed Problem?», PostScript, *Archives of Disease in Childhood.* 2020: 707–707.
- Burr et al., «Spinal Muscle Atrophy», StatPearls Publishing, 2025.
- Calucho et al., «Correlation between SMA Type and SMN2 Copy Number Revisited: An Analysis of 625 Unrelated Spanish Patients and a Compilation of 2834 Reported Cases», *Neuromuscular Disorders.* 2018: 208–15.
- Calucho et al., Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord.* 2018;28:208-215.
- Carulli et al., «Semaphorins in Adult Nervous System Plasticity and Disease», *Frontiers in Synaptic Neuroscience.* 2021: 672891.
- Chen et al., «New and Developing Therapies in Spinal Muscular Atrophy: From Genotype to Phenotype to Treatment and Where Do We Stand?», *International Journal of Molecular Sciences.* 2020: 3297.
- Chongmelaxme et al., Gene-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy types 1 and 2 : a systematic review and meta-analysis. *Gene Ther.* 2025;32(4):301-330.

- Corti et al., Advancing personalized spinal muscular atrophy care: matching the right biomarker to the right patient at the right time. *J Neurol* 2025, 605.
- Costa-Roger et al., «The Importance of Digging into the Genetics of SMN Genes in the Therapeutic Scenario of Spinal Muscular Atrophy», *International Journal of Molecular Sciences*. 2021: 9029.
- Cox et al., «MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification», *Nature Biotechnology*. 2008: 1367–72.
- D’Amico et al., «Spinal muscular atrophy», *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011: 71.
- Darras et al., «Spinal Muscular Atrophies», *Pediatric Clinics of North America*, New Advances in Pediatric Neurologic and Developmental Disorders in the Era of Genomics. 2015: 743–66.
- Day et al., «Advances and limitations for the treatment of spinal muscular atrophy», *BMC Pediatrics* 22. 2022: 632.
- Deguise et al., «Metabolic Dysfunction in Spinal Muscular Atrophy», *International Journal of Molecular Sciences*. 2021: 5913.
- Deguise et al., «New insights into SMA pathogenesis: immune dysfunction and neuroinflammation», *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2017: 522–30.
- Djannatian et al., «Two adhesive systems cooperatively regulate axon ensheathment and myelin growth in the CNS», *Nature Communications*. 2019: 4794.
- Dong et al., Systematic Review: Proteomics-Driven Multi-Omics Integration for Alzheimer's Disease Pathology and Precision Medicine. *Neurol Int*. 2025;17:197.
- Efimova et al., «Epidemiology of Spinal Muscular Atrophy Based on the Results of a Large-Scale Pilot Project on 202,908 Newborns», *Pediatric Neurology*. 2024

- Elhaik et al., «Principal Component Analyses (PCA)-based findings in population genetic studies are highly biased and must be reevaluated», *Scientific Reports*. 2022: 14683.
- Errico et al., «Nusinersen Induces Disease-Severity-Specific Neurometabolic Effects in Spinal Muscular Atrophy», *Biomolecules*. 2022: 1431.
- Faravelli et al., «Multi-omics profiling of CSF from spinal muscular atrophy type 3 patients after nusinersen treatment: a 2-year follow-up multicenter retrospective study», *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2023: 241.
- Faravelli et al., «Nusinersen treatment and cerebrospinal fluid neurofilaments: An explorative study on Spinal Muscular Atrophy type 3 patients», *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020: 3034–39.
- Finkel et al., «218th ENMC International Workshop:: Revisiting the Consensus on Standards of Care in SMA Naarden, The Netherlands, 19–21 February 2016», *Neuromuscular Disorders*. 2017: 596–605.
- Finkel et al., «Diagnosis and Management of Spinal Muscular Atrophy: Part 2: Pulmonary and Acute Care; Medications, Supplements and Immunizations; Other Organ Systems; and Ethics», *Neuromuscular Disorder*. 2018: 197–207.
- Finkel et al., «Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy», *New England Journal of Medicine*. 2017: 1723–32.
- Finkel et al., RAINBOWFISH Study Group. Risdiplam in Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2025;393:671-682.
- Gao et al., «Application of Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy», *International Journal of Molecular Sciences*. 2025: 6887.
- Glanzman et al., «The Children’s Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability», *Neuromuscular Disorders*. 2010: 155–61.

- Hagenacker et al., Systematic Review and Meta-analysis of Long-Term Nusinersen Effectiveness in Adolescents and Adults with Spinal Muscular Atrophy. *Adv Ther.* 2025;42:4143-4160.
- Haque US et al., Recent Progress in Gene-Targeting Therapies for Spinal Muscular Atrophy: Promises and Challenges. *Genes (Basel).* 2024;15:999.
- Jin et al., Plasma Neurofilament Light Chain as a Potential Biomarker of Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy. *Muscle Nerve.* 2026 Jan 20.
- John et al., *Advancements in Mass Spectrometry for Biomarker Discovery and Disease Diagnosis: Techniques, Challenges and Future Directions*, 13. 2024.
- Jones et al., «Spinal Muscular Atrophy (SMA) Subtype Concordance in Siblings: Findings From the Cure SMA Cohort», *Journal of Neuromuscular Diseases.* 2020: 33–40.
- Jordan et al., «Biomarkers of immune dysregulation and posttreatment inflammation in spinal muscular atrophy». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2025;122:e2506976122.
- Kalafatakis et al., «Implication of Contactins in Demyelinating Pathologies», *Life* 11. 2021: 51.
- Kamal et al., «NRXN3 Mutations Cause Developmental Delay, Movement Disorder, and Behavioral Problems: CRISPR Edited Cells Based WES Results», *Gene* 867. 2023: 147347.
- Kariyawasam et al., «Biomarkers and the Development of a Personalized Medicine Approach in Spinal Muscular Atrophy», *Frontiers in Neurology* . 2019: 898.
- Kariyawasam et al., «Motor unit changes in children with symptomatic spinal muscular atrophy treated with nusinersen», *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 2021: 78–85.
- Kessler et al., «Cerebrospinal Fluid Proteomic Profiling in Nusinersen-Treated Patients with Spinal Muscular Atrophy», *Journal of Neurochemistry.* 2020: 650–61.

- Kirschner et al., 2024 update: European consensus statement on gene therapy for spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2024;51:73-78.
- Kolb et al. «Spinal Muscular Atrophy», *Neurologic clinics.* 2015: 831–46.
- Kong et al., «Impaired prenatal motor axon development necessitates early therapeutic intervention in severe SMA», *Science translational medicine.* 2021: eabb6871.
- Kulak et al., «Minimal, Encapsulated Proteomic-Sample Processing Applied to Copy-Number Estimation in Eukaryotic Cells», *Nature Methods.* 2014: 319–24.
- Lapp et al., Biomarkers in 5q-associated spinal muscular atrophy-a narrative review. *J Neurol.* 2023 ;270:4157-4178.
- Lee et al., Considerations for repetitive intrathecal procedures in long-term nusinersen treatment for non-ambulatory spinal muscular atrophy. *Sci Rep.* 2025;15:8553.
- Li et al., Real-world analysis of the efficacy and safety of nusinersen in pediatric patients with spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2025;20:87.
- Lyon et al., «Extracellular Heat Shock Proteins in Neurodegenerative Diseases: New Perspectives», *Neuroscience Letters.* 2019: 134462.
- Magdalon et al., «Complement System in Brain Architecture and Neurodevelopmental Disorders», *Frontiers in Neuroscience.* 2020: 23.
- Masson et al., Treating Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy Patients with Onasemnogene Apeparvovec in Italy: The Role of the National Health System and Drug Supply. Comment on Zaidman et al. Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy: Variations in Practice and Early Management of Infants with Spinal Muscular Atrophy in the United States. *Int. J. Neonatal Screen.* 2024, 10, 58. *International Journal of Neonatal Screening*, 11, 102.
- Matesanz et al., Real-world evidence on nusinersen treatment of persons with SMA: a focused review. *J Neuromuscul Dis.* 2025:22143602251385045.

- Mégret et al., «Precision machine learning to understand micro-RNA regulation in neurodegenerative diseases», *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022: 914830.
- Meneri et al., «Identification of Novel Biomarkers of Spinal Muscular Atrophy and Therapeutic Response by Proteomic and Metabolomic Profiling of Human Biological Fluid Samples», *Biomedicines*. 2023: 1254.
- Mercuri et al., «Diagnosis and Management of Spinal Muscular Atrophy: Part 1: Recommendations for Diagnosis, Rehabilitation, Orthopedic and Nutritional Care», *Neuromuscular Disorders*. 2018: 103–15.
- Mercuri et al., «Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy», *New England Journal of Medicine*. 2018: 625–35.
- Mercuri et al., «Spinal Muscular Atrophy», *Nature Reviews. Disease Primers* 8. 2022: 52.
- Mercuri et al., What did we learn from new treatments in SMA? A narrative review. *Acta Myol*. 2025; 44:28-32.
- Naughton et al., «CCN3 is dynamically regulated by treatment and disease state in multiple sclerosis», *Journal of Neuroinflammation*. 2020: 349.
- Nitz et al., «Serum neurofilament light chain in pediatric spinal muscular atrophy patients and healthy children», *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2021: 2013–24.
- Nuzzo et al., «Nusinersen mitigates neuroinflammation in severe spinal muscular atrophy patients», *Communications Medicine*. 2023: 28.
- O’Brown et al., «The secreted neuronal signal Spock1 promotes blood-brain barrier development», *Developmental cell*. 2023: 1534-1547.e6.
- O’Hagen et al., «An Expanded Version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III Patients», *Neuromuscular Disorders*. 2007: 693–97.
- Olivier et al., «The Need for Multi-Omics Biomarker Signatures in Precision Medicine», *International Journal of Molecular Sciences*. 2019: 4781.

- Olsson et al., «NFL is a marker of treatment response in children with SMA treated with nusinersen», *Journal of Neurology*. 2019: 2129–36.
- Ørngreen et al., «Patients with severe muscle wasting are prone to develop hypoglycemia during fasting», *Neurology*. 2003: 997–1000.
- Ørngreen et al., «Prolonged Fasting-Induced Hyperketosis, Hypoglycaemia and Impaired Fat Oxidation in Child and Adult Patients with Spinal Muscular Atrophy Type II», *Acta Paediatrica*. 2021: 3367–75.
- Paik et al., «Risdiplam: A Review in Spinal Muscular Atrophy», *CNS Drug*. 2022: 401–10.
- Park et al., PPIxGPN: plasma proteomic profiling of neurodegenerative biomarkers with protein–protein interaction-based eXplainable graph propagational network, *Briefings in Bioinformatics* 2025.
- Pavlou et al., The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem*. 2013 ;59:147-57.
- Pechmann et al., «Improved upper limb function in non-ambulant children with SMA type 2 and 3 during nusinersen treatment: a prospective 3-years SMARtCARE registry study», *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2022: 384.
- Piepers et al., «A Natural History Study of Late Onset Spinal Muscular Atrophy Types 3b and 4», *Journal of Neurology*. 2008: 1400–1404.
- Pino et al., «Update on Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy», *Biomarker Insights*. 2021.
- Pitarch-Castellano et al., Neurofilaments as Biomarkers of the Efficacy of Risdiplam Treatment in Early SMA Phenotypes Diagnosed by Newborn Screening. *Children* **2025**, *12*, 1170.
- Proud et al., Open-label phase IV trial evaluating nusinersen after onasemnogene abeparvovec in children with spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*. 2025;135:e193956.

- Rajendran et al., «FGF/FGFR Pathways in Multiple Sclerosis and in Its Disease Models», *Cells*. 2021: 884.
- Rich et al., «Neurofilament Levels in CSF and Serum in an Adult SMA Cohort Treated with Nusinersen», 2022.
- Rios et al., «Contactin-Associated Protein (Caspr) and Contactin Form a Complex That Is Targeted to the Paranodal Junctions during Myelination», *The Journal of Neuroscience*. 2000: 8354–64.
- Rittirsch et al., «Harmful molecular mechanisms in sepsis», *Nature reviews. Immunology*. 2008: 776–87.
- Rizzo et al., «Key role of SMN/SYNCIP and RNA-Motif 7 in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons», *Brain* 142. 2019: 276–94.
- Salort-Campana et al., «Clinical Features of Spinal Muscular Atrophy (SMA) Type 3 (Kugelberg-Welander Disease)», *Archives de Pédiatrie*. 2020: 7S23–28.
- Schumacher-Schuh et al., «Advances in Proteomic and Metabolomic Profiling of Neurodegenerative Diseases», *Frontiers in Neurology*. 2022: 792227.
- See et al., «SMN deficiency alters Nrnx2 expression and splicing in zebrafish and mouse models of spinal muscular atrophy», *Human Molecular Genetics*. 2014: 1754–70.
- Servais et al., «Taldefgrobep Alfa and the Phase 3 RESILIENT Trial in Spinal Muscular Atrophy», *International Journal of Molecular Sciences*. 2024: 10273.
- Skov et al., «The ClC-1 Chloride Channel Inhibitor NMD670 Improves Skeletal Muscle Function in Rat Models and Patients with Myasthenia Gravis», *Science Translational Medicine*. 2024: eadk9109.
- Srivastava et al., «Machine learning algorithms to classify spinal muscular atrophy subtypes», *Neurology*. 2012: 358–64.

- Stam et al., «Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Trial with Pyridostigmine in Spinal Muscular Atrophy Types 2–4», *Brain Communications*. 2022: fcac324.
- Strimbu et al., What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5:463-6.
- Tapken et al., «From Data to Discovery: AI-Guided Analysis of Disease-Relevant Molecules in Spinal Muscular Atrophy (SMA)», *Human Molecular Genetics*. 2024: 1367–77.
- Trotter et al., «A combinatorial code of neurexin-3 alternative splicing controls inhibitory synapses via a trans-synaptic dystroglycan signaling loop», *Nature Communications*. 2023: 1771.
- Varone et al., Spinal muscular atrophy in the era of newborn screening: how the classification could change. *Front Neurol*. 2025;16:1542396.
- Virata et al., SMN2 as a therapeutic target in spinal muscular atrophy: advances in gene expression modulation. *J Transl Genet Genom*. 2025;9:268-85.
- Vukojicic et al., «The Classical Complement Pathway Mediates Microglia-Dependent Remodeling of Spinal Motor Circuits during Development and in SMA», *Cell reports*. 2019: 3087-3100.e7.
- Weiß et al., SMARtCARE and Swiss-Reg-NMD study group. Efficacy and safety of gene therapy with onasemnogene abeparvovec in children with spinal muscular atrophy in the D-A-CH-region: a population-based observational study. *Lancet Reg Health Eur*. 2024;47:101092.
- Weng et al., «Updates of Spinal Muscular Atrophy in Advanced Therapies», *Journal of the Formosan Medical Association*. 2025.

- Wetzlich et al., «Therapeutic Applications and Challenges in Myostatin Inhibition for Enhanced Skeletal Muscle Mass and Functions», *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2025: 1535–53.
- Wirth et al., «Twenty-Five Years of Spinal Muscular Atrophy Research: From Phenotype to Genotype to Therapy, and What Comes Next», *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2020: 231–61.
- Wurster et al., «Neurofilament Light Chain in Serum of Adolescent and Adult SMA Patients under Treatment with Nusinersen», *Journal of Neurology*. 2020: 36–44.
- Yan et al., Biomarkers in spinal muscular atrophy. *Front Neurol*. 2025;16:1636992.
- Yang et al., «An Integrative Transcriptomic Analysis for Identifying Novel Target Genes Corresponding to Severity Spectrum in Spinal Muscular Atrophy», *PLoS ONE* 11. 2016.
- Yeo et al., «Challenges and Opportunities in Spinal Muscular Atrophy Therapeutics», *The Lancet Neurology*. 2024: 205–18.
- Zandl-Lang et al., Multi-omics profiling in spinal muscular atrophy (SMA): investigating lipid and metabolic alterations through longitudinal CSF analysis of Nusinersen-treated patients. *J Neurol*. 2025;272:183.
- Zhang et al., «Profiling neuroinflammatory markers and response to nusinersen in paediatric spinal muscular atrophy», *Scientific Reports*. 2024: 23491.

I risultati di questo studio sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

“Panicucci C, Sahin E, Bartolucci M, Casalini S, Brolatti N, Pedemonte M, Baratto S, Pintus S, Principi E, D'Amico A, Pane M, Sframeli M, Messina S, Albamonte E, Sansone VA, Mercuri E, Bertini E, Sezerman U, Petretto A, Bruno C. Proteomics profiling and machine learning in nusinersen-treated patients with spinal muscular atrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2024;81:393.”



Proteomics profiling and machine learning in nusinersen-treated patients with spinal muscular atrophy

Chiara Panicucci¹ · Eray Sahin² · Martina Bartolucci³ · Sara Casalini¹ · Noemi Brolatti¹ · Marina Pedemonte⁴ · Serena Baratto¹ · Sara Pintus¹ · Elisa Principi¹ · Adele D'Amico⁵ · Marika Pane⁶ · Marina Sframeli⁷ · Sonia Messina⁷ · Emilio Albamonte⁸ · Valeria A. Sansone⁸ · Eugenio Mercuri⁶ · Enrico Bertini⁵ · Ugur Sezerman⁹ · Andrea Petretto³ · Claudio Bruno^{1,10}

Received: 25 February 2024 / Revised: 11 August 2024 / Accepted: 25 August 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Aim The availability of disease-modifying therapies and newborn screening programs for spinal muscular atrophy (SMA) has generated an urgent need for reliable prognostic biomarkers to classify patients according to disease severity. We aim to identify cerebrospinal fluid (CSF) prognostic protein biomarkers in CSF samples of SMA patients collected at baseline (T0), and to describe proteomic profile changes and biological pathways influenced by nusinersen before the sixth nusinersen infusion (T302).

Methods In this multicenter retrospective longitudinal study, we employed an untargeted liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)-based proteomic approach on CSF samples collected from 61 SMA patients treated with nusinersen (SMA1 n=19, SMA2 n=19, SMA3 n=23) at T0 at T302. The Random Forest (RF) machine learning algorithm and pathway enrichment analysis were applied for analysis.

Results The RF algorithm, applied to the protein expression profile of naïve patients, revealed several proteins that could classify the different types of SMA according to their differential abundance at T0. Analysis of changes in proteomic profiles identified a total of 147 differentially expressed proteins after nusinersen treatment in SMA1, 135 in SMA2, and 289 in SMA3.

Overall, nusinersen-induced changes on proteomic profile were consistent with i) common effects observed in all SMA types (i.e. regulation of axonogenesis), and ii) disease severity-specific changes, namely regulation of glucose metabolism in SMA1, of coagulation processes in SMA2, and of complement cascade in SMA3.

Conclusions This untargeted LC-MS proteomic profiling in the CSF of SMA patients revealed differences in protein expression in naïve patients and showed nusinersen-related modulation in several biological processes after 10 months of treatment. Further confirmatory studies are needed to validate these results in larger number of patients and over a broader timeframe.

Keywords Spinal muscular atrophy · Proteomics · Cerebrospinal fluid · Biomarkers · Machine learning · Artificial intelligence

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neurodegenerative disorder, due to defects in the survival motor neuron (SMN1) gene on chromosome 5, leading to degeneration of motor neurons in the spinal cord, and

inducing a progressive muscular hypotonia and weakness [1].

According to the age at onset and the best motor function achieved, SMA has been classified into five main types with pediatric onset (types 1 to 3, from the most severe to the mildest), and two more recently classified phenotypes,

Extended author information available on the last page of the article

type 0 with antenatal onset, and type 5 with adult onset and a mild phenotype [1]. Disease severity inversely correlates with the number of copies of the SMN2 gene [2, 3], the SMN1 paralogue gene, which produces predominantly an alternatively spliced mRNA transcript lacking the exon 7 and encoding for an unstable SMN protein (SMN Δ 7) [4].

In the last decade, significant improvements have been made in SMA treatment, resulting in three available therapies, namely the SMN2 splicing-modifiers nusinersen (antisense oligonucleotide administered intrathecally) and risdiplam (small molecule with oral route), which upregulate SMN protein levels [5, 6], and onasemnogene abeparvovec (an adeno-associated virus vector-based gene therapy administered once i.v.) [7]. These treatments have improved life expectancy and quality of life in SMA patients, particularly when started in the pre-symptomatic or early stages of the disease [8, 9].

In this scenario, neonatal screening programs are mandatory to ensure rapid diagnosis and guarantee a prompt therapeutic intervention, making the discovery of novel biomarkers urgently required.

To date, the only available and clinically relevant biomarkers are represented by the SMN2 copy number, alongside with two alternative splicing-modulating variants (rs121909192 and rs1454173648), although not uniquely predictive of disease severity [1]. In addition to genetic biomarkers, neurofilaments (NfL) have shown potentiality as serum and cerebrospinal fluid (CSF) biomarker, but inconsistent results prevent their wide use in the clinical setting, especially in adult patients [10].

In the last few years, omics-based techniques have been applied for biomarkers discovery in CSF samples of nusinersen-treated SMA patients [11–18], providing valuable insights on nusinersen-related modification of CSF proteome and metabolome, and identified putative treatment response biomarkers. However, no prognostic biomarkers in naïve patients have been explored so far.

In the context of omics data generation and analysis, machine learning algorithms demonstrated exceptional potential for managing extensive and multidimensional datasets, serving as fundamental tools to facilitate biomarker discovery across various fields, including neuroscience, but their application in SMA remains unexplored [19–22].

We conducted a multi-center retrospective longitudinal study, using an untargeted liquid-chromatography mass spectroscopy-based proteomic approach on CSF samples collected from a large cohort ($n=61$) of SMA1, SMA2 and SMA3 patients at baseline (before starting nusinersen treatment, T0), and after 10 months of therapy (before the sixth nusinersen infusion, T302). The primary objective of the study was to identify CSF prognostic biomarkers at baseline, by combining proteomics data and a machine learning

algorithm. The secondary objective was to describe changes in the proteomic profile at T302 and identify which biological pathways are influenced by nusinersen, through the application of classical bioinformatics approaches.

Results

Study design and population

The study design is summarized in Fig. 1a.

Sixty-one genetically confirmed SMA patients treated with nusinersen, including 19 SMA1, 19 SMA2, and 23 SMA3 subjects, were enrolled in the study (Fig. 1a). Demographic characteristics and clinical data of patients are reported in Table 1.

The median age at T0 was 2.1 years (IQR: 0.7–4.9) in SMA1, 7.7 years (IQR: 2.3–11.8) in SMA2, and 15.3 years (IQR: 7–29.3) in SMA3 (Table 1). Differences in age at T0 were significantly found between the SMA types (SMA1 vs. SMA2, $p<0.005$; SMA1 vs. SMA3, $p<0.0001$; SMA2 vs. SMA3, $p<0.005$; Kruskal-Wallis test, multiple comparison), while gender did not differ among groups (Pearson's Chi squared test p -value = 0.927).

At baseline, median CHOP values in SMA1 was 13/64 (IQR: 3.7–24), while median HFMSE scores were 9/66 (IQR: 2.7–13) in SMA2 and 47/66 (IQR: 29–58) in SMA3 (Fig. 1b).

Identification of putative prognostic biomarkers through machine learning

Proteome analysis at T0 identified 1625 unique proteins. Principal component analysis (PCA) shows separation of proteome profiles in the different SMA subtypes (Fig. 2a). PERMANOVA test carried out on Euclidian distance of proteomics data at T0 revealed that only SMA subtype ($F=5.1894$, $p=0.001$) and age ($F=3.4401$, $p=0.001$) can significantly explain the variance in the data, while the rest of the factors, gender, BMI group, SMN2 copy number, and response status, were not significant ($p>0.05$). Therefore, for the differential abundance analysis, age information was used as a confounding factor.

A machine learning approach, the Random forest (RF) classification algorithm, was then used to test whether the protein expression at T0 could be used to predict the SMA subtypes. All the trained RF models obtained gave accuracy of 1, which is an indicator of over-fitting, and the same accuracy value was obtained from prediction on test datasets, too. To eliminate the possible effects of post-processing of the data and hyper tuning of the RF parameters in model trainings, that might cause data leaking and over-fitting,

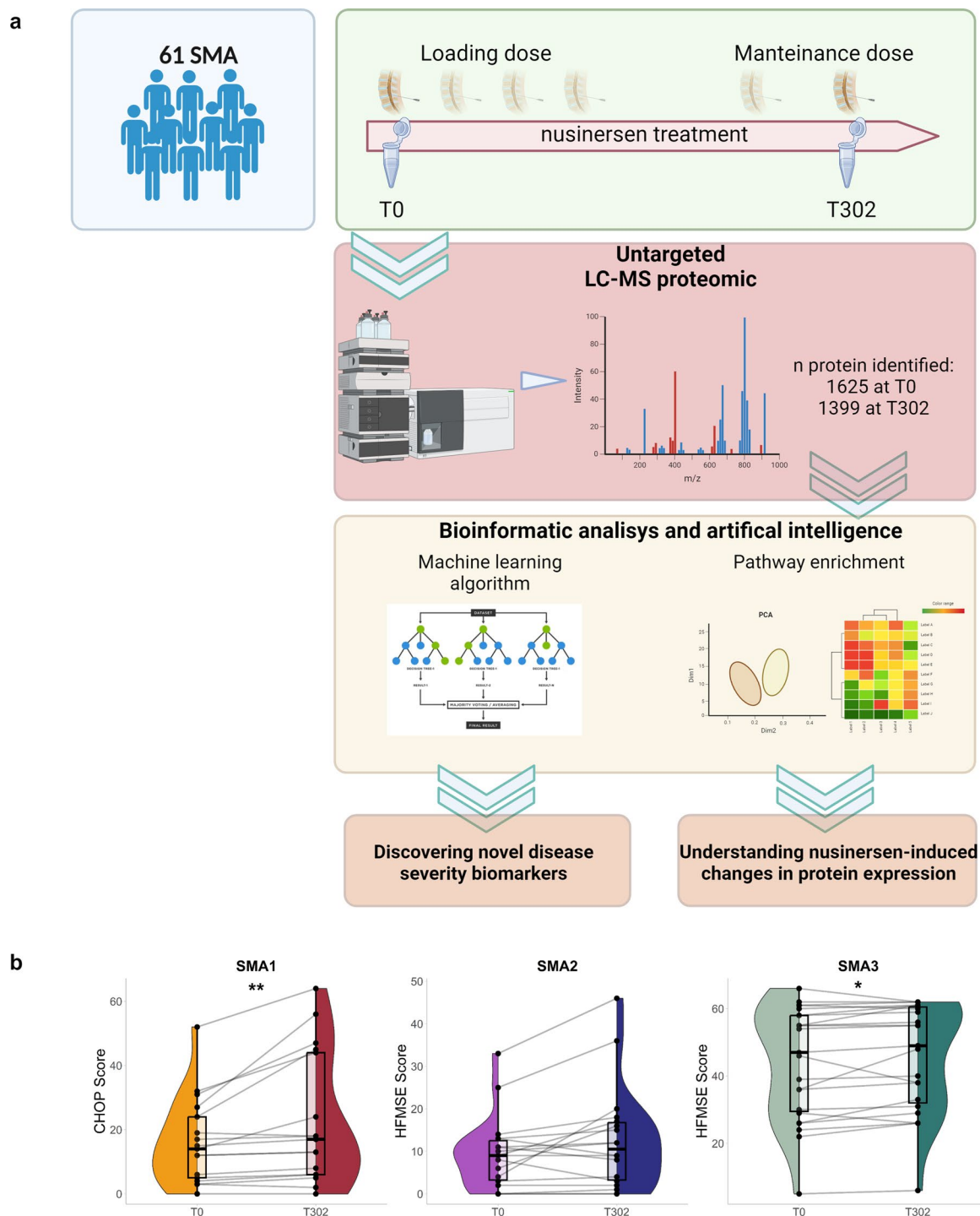


Fig. 1 Study design and population. **(a)** A graphical description of the study is shown. **(b)** Changes in CHOP scores for SMA1 ($n=17$), and HFMSE scores in SMA2 ($n=18$) or SMA3 ($n=23$) patients before (T0) and after (T302) nusinersen treatment. Plots show points for each sample score and paired sample data were connected by lines. Violin

plot shows the distribution of the scores via density, and box plots showing interquartile range; box has sides belonging to lower and upper quartiles, and median depicted by horizontal line. Significance was tested via paired Wilcoxon rank-sum test. Significance test results were shown by “**” for p -value < 0.05 ; “*” for p -value $< .01$

Table 1 Study population description. Age at baseline, gender, number of SMN2 copies, response to therapy, respiratory support and nutrition information are listed in the table

	SMA1 (n = 19)	SMA2 (n = 19)	SMA3 (n = 23)	Total (n = 61)
Age at T0 (median, Q1-Q3)	2.1 (0.7–4.9)	7.7 (2.3–11.8)	15.3 (7–29.3)	6.9 (2.3–13)
Gender (F/M)	11/8	12/7	12/11	30/26
SMN2 copies (n,%)				
2 SMN2	17 (89%)	2 (10%)	3 (13%)	22 (36%)
3 SMN2	2 (10%)	17 (89%)	10 (43%)	29 (48%)
> 3 SMN2	0	0	9 (39%)	9 (15%)
Responders (n,%)	11 (52%)	6 (31%)	6 (23%)	23 (37%)
Respiratory support (n,%)				
Use of non-invasive ventilation	7 (37%)	8 (42%)	1 (4%)	16 (26%)
Tracheostomy	7 (37%)	1 (5%)	0	8 (13%)
Nutrition (n,%)				
Oral	7 (37%)	19 (100%)	23 (100%)	49 (80%)
Nasogastric tube	8 (42%)	0	0	8 (13%)
Gastrostomy	4 (21%)	0	0	4 (6%)

different strategies were followed, including splitting raw dataset into train and test, and applying normalization procedures independently, changing the ratio of train and test datasets, and varying size of grids for hyper parameter tuning

(the detailed strategies employed during optimization and prevention of overfitting and data leakage are described in the Supplementary Methods). All models consistently gave accuracy of 1 on both trained and test datasets, signifying the strength of the proteomics data in SMA subtype classification. Lastly, to further decrease the potential bias of the model on feature selection for the classification arising from the relatively small sample size, 100 different RF models were trained by changing the samples in the train and test datasets, and common proteins across top 30 features, sorted based on mean decrease in Gini coefficient of all 100 RF models, were determined (Supplementary Table 1). Accordingly, 9 proteins were obtained as common features from the 100 models: heat shock protein 90 beta family member 1 (HSP90B1), serpin family F member 2 (SERPINF2), golgi membrane protein 1 (GOLM1), contactin 1 (CNTN1), PVR cell adhesion molecule (PVR), beta-1,4-glucuronyltransferase 1 (B4GAT1), cathepsin F (CTSF), neurexin 3 (NRXN3), and chromosome 16 open reading frame 89 (C16orf89) (Fig. 2b). The maximum number of nodes for model training was set to 3, and we observed that the classification of the three SMA subtypes can be achieved using combinations of two proteins selected based on their differential abundance profiles in SMA subtypes. Out of the 9 selected proteins, CNTN1, B4GAT1, NRXN3, and C16orf89 were

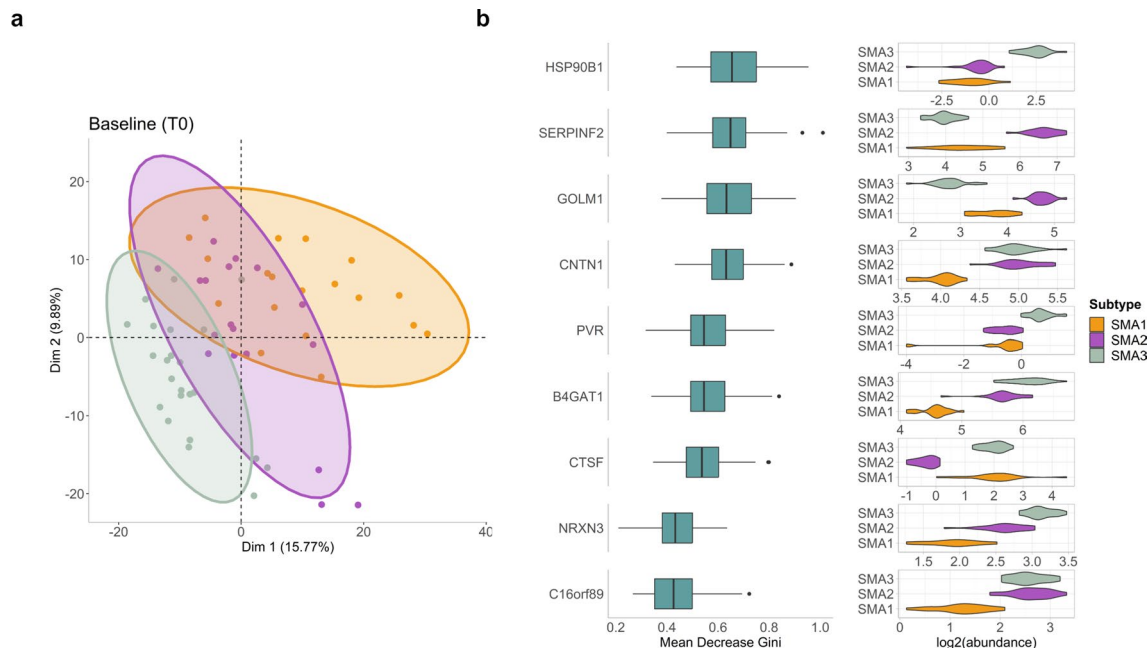


Fig. 2 Random Forest identified new putative biomarkers for SMA severity. **(a)** PCA plot showing the separate clustering patterns of SMA1 (orange), SMA2 (purple) and SMA3 (green) proteomic profiles at T0 based on dimensions 1 and 2. On PCA plots, each sample was shown by points, and ellipses correspond to 95% confidence intervals for each of the subtypes. **(b)** Nine proteins common among top 30 features obtained from 100 different Random Forest models for clas-

sification of SMA types at T0. On the left side of figure, the importance score (based on mean decrease in Gini index) distributions of each protein from 100 models were illustrated by box plots. Log2 abundance of each protein in each SMA type at T0 were shown by violin plots on the right side. Box plots showing interquartile range, and outliers were shown by black dots

identified as key proteins that distinctly separate the most severe form SMA1 from the milder ones (Fig. 2b).

We checked the correlations between age and the 9 proteins above (Supplementary Table 1). Except SERPINF2 and CTSF, 7 of them show a significant moderate correlation with age ($p_{\text{adj}} < 0.05$). Among those, only GOLM1 ($\rho = -0.45$) had negative correlation, while the other 6 proteins, HSP90B1 ($\rho = 0.61$), CNTN1 ($\rho = 0.48$), B4GAT1 ($\rho = 0.77$), PVR ($\rho = 0.56$), NRXN3 ($\rho = 0.47$), and C16orf89 ($\rho = 0.55$) revealed positive associations.

Nusinersen-driven changes in proteomic profile at T302

Proteome analysis at T302 identified 1399 unique proteins. Initially, all samples from each group, independent from their response status, were incorporated into the analysis of

protein changes between T0 (before treatment) and T302 (after 302 days of treatment). When PCA plots were generated using different pairs of axes, more distinct separation was observed when examining dimensions other than first two, as PCA results can be influenced by biases originating from any of the preceding steps, starting from data collection to the end of data processing [23] (Fig. 3a-c).

When the significant changes in proteomic profiles in response to nusinersen-treatment were examined between T0 and T302 for each SMA subtype individually, 147, 135, and 289 proteins were founded, changing significantly in SMA1, SMA2, and SMA3, respectively. Volcano plots highlight downregulated and upregulated proteins at T302 compared to the baseline (Fig. 3d-f), and the heatmaps show hierarchical clustering of significantly changing proteins (Suppl. Figure 1a-c).

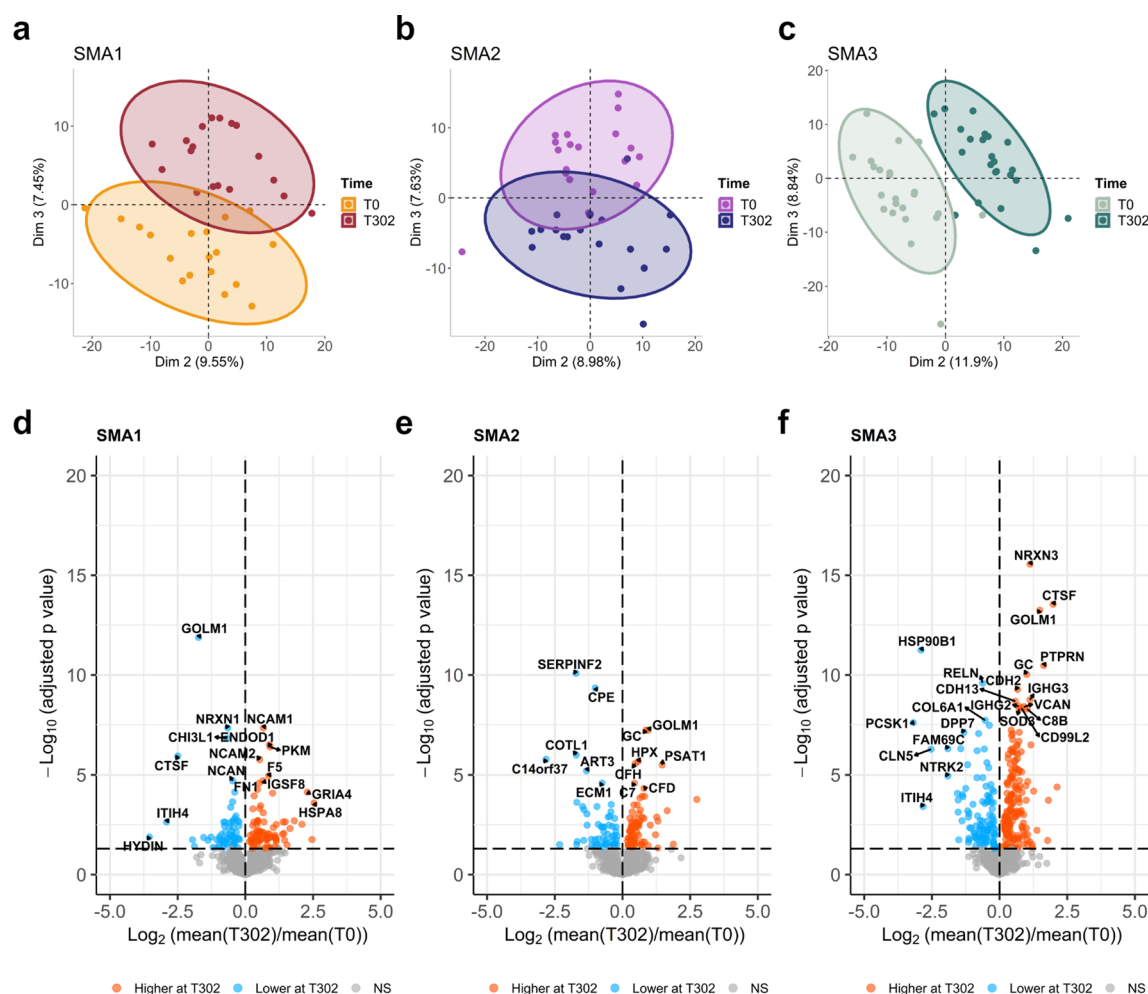


Fig. 3 Nusinersen modulates CSF proteome at T302. The change in clustering based on proteomics between T0 and T302 is shown for (a) SMA1, (b) SMA2, and (c) SMA3 patients, based on second- and third-dimension combinations. PCA plots showing distribution and clustering of samples, and ellipses correspond to 95% confidence intervals

for each time point. Volcano plots are used to show the down- or up-regulated proteins after nusinersen treatment for (d) SMA1, (e) SMA2, and (f) SMA3 samples. Significantly changed proteins ($p_{\text{adj}} < 0.05$) were colored on volcano plots based on their higher (orange) or lower (blue) abundances at T302 compared to T0

Gene ontology (GO) enrichment analysis of biological processes (BP) was performed to investigate enriched pathways of differentially expressed protein (DEPs) after nusinersen treatment. Overall, a common response across all SMA subtypes was observed for proteins down-regulated by the treatment, with the main top enriched pathways related to axonogenesis (GO terms: regulation of axonogenesis, axon guidance, axon development (Fig. 4a-c). Axonogenesis related proteins included components of the semaphorin family (SEMA6A, SEMA7A, SEMA4B), leucine rich repeat and Ig domain containing 1 (LINGO1), plexin-B2 (PLXNB2), L1 cell adhesion molecule (L1CAM), multiple EGF like domains 8 (MEGF8), dystroglycan 1 (DAG1), and reelin (RELN).

Other than the axonogenesis, SMA1 subjects showed platelet degranulation and aminoglycan metabolic processes within the top modulated BPs for down-regulated DEPs.

Pathway enrichment analysis of proteins up-regulated after nusinersen treatment, revealed disease-specific results for SMA1 and a similar signature for the milder phenotypes SMA2 and SMA3 (Fig. 4d-f).

In SMA1 patient's proteome after treatment, up-regulated DEPs were related to glucose metabolism (GO terms: canonical glycolysis, NADH regeneration, glucose catabolic processes to pyruvate), including proteins as pyruvate kinase (PKM), enolase 1 (ENO1), aldolase, fructose-bisphosphate C (ALDO), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1).

In SMA2 and SMA3 proteomes, up-regulated DEPs mainly belonged to two highly intertwined cascades,

namely the coagulation and the complement pathways. In details, proteome of SMA2 subjects after treatment revealed increased coagulation processes (GO terms: protein coagulation cascade, blood coagulation and fibrinolysis), identified by proteins as fibulin1 (FBLN1), coagulation factor II, IX and XII (F1, F9, F12), kininogen1 (KNG1), fibronectin 1 (FN1), serpin family G member 1 (SERPING1), fibrinogen A (FGA), and apolipoprotein E (APOE).

SMA3 proteome after treatment showed enhanced complement activation (GO terms: regulation of complement activation and humoral immune response), including proteins as complement C1q B and C chain (C1QB, C1QC), complement C8 beta chain (C8B), complement molecules (C2, C3, C4A, C6, C7), complement C1r (C1R), complement C1s (C1S), complement Factor I (CFI), clusterin (CLU), and serpin family G member 1 (SERPING1). Complement activation (GO terms: complement activation, classical pathway) also appeared in SMA1 pathway enrichment but was not as significant for this subtype. Proteins included were C1S, CFI, C2, and C4A.

Proteome changes in responder versus non-responder patients

In addition to assessing the temporal changes in protein levels for each SMA subtype using all patient samples, we conducted a comparison of protein fold changes between baseline (T0) and after 302 days of treatment (T302) in responder (R) and non-responder (non-R) patients.

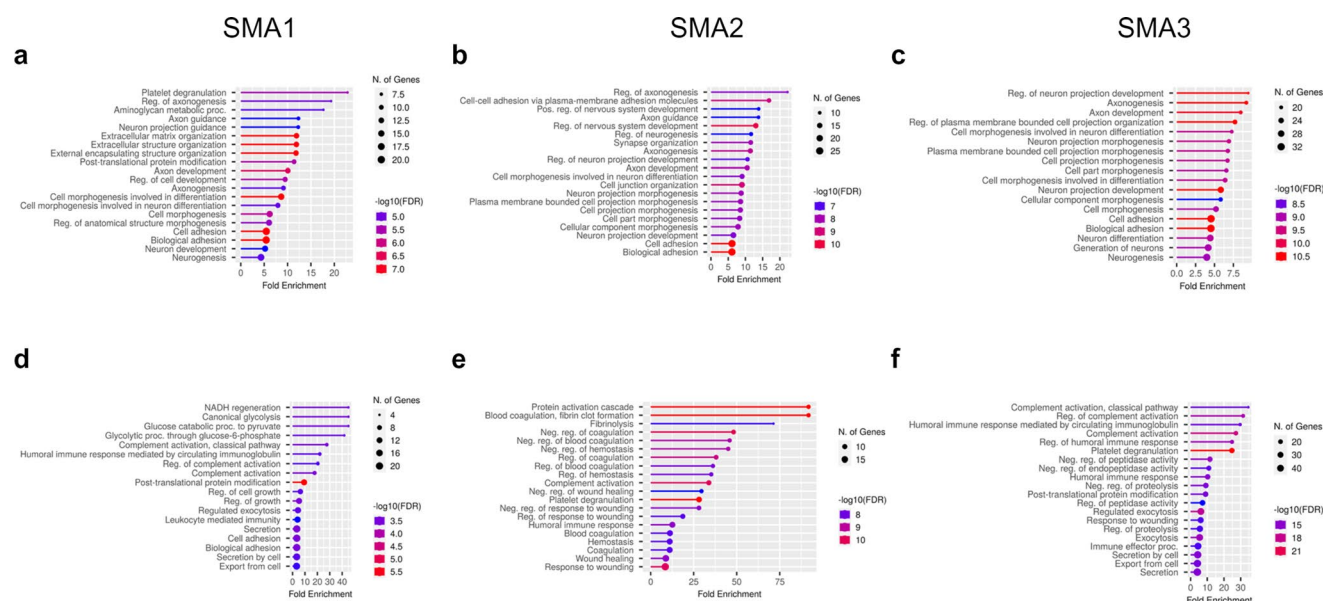


Fig. 4 Biological processes modulated by nusinersen at T302. Top 20 GO pathways for biological processes (BP) enriched by mainly down-regulated (a-c) and up regulated DEPs (d-f), obtained from two clusters from each heatmap, are shown by lollipop plots for each SMA type. Fold enrichment represents the ratio of the percentage of

matched proteins in the query list with pathway-associated proteins to the percentage of query with the background. Bar colors are corresponding to the false discovery rate (FDR) corrected p values for each enriched pathway, and the size of dots are proportional to the number of proteins associated with the respective pathway

Based on outcome measures improvement at T302, we classified as responders 52.6% of SMA1, 33.3% of SMA2, and 26.1% of SMA3. When we check the importance of response status in treatment-based protein level changes by PERMANOVA test for each SMA subtype, only SMA1 had a significance close to threshold ($F = 1.2544$, $p = 0.085$), while the protein changes were determined to be similar between R and non-R in SMA2 ($F = 0.8361$, $p = 0.739$) and SMA3 ($F = 1.0221$, $p = 0.416$) groups. Accordingly, principal components analysis showed better separation of treatment-based CSF proteome change between R and non-R patients in the SMA1 group compared to the SMA2 and SMA3 groups (Fig. 5a-c-d).

The comparison of changes in proteome expression between R and Non-R patients identified 45 DEPs in the SMA1 group, 26 in SMA2, and 26 in SMA3. Volcano plot highlighting downregulated and upregulated proteins at T302 in R vs. non-R was therefore depicted for SMA1 only (Fig. 5b). Among proteins upregulated in SMA1 Responders after treatment, we highlight the cellular communication network factor 3 (NOV/CCN3, $p = 0.0005$), involved

in immunomodulatory processes via T regulatory cells [24], the SPOCK1 ($p = 0.00094$), an extracellular proteoglycan that belongs to the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) family and is involved in the regulation of blood brain barrier (BBB) permeability [25], and the heat shock proteins HSPA1A/HSPA1B ($p = 0.002$), which are highly conserved cellular response to internal and external stress [26]. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2, $p = 0.002$), involved in lymphocyte and macrophage/microglia infiltration as well as myelin and axon degeneration [27], was instead in the pool of downregulated proteins.

Discussion

Advancements in omics technologies have significantly expanded our understanding and exploration of biological mechanisms, facilitating biomarker discovery in neuroscience [28–31]. Machine learning algorithms, a subset of artificial intelligence, prove particularly effective in handling omics datasets, capturing intricate patterns that might be

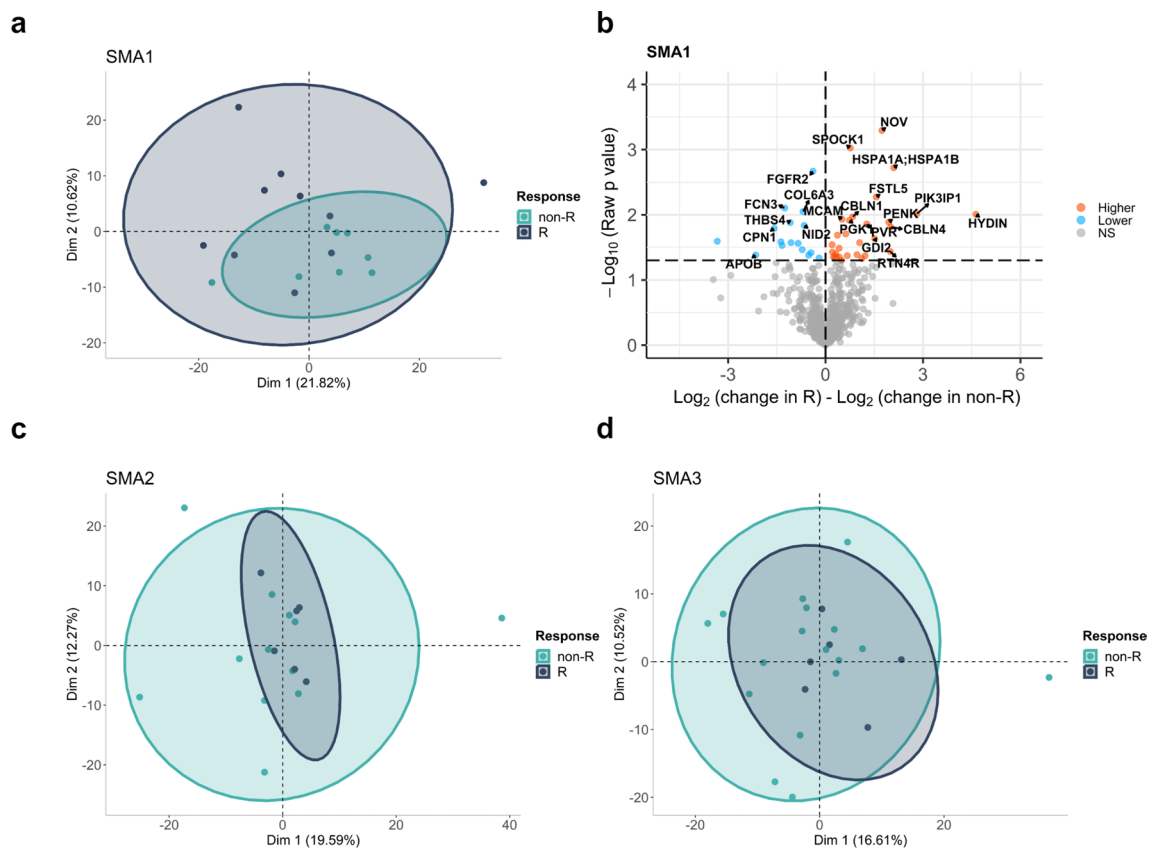


Fig. 5 Responders vs. non-Responders analysis. The clustering patterns of the responders (green) and non-responders (dark grey) based on changes in protein levels after nusinersen treatment were shown by PCA plots based on first two dimensions for (a) SMA1, (c) SMA2, and (d) SMA3. Each dot represents one sample, and ellipses correspond to 95% confidence intervals for each of the subtypes. (b) Volcano

plot for comparison of time-wise changes in protein levels in each responder and non-responder samples. Fold change differences were calculated by subtracting log_2 fold change of proteins between T302 and T0 in non-responders from log_2 fold change between T302 and T0 in responders, and higher and lower changes in responders compared to non-responders were shown by orange and blue colors, respectively

overlooked by traditional statistical methods [19–22, 32, 33].

In the first part of this study, we exploited machine learning to discover novel prognostic biomarkers for SMA. The Random Forest algorithm, applied to the protein expression profile of naïve patients, identified different pivotal proteins capable of classifying the different SMA types based on their differential abundance. Among them, CNTN1 and NRXN3 clearly differentiated the severe form from the milder ones.

CNTN1, one of the axo-glial adhesion molecules, showed the lowest expression levels in SMA1 and higher expression in SMA2 and SMA3 patients. CNTN1 is expressed both in the central and peripheral nervous system [34] and is primarily located at the paranodes, where it forms a tripartite complex contributing to the stabilization of the connection between the axon and the myelin loops [35]. Abnormal intercellular communication between axons and Schwann cells have been recently associated with immature, dysfunctional and vulnerable motor axons in severe SMA patients' human tissues and in a severe SMA mouse model (SMA Δ 7 mice) [36].

Moreover, genetic ablation of *Cntn1* in a zebrafish model results in infertility, reduced animal size, ataxic swimming behavior, and a curved spine, with hypomyelinated neurons compared to wild-type [37]. Similarly, the *Cntn1*^{-/-} mice, display failure to thrive and severe locomotor abnormalities, along with a decreased number of myelinated axons in both the spinal cord and the optic nerve [37]. In the *Smn1*^{-/-}*Smn2*^{+/+} mouse model, a transcriptomic analysis identified the *tnfa-il6-cntn1* pathway as one of the top upregulated pathways in the central nervous system, where *Cntn1* might serve as a protective factor for neurons [38]. Together, these findings point to a crucial role of CNTN1 in the developing nervous system, with possible implications in the pathogenesis of SMA.

NRXN3, a member of the neurexin family (NRXN1, 2 and 3), presynaptic cell adhesion molecules necessary for synapse formation and maintenance [39–41], exhibited a progressive increase in expression levels, with the lowest levels observed in SMA1 patients and the highest in SMA3 patients at baseline. Interestingly, a reduction or altered *Nrxn2* splicing have been observed in both transgenic SMA mice and zebrafish [42], while in vitro studies in motor neurons derived from SMA patients' iPSCs showed a reduction of NRXN2 expression compared to controls, while an over-expression of NRXN2 improved the SMA motor neuron survival, and increase neurite length, suggesting it might act as a gene modifier in SMA [43].

Therefore, considering the role that CNTN1 and NRXN3 play in the nervous system, we foresee their potential as prognostic biomarkers to distinguish severe SMA1 from milder phenotypes in the context of newborn screening

programs, especially in the management of asymptomatic patients. A moderate correlation was found between these markers and the age at baseline, so that future studies to ensure the robustness of our results should focus on larger cohorts with a more uniform age distributions.

To translate our findings into clinical applications, targeted assays such as Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA) for the identified proteins, validation in independent cohorts, and evaluation in more accessible samples like serum are underway.

In the second part of the study, we showed that, at T302, nusinersen significantly modulates the CSF proteome. Our aim was to provide insights about nusinersen-dependent protein changes at the biological processes level, rather than focusing on individual differentially expressed proteins. Through Gene ontology (GO) analysis of biological processes, we found that nusinersen causes both a common effect in all types of SMA, regardless of the severity, and specific effects in the different forms.

Specifically, nusinersen modulated biological processes related to axonogenesis and axon development in all SMA patients. SMN1 defects have been shown to significantly affect motor neuron axon development, maturation, and function in type 1 SMA patients and in a mouse model of severe SMA [36]. A marked delay of SMA motor neuron axon radial growth, which prevents a correct interaction with Schwann cells, have been demonstrated and associated with axon degeneration and loss after birth [36]. As a result, indirect markers of axon degeneration are released by suffering motor neuron and detectable in CSF and bloodstream, such as phosphorylated neurofilament heavy chain (pNfH) and neurofilament light chain (NfL), which are increased both in pre-symptomatic SMA patients with 2 SMN2 copies and symptomatic SMA patients [10, 44–46].

Our findings indicate that nusinersen modulates axonogenesis processes, in line with recent electrophysiological studies demonstrating partial enhancements in axonal maturation in SMA patients undergoing nusinersen treatment [47, 48]. Currently, no biochemical biomarkers capturing a reduction in axon deterioration upon nusinersen treatment are available, except for neurofilaments, which dosage, however, has produced discordant results [10, 45, 46, 49–52].

Among the differentially expressed proteins belonging to the axonogenesis GO term, we detected components of the semaphorine family, in particular SEMA4B, SEMA6A, SEMA7A which were downregulated by nusinersen treatment in all patients. These results are consistent with recent untargeted proteomic studies that identified a reduction in SEMA6A and SEMA7A levels in the CSF of SMA3 patients after 22 months of nusinersen treatment [15], as well as the downregulation of SEMA7A in responders SMA3 subjects

after 10 months of nusinersen [11]. Our data, combined with the previous ones, suggest semaforins, especially SEMA6A and SEMA7A, as a new class of biomarkers for monitoring nusinersen treatment in all SMA patients, regardless of their severity, reflecting axon maintenance and remodeling, as already emerged in other condition [53].

Beyond axonogenesis, nusinersen showed modulation of bioenergetic pathways in SMA1 and inflammatory pathways in SMA2 and SMA3. Previously, Errico et al. reported nusinersen affecting the glucose metabolism selectively in the CSF of SMA1 patients through NMR-metabolomic analysis [13]. Here, we confirm and strengthen these results at a protein level, showing a nusinersen-mediated boost in the protein expression of glycolytic enzymes such as PKM, ENO1, ALDOC, and PGAM1. SMA1 patient's reduced tolerance to fasting is well known [54–56], and an imbalance in glucose metabolism has been reported in SMA2 [57]. Our results suggest a correction of glucose metabolism by nusinersen, although additional studies on blood samples will be necessary to understand whether this effect is specific to the CSF or systemic.

Moreover, with regard to the effects of nusinersen in SMA2 and SMA3 proteome, we report an increase in proteins belonging to the coagulation and the complement cascades, highly interconnected processes [58, 59], sharing common ancestral pathways [60], and contributing to a complex inflammatory network [61]. Furthermore, mediators of the coagulation cascade act as inhibitors/activators of the complement cascade, and vice versa [59]. In our results, SERPING1, an inhibitor of the classical complement cascade, was upregulated in both SMA2 and SMA3 at T302. In SMA2, an upregulation of F12, a potent activator of the C1q molecule in the classical pathway, was noted, while SMA3 showed an increase of several complement cascade components such as C1q, C1s, C2, C3, C4A, C6 and C7. Recently, Faravelli et al. reported that members of the innate immune complement pathways, including SERPING1, were among the most abundant proteins in the CSF of SMA3 patients as detected by untargeted LC-MS [15]. These findings align with recent data suggesting that the complement cascade activation participates to neuroinflammatory processes and contributes to diseases pathogenesis in various neurodegenerative disorders, including Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's diseases, Amyotrophic Lateral Sclerosis and SMA [62–65]. As such, different clinical trials investigating complement therapeutic targets are ongoing in neurologic disorders [65]. Moreover, in a pre-clinical SMA model, the aberrant upregulation of the classical complement proteins C1q and C3, was associated with dysfunction and selective elimination of synapses, and an *in vivo* treatment with an anti-C1q antibody induced a rescue of synapses [64].

In addition to complement activation, increased inflammatory mediators have been reported in both CSF and serum in preclinical models and in SMA patients, indicating that immune dysfunction and neuroinflammation processes are involved in the pathogenesis of SMA [38, 66–69]. In this context, we noted a decreased expression of inflammatory markers, including communication network factor 3 (NOV/CCN3), heat shock proteins HSPA1A/HSPA1B, and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), at T302 in SMA1 Responders, suggesting that treatment with nusinersen promotes better control of pro-inflammatory processes.

In summary, this untargeted LC-MS proteomic profiling in the CSF of SMA patients revealed differences in protein expression in naïve patients and showed nusinersen-related modulation in several biological processes after 10 months of treatment.

We acknowledge some limitations of the study, including the absence of CSF samples from healthy controls and untreated SMA patients, the relatively small sample size within each SMA subtype, the lack of an assay of widely used biomarkers such as NfL to parallel the results obtained, and the limited follow-up period of 10 months, that may constrain the robustness of the conclusions. Further validation in larger, independent cohorts, with uniform age distributions and long-term monitoring, is crucial to confirm the prognostic value of the identified biomarkers and better understand the duration of the observed treatment effects.

Nevertheless, despite these limitations, the integration of proteomics and machine learning in a large cohort of patients has enabled the identification of novel prognostic CSF protein biomarkers for disease severity stratification, providing a new strategy to help guiding precision therapeutic treatment.

Additional confirmatory studies on CSF and serum samples from other SMA patients and healthy controls, even after a longer treatment period, are needed to validate these results.

Methods

Patients characteristics

Genetically confirmed SMA patients treated with nusinersen, have been enrolled in the study from 4 tertiary Italian neuromuscular centers (IRCCS Gaslini Institute-Genoa, Nemo Center-Milan, Ospedale Bambino Gesù-Rome, and Policlinico G. Martino-Messina). SMN2 copy numbers were also available for all but one patient.

All SMA1 patients participated in the compassionate Expanded Access Program (EAP) [70], while SMA2 and SMA3 patients received treatment in a real-world

setting. Nusinersen was administered following the standard protocol.

On the day of nusinersen administration, anthropometric measures, information on ventilatory support (need for non-invasive ventilation or tracheostomy), and nutritional route (oral, nasogastric tube, or gastrostomy) were noted, and functional outcome measures were performed by trained physical therapists at each site (Table 1). SMA1 patients were scored by the Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND) scale [71], while SMA2 and SMA3 patients were evaluated through the Hammersmith Functional Motor Scale – Expanded (HFMSE) [72]. Patients were categorized into Responders (R) and non-Responders (non-R) based on changes in motor function scores from T0 to T302, following previously described criteria. Specifically, SMA1 patients showing an increase in the CHOP score by 4 points, and SMA2-SMA3 subjects achieving a 3-point improvement on the HFMSE scale at T302 were defined Responders [73, 74].

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and ICH GCP guidelines. All subjects and guardians provided written informed consent for the analysis of biological samples, following the approval of local ethics committees (Prot. SMALiQ_2022, 503/2022 - id 12319).

Sample preparation and proteomic analysis

On the day of administration, CSF samples were collected after a fasting period of 4–6 h and stored at -80°C at each site. For the purposes of this study, only CSF collected at baseline (T0; before the first nusinersen intrathecal administration) and at day 302 (T302; before the sixth infusion), were centralized at IRCCS Gaslini, and subsequently subjected to proteomic analysis.

One hundred μl of CSF were denatured, reduced and alkylated in 100 μl of iST-LYSE buffer (PreOmics) for 10 min at 95°C , 1000 rpm. Proteins were isolated by PAC method [75]. Briefly, protein aggregation was induced by addition of 70% ACN and 200 μg of magnetic beads were added to capture aggregated proteins. Magnetic beads were retained by magnet and the supernatant was removed. Beads were washed one time with 1 ml acetonitrile, followed by two wash with 1 ml 70% ethanol. Washed beads were resuspended in 100 μl TRIS 25 mM pH 8 and captured proteins were digested O.N. at 37°C with 0.7 μg Trypsin and 0.3 μg LysC. Obtained peptides were desalted in Stage-Tips [76] and analyzed by a nano-Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry system (nano-UHPLC-MS/MS) using an Ultimate 3000 RSLC coupled to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer.

Elution was performed with an EASY spray column ($75\ \mu\text{m} \times 50\ \text{cm}$, $2\ \mu\text{m}$ particle size, Thermo Scientific) at a flow rate of 250 nl/min with a 100 min non-linear gradient consisting of an increase from 7 to 27% solution B (80% ACN and 20% H_2O , 5% DMSO, 0.1% FA) in 57 min, with a further increase to 45% B in 15 min, followed by 1-minute wash at 80% B and a 20 min re-equilibration at 2% B.

MS scans were acquired at a resolution of 120,000 between 375 and 1,500 m/z and an AGC target of 4.0×10^5 , 50 ms maximum injection time. Advanced Peak Determination was enabled for MS1 measurements. MS/MS spectra were acquired in the linear ion trap (rapid scan mode) with an AGC target of 3.0×10^4 and a 30 ms maximum injection time. For precursor selection, we prioritized the least abundant signals in the three ranges 375–575 m/z , 574–775 m/z and 774–1500 m/z . Quadrupole isolation with a 0.7 m/z isolation window was used, and Dynamic Exclusion was set at 25 s. HCD was performed using 30% collision energy.

MaxQuant software version 1.6.17.0 was used to process data [77]. A false discovery rate was set at 0.01 for the identification of proteins, peptides and peptide-spectrum match (PSM). A minimum of 6 amino acids was required for peptide identification. Andromeda engine, incorporated into MaxQuant software, was used to search MS/MS spectra against Uniprot human database (release UP000005640_9606 December 2020). In the processing the variable modifications are Acetyl (Protein N-Term), Oxidation (M), Deamidation (NQ), on the contrary, the Carbamidomethyl (C) was selected as fixed modification. Quantification intensities were calculated by the default fast MaxLFQ algorithm with the activated option 'match between runs'.

Machine learning algorithm

The Random Forest (RF) machine learning algorithm, previously applied to metabolomics and proteomics data for classification and regression analysis [78, 79], was adopted to classify SMA types based on protein expression levels at baseline. Random Forest models were trained for classification of SMA subtypes using the proteomics data obtained at T0. All steps were carried in "R" free software using "caret" (ver. 6.0–94) and "randomForest" (ver. 4.7–1.1) packages. The detailed strategies employed during optimization and prevention of overfit and data leakage are described in the Supplementary Methods. All the steps were carried out individually, with proteomics data only. To investigate the effects of different hyperparameter tuning strategies on obtained classification accuracies, data partitioning ratio, mtry (number of features to be randomly selected at each split), number of trees, and maximum number of nodes were assigned to different sets of values. Besides varying sets of parameters, addition of cross-validation and post-processing (normalization, transformation, scaling) of

training and test data after partitioning were included in optimizations to avoid potential data loss. At the end of optimizations, normalized and scaled T0 proteomics data were used, and partitioned into train and test datasets in 80% and 20% ratios, respectively. Model training was carried out using 1000 trees and maximum number of nodes, set to 3. Classification accuracy of the trained model on test data was calculated by comparing the real and predicted SMA classes. List of important variables were recorded for the trained model by extracting top 30 features sorted by mean decrease in Gini coefficient. Each step, ranging from data partitioning to the selection of important variables, was repeated 100 times, with the seed set to numbers between 1 and 100. Finally, a set of features common in all lists of top 30 important variables from 100 trained models was obtained.

Statistical analysis

Log₂-transformed and median-centered intensity values were used for downstream statistical analyses. PERMANOVA with Euclidean distance method was used to test significance of subtype, sex, age, smn2 gene copy number, and BMI. For comparison of protein compositions of SMA1, SMA2, and SMA3 subtype samples before treatment, analysis of covariance (ANCOVA) was used by adjusting for age. Features with raw p value less than 0.05 were evaluated as significant and used in clustering for each pairwise comparison. Before and after treatment comparisons of SMA1, SMA2, and SMA3 patients were carried out individually, using paired two-sided t-test, and obtained p values were adjusted for multiple hypothesis testing using Benjamini-Hochberg method. Log₂ fold changes in responders and non-responders were calculated by subtracting the values at T302 from T0 for each SMA subtype, and unpaired two-sided t-test was used for the comparison. Raw p values were used for significance. For each pairwise comparison results, volcano plots were produced using EnhancedVolcano (ver. 1.16.0). Principal component analysis (PCA) was carried out using FactoMineR (ver. 2.9), and visualizations with different pairs of dimensions were obtained using factoextra package (ver. 1.0.7).

For correlation analysis between age and 9 biomarker candidates, Spearman correlation was performed and obtained p values were adjusted using Benjamini-Hochberg method.

Hierarchical clustering

Intensity data of the filtered features were scaled to have a mean value of zero with standard deviation of one. The Euclidean distances were calculated between samples and between proteins using dist function, and then, Ward-D2 clustering was performed for samples and for proteins by hclust function. Heatmaps were plotted via heatmap.2 function in gplots

package (ver. 3.1.3). In order to divide clustered into two clusters, mainly corresponding to increasing and decreasing proteins for each pairwise comparison, cutree function with k=2 was used.

Pathway enrichment

Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed for proteins in each cluster, separately. For that purpose, respective gene symbols of the proteins in each cluster were converted into Entrez ID's by mapIds function in AnnotationDbi package org. Hs.eg.db (ver. 3.14.0). If Entrez ID could not be obtained for a protein, and additional manual curation step was performed using protein ID as query on UniProt website (www.uniprot.org/uniprotkb/<protein.id>/entry, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh131>). If the protein IDs for a single protein entry correspond to different proteins, it was excluded from enrichment analysis. For each clusters, obtained list of Entrez IDs were submitted to ShinyGO (ver 0.76, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>) after selecting "Human" as the organism with other default settings. Enrichment was performed using three different GO pathway databases; "GO Biological Process", "GO Cellular Compartment", and "GO Molecular Function". Tables for all enriched pathways and lollipop plots were exported.

In addition to the GO enrichment analysis, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of biological processes (BP) was performed. The results are provided as Supplementary Fig. 2a-f.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05426-6>.

Acknowledgements ES was scholar of TUBITAK 2244 Industrial PhD between 2019 and 2023 (project No: 118C039). CP, MP, AD, EB, CB are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases (ERN-NMD).

Author contributions CP, SC, NB, MP, AD, MP, MS, SM, EA, VAS, EM, EB, and CB were involved in patients' follow-up, CSF collection and drug administration. SB, AP, EP, and MB performed laboratory assessment with AP supervision. CP, CB, MB, AP, ES and US analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding This work was partly supported by Ricerca Corrente 2021–2022 (Italian Ministry of Health). Open access funding provided by Università degli Studi di Genova within the CRUI-CARE Agreement.

Data availability The mass spectrometry data have been deposited to the ProteomeX-change Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifiers: PXD047529 (Reviewer account details: Username: reviewer_pxd047529@ebi.ac.uk Password: oRxG3oEc).

Declarations

Ethics approval and consent to participate The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and ICH GCP guidelines. All subjects and guardians provided written informed consent for the analysis of biological samples, following the approval of local ethics committees (Prot. SMALiQ_2022, 503/2022 - id 12319).

Consent for publication Authors gave consent for the publication of the manuscript.

Conflict of interest The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Mercuri E, Sumner CJ, Muntoni F, Darras BT, Finkel RS (2022) Spinal muscular atrophy. *Nat Rev Dis Primers* 8:52. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00380-8>
2. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70:358–368. <https://doi.org/10.1086/338627>
3. Calucho M, Bernal S, Alias L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, Aller E, Fernández RM, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Cuscó I, Fuentes-Prior P, Tizzano EF (2018) Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: an analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord* 28:208–215. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.01.003>
4. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177–1183. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>
5. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsa J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM (2016) Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 388:3017–3026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8)
6. Mercuri E, Baranello G, Boespflug-Tanguy O, De Waele L, Goe-mans N, Kirschner J, Masson R, Mazzone ES, Pechmann A, Pera MC, Vuillerot C, Bader-Weder S, Gerber M, Gorni K, Hoffart J, Kletzl H, Martin C, McIver T, Scalco RS, Yeung WY, Servais L, SUNFISH Working Group (2023) Risdiplam in types 2 and 3 spinal muscular atrophy: a randomised, placebo-controlled, dose-finding trial followed by 24 months of treatment. *Eur J Neurol* 30:1945–1956. <https://doi.org/10.1111/ene.15499>
7. Mercuri E, Muntoni F, Baranello G, Masson R, Boespflug-Tanguy O, Bruno C, Corti S, Daron A, Deconinck N, Servais L, Straub V, Ouyang H, Chand D, Tauscher-Wisniewski S, Mendonca N, Lavrov A, STRIVE-EU study group (2021) Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy type 1 (STRIVE-EU): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 20:832–841. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00251-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00251-9)
8. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, Kirschner J, Kuntz NL, Parsons JA, Ryan MM, Butterfield RJ, Topaloglu H, Ben-Omran T, Sansone VA, Jong YJ, Shu F, Staropoli JF, Kerr D, Sandrock AW, Stebbins C, Petrillo M, Braley G, Johnson K, Foster R, Gheuens S, Bhan I, Reyna SP, Fradette S, Farwell W, NURTURE Study Group (2019) Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: interim efficacy and safety results from the phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord* 29:842–856. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.09.007>
9. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, McMillan HJ, Finkel RS, Swoboda KJ, Kwon JM, Zaidman CM, Chiriboga CA, Iannaccone ST, Krueger JM, Parsons JA, Shieh PB, Kavanagh S, Wiggerson M, Tauscher-Wisniewski S, McGill BE, Macek TA (2022) Onasemnogene Abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the phase III SPRINT trial. *Nat Med* 28:1390–1397. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01867-3>
10. Rich KA, Fox A, Yalvac M, Heintzman S, Tellez M, Bartlett A, Severyn S, Linsenmayer M, Kelly K, Reynolds J, Sterling GB, Weaver T, Rajneesh K, Pino MG, Arnold WD, Elsheikh B, Kolb SJ (2022) Neurofilament levels in CSF and serum in an adult SMA cohort treated with Nusinersen. *J Neuromuscul Dis* 9:111–119. <https://doi.org/10.3233/JND-210735>
11. Kessler T, Latzer P, Schmid D, Warnken U, Saffari A, Ziegler A, Kollmer J, Möhlenbruch M, Ulfert C, Herweh C, Wildemann B, Wick W, Weiler M (2020) Cerebrospinal fluid proteomic profiling in nusinersen-treated patients with spinal muscular atrophy. *J Neurochem* 153:650–661. <https://doi.org/10.1111/jnc.14953>
12. Bianchi L, Sframeli M, Vantaggiato L, Vita GL, Ciranni A, Polito F, Oteri R, Gitto E, Di Giuseppe F, Angelucci S, Versaci A, Messina S, Vita G, Bini L, Aguenouz M (2021) Nusinersen Modulates Proteomics Profiles of Cerebrospinal Fluid in spinal muscular atrophy type 1 patients. *Int J Mol Sci* 22:4329. <https://doi.org/10.3390/ijms22094329>
13. Errico F, Marino C, Grimaldi M, Nuzzo T, Bassareo V, Valsecchi V, Panicucci C, Di Schiavi E, Mazza T, Bruno C, D'Amico A, Carta M, D'Ursi AM, Bertini E, Pellizzoni L, Usiello A (2022) Nusinersen induces Disease-Severity-Specific Neurometabolic effects in spinal muscular atrophy. *Biomolecules* 12:1431. <https://doi.org/10.3390/biom12101431>
14. Schorling DC, Kölbel H, Hentschel A, Pechmann A, Meyer N, Wirth B, Rombo R, SMARtCARE consortium, Sickmann A, Kirschner J, Schara-Schmidt U, Lochmüller H, Roos A (2022) Cathepsin D as biomarker in cerebrospinal fluid of nusinersen-treated patients with spinal muscular atrophy. *Eur J Neurol* 29:2084–2096. <https://doi.org/10.1111/ene.15331>
15. Faravelli I, Gagliardi D, Abati E, Meneri M, Ongaro J, Magri F, Parente V, Petrozzi L, Ricci G, Farè F, Garrone G, Fontana M, Caruso D, Siciliano G, Comi GP, Govoni A, Corti S, Ottoboni L (2023) Multi-omics profiling of CSF from spinal muscular atrophy type 3 patients after nusinersen treatment: a 2-year follow-up multicenter retrospective study. *Cell Mol Life Sci* 80:241. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04885-7>
16. Beaudin M, Kamali T, Tang W, Hagerman KA, Dunaway Young S, Ghiglieri L, Parker DM, Lehallier B, Tesi-Rocha C, Sampson

- JB, Duong T, Day JW (2023) Cerebrospinal fluid proteomic changes after Nusinersen in patients with spinal muscular atrophy. *J Clin Med* 12:6696. <https://doi.org/10.3390/jcm12206696>
17. Babić M, Banovi M, Berečić I, Banić T, BabićLeko M, Ulašec M, Junakovi A, Kopic J, Sertić J, Barišić N, Šimić G (2023) Molecular biomarkers for the diagnosis, prognosis, and pharmacodynamics of spinal muscular atrophy. *Journal of clinical medicine*. *J Clin Med* 12:5060. <https://doi.org/10.3390/jcm12155060>
 18. Meneri M, Abati E, Gagliardi D, Faravelli I, Parente V, Ratti A, Verde F, Ticozzi N, Comi GP, Ottoboni L, Corti S (2023) Identification of novel biomarkers of spinal muscular atrophy and therapeutic response by Proteomic and Metabolomic Profiling of Human Biological Fluid samples. *Biomedicines* 11:1254. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051254>
 19. Chang CH, Lin CH, Lane HY (2021) Machine learning and novel biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 22:2761. <https://doi.org/10.3390/ijms22052761>
 20. Mégret L, Mendoza C, Arrieta Lobo M, Brouillet E, Nguyen TT, Bouaziz O, Chambaz A, Néri C (2022) Precision machine learning to understand micro-RNA regulation in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci* 15:914830. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.914830>
 21. Xu J, Mao C, Hou Y, Luo Y, Binder JL, Zhou Y, Bekris LM, Shin J, Hu M, Wang F, Eng C, Oprea TI, Flanagan ME, Pieper AA, Cummings J, Leverenz JB, Cheng F (2022) Interpretable deep learning translation of GWAS and multi-omics findings to identify pathobiology and drug repurposing in Alzheimer's disease. *Cell Rep* 41:111717. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111717>
 22. Catanese A, Rajkumar S, Sommer D, Masrori P, Hersmus N, Van Damme P, Witzel S, Ludolph A, Ho R, Boeckers TM, Mulaw M (2023) Multiomics and machine-learning identify novel transcriptional and mutational signatures in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 146:3770–3782. <https://doi.org/10.1093/brain/awad075>
 23. Elhaik E (2022) Principal component analyses (PCA)-based findings in population genetic studies are highly biased and must be reevaluated. *Sci Rep* 12:14683. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14395-4>
 24. Naughton M, Moffat J, Eleftheriadis G, de la Vega Gallardo N, Young A, Falconer J, Hawkins K, Pearson B, Perbal B, Hogan A, Moynagh P, Loveless S, Robertson NP, Gran B, Kee R, Hughes S, McDonnell G, Howell O, Fitzgerald DC (2020) CCN3 is dynamically regulated by treatment and disease state in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 17:349. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02025-7>
 25. O'Brown NM, Patel NB, Hartmann U, Klein AM, Gu C, Megason SG (2023) The secreted neuronal signal Spock1 promotes blood-brain barrier development. *Dev Cell* 58:1534–1547e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.06.005>
 26. Lyon MS, Milligan C (2019) Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: new perspectives. *Neurosci Lett* 711:134462. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134462>
 27. Rajendran R, Böttiger G, Stadelmann C, Karnati S, Berghoff M (2021) FGF/FGFR pathways in multiple sclerosis and in its Disease models. *Cells* 10:884. <https://doi.org/10.3390/cells10040884>
 28. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Tiedt S, Makris K, Jickling GC, Dabette S, Sanchez JC, Bustamante A (2020) Multilevel omics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets for stroke. *Nat Rev Neurol* 16:247–264. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0350-6>
 29. Aerqin Q, Wang ZT, Wu KM, He XY, Dong Q, Yu JT (2022) Omics-based biomarkers discovery for Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 79:585. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04614-6>
 30. Raghunathan R, Turajane K, Wong LC (2022) Biomarkers in neurodegenerative diseases: Proteomics spotlight on ALS and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 23:9299. <https://doi.org/10.3390/ijms23169299>
 31. Schumacher-Schuh A, Bieger A, Borelli WV, Portley MK, Awad PS, Bandres-Ciga S (2022) Advances in Proteomic and metabolomic profiling of neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 12:792227. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.792227>
 32. Acharjee A, Larkman J, Xu Y, Cardoso VR, Gkoutos G (2020) A random forest based biomarker discovery and power analysis framework for diagnostics research. *BMC Med Genomics* 13:178. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00826-6>
 33. Bettencourt C, Skene N, Bandres-Ciga S, Anderson E, Winchester LM, Foote IF, Schwartzentruber J, Botia JA, Nalls M, Singleton A, Schilder BM, Humphrey J, Marzi SJ, Toomey CE, Kleifath AA, Harshfield EL, Garfield V, Sandor C, Keat S, Tamburin S, Frigero CS, Lourida I; Deep Dementia Phenotyping (DEMON) Network; Ranson JM, Llewellyn DJ (2023) Artificial intelligence for dementia genetics and omics. *Alzheimers Dement* 19:5905–5921. <https://doi.org/10.1002/alz.13427>
 34. Kalafatakis I, Savvaki M, Velona T, Karagogeos D (2021) Implication of contactins in demyelinating pathologies. *Life (Basel)* 11:51. <https://doi.org/10.3390/life11010051>
 35. Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Lustig M, Grumet M, Hemperly J, Peles E, Salzer JL (2000) Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci* 20:8354–8364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08354.2000>
 36. Kong L, Valdivia DO, Simon CM, Hassinan CW, Delestrée N, Ramos DM, Park JH, Pilato CM, Xu X, Crowder M, Grzyb CC, King ZA, Petrillo M, Swoboda KJ, Davis C, Lutz CM, Stephan AH, Zhao X, Weetall M, Naryshkin NA, Crawford TO, Mentis GZ, Sumner CJ (2021) Impaired prenatal motor axon development necessitates early therapeutic intervention in severe SMA. *Sci Transl Med* 13:eabb6871. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb6871>
 37. Djannatian M, Timmler S, Arends M, Luckner M, Weil MT, Alexopoulos I, Snaidero N, Schmid B, Misgeld T, Möbius W, Schifferer M, Peles E, Simons M (2019) Two adhesive systems cooperatively regulate axon ensheathment and myelin growth in the CNS. *Nat Commun* 10:4794. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12789-z>
 38. Yang CW, Chen CL, Chou WC, Lin HC, Jong YJ, Tsai LK, Chuang CY (2016) An Integrative Transcriptomic Analysis for identifying Novel Target genes corresponding to Severity Spectrum in spinal muscular atrophy. *PLoS ONE* 11:e0157426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157426>
 39. Kamal N, Jafari Khamirani H, Dara M, Dianatpour M (2023) NRXN3 mutations cause developmental delay, movement disorder, and behavioral problems: CRISPR edited cells based WES results. *Gene* 2023 867:147347. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147347>
 40. Lloyd BA, Han Y, Roth R, Zhang B, Aoto J (2023) Neurexin-3 subsynaptic densities are spatially distinct from Neurexin-1 and essential for excitatory synapse nanoscale organization in the hippocampus. *Nat Commun* 14:4706. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40419-2>
 41. Trotter JH, Wang CY, Zhou P, Nakahara G, Südhof TC (2023) A combinatorial code of neurexin-3 alternative splicing controls inhibitory synapses via a trans-synaptic dystroglycan signaling loop. *Nat Commun* 14:1771. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36872-8>
 42. See K, Yadav P, Giegerich M, Cheong PS, Graf M, Vyas H, Lee SG, Mathavan S, Fischer U, Sendtner M, Winkler C (2014) SMN deficiency alters Nrnx2 expression and splicing in zebrafish and mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 23:1754–1770. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt567>
 43. Rizzo F, Nizzardo M, Vashisht S, Molteni E, Melzi V, Taiana M, Salani S, Santonicola P, Di Schiavi E, Bucchia M, Bordoni A, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP, Pozzoli U, Corti S (2019) Key

- role of SMN/SYNERP and RNA-Motif 7 in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons. *Brain* 142:276–294. <https://doi.org/10.1093/brain/awy330>
44. Blaschek A, Kölbl H, Schwartz O, Köhler C, Gläser D, Eggermann K, Hannibal I, Schara-Schmidt U, Müller-Felber W, Vill K (2022) Newborn screening for SMA - can a wait-and-see strategy be responsibly justified in patients with four SMN2 copies? *J Neuromuscul Dis* 9:597–605. <https://doi.org/10.3233/JND-221510>
 45. Nitz E, Smitka M, Schallner J, Akgün K, Ziemssen T, von der Hagen M, Tüngler V (2021) Serum neurofilament light chain in pediatric spinal muscular atrophy patients and healthy children. *Ann Clin Transl Neurol* 8:2013–2024. <https://doi.org/10.1002/acn3.51449>
 46. Olsson B, Alberg L, Cullen NC, Michael E, Wahlgren L, Kroksmark AK, Rostasy K, Blennow K, Zetterberg H, Tulinus M (2019) NFL is a marker of treatment response in children with SMA treated with nusinersen. *J Neurol* 266:2129–2136. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09547-y>
 47. Kariyawasam D, D'Silva A, Howells J, Herbert K, Geelan-Small P, Lin CS, Farrar MA (2020) Motor unit changes in children with symptomatic spinal muscular atrophy treated with nusinersen. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 92:78–85. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-324254>
 48. Kariyawasam DST, D'Silva AM, Herbert K, Howells J, Carey K, Kandula T, Farrar MA, Lin CS (2022) Axonal excitability changes in children with spinal muscular atrophy treated with nusinersen. *J Physiol* 600:95–109. <https://doi.org/10.1113/JP282249>
 49. Faravelli I, Meneri M, Saccomanno D, Velardo D, Abati E, Gagliardi D, Parente V, Petrozzi L, Ronchi D, Stocchetti N, Calderini E, D'Angelo G, Chidini G, Prandi E, Ricci G, Siciliano G, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Magri F, Govoni A (2020) Nusinersen treatment and cerebrospinal fluid neurofilaments: an explorative study on spinal muscular atrophy type 3 patients. *J Cell Mol Med* 24:3034–3039. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14939>
 50. Darras BT, Crawford TO, Finkel RS, Mercuri E, De Vivo DC, Oskoui M, Tizzano EF, Ryan MM, Muntoni F, Zhao G, Staropoli J, McCampbell A, Petrillo M, Stebbins C, Fradette S, Farwell W, Sumner CJ (2019) Neurofilament as a potential biomarker for spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 6:932–944. <https://doi.org/10.1002/acn3.779>
 51. Milella G, Introna A, D'Errico E, Fraddosio A, Scaglione G, Morea A, Ucci M, Ruggieri M, Mastrapasqua M, Megna M, Puntillo F, Simone IL (2021) Cerebrospinal fluid and clinical profiles in adult type 2–3 spinal muscular atrophy patients treated with Nusinersen: an 18-Month single-centre experience. *Clin Drug Investig* 41:775–784. <https://doi.org/10.1007/s40261-021-01071-0>
 52. Wurster CD, Steinacker P, Günther R, Koch JC, Lingor P, Uzelac Z, Witzel S, Wollinsky K, Winter B, Osmanovic A, Schreiber-Katz O, Al Shweiki R, Ludolph AC, Petri S, Hermann A, Otto M, MND-Net (2020) Neurofilament light chain in serum of adolescent and adult SMA patients under treatment with nusinersen. *J Neurol* 267:36–44. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09547-y>
 53. Carulli D, de Winter F, Verhaagen J (2021) Semaphorins in adult nervous system plasticity and disease. *Front Synaptic Neurosci* 13:672891. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.672891>
 54. Ørngreen MC, Zacho M, Hebert A, Laub M, Vissing J (2003) Patients with severe muscle wasting are prone to develop hypoglycemia during fasting. *Neurology* 61:997–1000. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000086813.59722.72>
 55. Berti B, Onesimo R, Leone D, Palermo C, Giorgio V, Buon-senso D, Pane M, Mercuri E (2020) Hypoglycaemia in patients with type 1 SMA: an underdiagnosed problem? *Arch Dis Child* 105:707. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2019-318120>
 56. Deguise MO, Chehade L, Kothary R (2021) Metabolic dysfunction in spinal muscular atrophy. *Int J Mol Sci* 22:5913. <https://doi.org/10.3390/ijms22115913>
 57. Ørngreen MC, Andersen AG, Eisum AS, Hald EJ, Raaschou-Pedersen DE, Løkken N, Høi-Hansen CE, Vissing J, Born AP, van Hall G (2021) Prolonged fasting-induced hyperketosis, hypoglycaemia and impaired fat oxidation in child and adult patients with spinal muscular atrophy type II. *Acta Paediatr* 110:3367–3375. <https://doi.org/10.1111/apa.16074>
 58. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M (2008) Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 632:71–79. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78952-1_6
 59. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Brückner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M (2010) Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 185:5628–5636. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903678>
 60. Krem MM, Di Cera E (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci* 27:67–74. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)00207-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)00207-2)
 61. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776–787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>
 62. Magdalon J, Mansur F, Teles E, Silva AL, de Goes VA, Reiner O, Sertié AL (2020) Complement system in Brain Architecture and Neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci* 14:23. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00023>
 63. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
 64. Vukojicic A, Delestrée N, Fletcher EV, Pagiazitis JG, Sankaranarayanan S, Yednock TA, Barres BA, Mentis GZ (2019) The classical complement pathway mediates Microglia-Dependent remodeling of spinal motor circuits during development and in SMA. *Cell Rep* 29:3087–3100e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.013>
 65. Gavrilaki M, Kimiskidis VK, Gavrilaki E (2020) Precision Medicine in Neurology: the inspirational paradigm of complement therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)* 13:341. <https://doi.org/10.3390/ph13110341>
 66. Deguise MO, Kothary R (2017) New insights into SMA pathogenesis: immune dysfunction and neuroinflammation. *Ann Clin Transl Neurol* 4:522–530. <https://doi.org/10.1002/acn3.423>
 67. Wan B, Feng P, Guan Z, Sheng L, Liu Z, Hua Y (2018) A severe mouse model of spinal muscular atrophy develops early systemic inflammation. *Hum Mol Genet* 27:4061–4076. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy300>
 68. Bonanno S, Cavalcante P, Salvi E, Giagnorio E, Malacarne C, Cattaneo M, Andreetta F, Venerando A, Pensato V, Gellera C, Zanin R, Arnoldi MT, Dosi C, Mantegazza R, Masson R, Maggi L, Marcuzzo S (2022) Identification of a cytokine profile in serum and cerebrospinal fluid of pediatric and adult spinal muscular atrophy patients and its modulation upon nusinersen treatment. *Front Cell Neurosci* 16:982760. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.982760>
 69. Nuzzo T, Russo R, Errico F, D'Amico A, Tewelde AG, Valletta M, Hassan A, Tosi M, Panicucci C, Bruno C, Bertini E, Chamberla, Pellizzoni L, Usiello A (2023) Nusinersen mitigates neuroinflammation in severe spinal muscular atrophy patients. *Commun Med (Lond)* 3:28. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00256-2>
 70. Pane M, Palermo C, Messina S, Sansone VA, Bruno C, Catteruccia M, Sframeli M, Albamonte E, Pedemonte M, D'Amico A, Brigati G, de Sanctis R, Coratti G, Lucibello S, Bertini E, Vita G, Danilo Tiziano F, Mercuri E, Italian EAP, Working Group (2018) An observational study of functional abilities in infants, children,

- and adults with type 1 SMA. *Neurol* 2018 91:e696–e703. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006050>
71. Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, Scott C, Pane M, Messina S, Bertini E, Mercuri E, Finkel RS (2010) The children's hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord* 20:155–161. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.014>
 72. O'Hagen JM, Glanzman AM, McDermott MP, Ryan PA, Flickinger J, Quigley J, Riley S, Sanborn E, Irvine C, Martens WB, Annis C, Tawil R, Oskoui M, Darras BT, Finkel RS, De Vivo DC (2007) An expanded version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III patients. *Neuromuscul Disord* 17:693–697. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.05.009>
 73. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzman AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De Vivo DC, ENDEAR Study Group (2017) Nusinersen versus Sham Control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 377:1723–1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
 74. Pechmann A, Behrens M, Dörnbrack K, Tassoni A, Wenzel F, Stein S, Vogt S, Zöller D, Bernert G, Hagenacker T, Schara-Schmidt U, Walter MC, Bertsche A, Vill K, Baumann M, Baumgartner M, Cordts I, Eisenkölbl A, Flotats-Bastardas M, Frieze J, Günther R, Hahn A, Horber V, Husain RA, Illsinger S, Jahnel J, Johannsen J, Köhler C, Kölbl H, Müller M, von Moers A, Schwerin-Nagel A, Reihle C, Schlachter K, Schreiber G, Schwartz O, Smitka M, Steiner E, Trollmann R, Weiler M, Weiß C, Wiegand G, Wilichowski E, Ziegler A, Lochmüller H, Kirschner J, SMARtCARE study group (2022) Improved upper limb function in non-ambulant children with SMA type 2 and 3 during nusinersen treatment: a prospective 3-years SMARtCARE registry study. *Orphanet J Rare Dis* 17:384. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02547-8>
 75. Bath TS, Tollenaere MX, Rüther P, Gonzalez-Franquesa A, Prabhakar BS, Bekker-Jensen S, Deshmukh AS, Olsen JV (2019) Protein aggregation capture on Microparticles enables Multipurpose Proteomics Sample Preparation. *Mol Cell Proteom* 18:1027–1035. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR118.001270>
 76. Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* 11:319–324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
 77. Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
 78. Alakwaa FM, Chaudhary K, Garmire LX (2018) Deep learning accurately predicts estrogen receptor status in breast Cancer Metabolomics Data. *J Proteome Res* 17:337–347. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00595>
 79. Bahado-Singh RO, Sonek J, McKenna D, Cool D, Aydas B, Turkoglu O, Bjorndahl T, Mandal R, Wishart D, Friedman P, Graham SF, Yilmaz A (2019) Artificial intelligence and amniotic fluid multiomics: prediction of perinatal outcome in asymptomatic women with short cervix. *Ultrasound Obstet Gynecol* 54:110–118. <https://doi.org/10.1002/uog.20168>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Chiara Panicucci¹  · Eray Sahin² · Martina Bartolucci³ · Sara Casalini¹ · Noemi Brolatti¹ · Marina Pedemonte⁴ · Serena Baratto¹ · Sara Pintus¹ · Elisa Principi¹ · Adele D'Amico⁵ · Marika Pane⁶ · Marina Sframeli⁷ · Sonia Messina⁷ · Emilio Albamonte⁸ · Valeria A. Sansone⁸ · Eugenio Mercuri⁶ · Enrico Bertini⁵ · Ugur Sezerman⁹ · Andrea Petretto³ · Claudio Bruno^{1,10} 

✉ Claudio Bruno
claudiobruno@gaslini.org

¹ Center of Translational and Experimental Myology, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Via G. Gaslini, 5, I-16147 Genova, Italy

² Department of Biostatistics and Bioinformatics, Institute of Health Sciences, Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University, Istanbul, Turkey

³ Core Facilities-Clinical Proteomics and Metabolomics, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

⁴ Pediatric Neurology Unit, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

⁵ Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy

⁶ Centro Clinico Nemo, IRCCS Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy

⁷ Department of Neurosciences, University of Messina, Messina, Italy

⁸ Neurorehabilitation Unit, Centro Clinico NeMO, University of Milan, Milan, Italy

⁹ Department of Biostatistics and Medical Informatics, School of Medicine, Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University, Istanbul, Turkey

¹⁰ Department of Neuroscience, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health- DINOGLI, University of Genova, Genova, Italy