

Epigenetica dei disturbi dello spettro autistico: un'analisi multi-livello che combina firma epigenetica, accelerazione dell'età, deriva epigenetica e epivariations rare utilizzando set di dati disponibili pubblicamente.

Cavagnola Rebecca¹, Brondino Natascia¹, Calzari Luciano², Sacco Davide¹, Ranucci Francesco¹, Gentilini Davide^{1,2}

1 – Department of Brain and Behavioral Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy.

2 – Bioinformatics and Statistical Genomics Unit, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy.

Introduzione

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) è una condizione del neurosviluppo complessa caratterizzata da difficoltà nella comunicazione e nell'interazione sociale, comportamenti e interessi ristretti e una sensibilità alterata. L'interesse per l'ASD è cresciuto negli ultimi dieci anni in risposta ad un aumento significativo della sua prevalenza. Nonostante l'ereditabilità dell'ASD e l'identificazione di numerosi geni coinvolti, il ruolo clinico preciso di questi geni deve ancora essere definito. Inoltre, fattori ambientali che influenzano sia la madre che il bambino potrebbero svolgere un ruolo significativo nel determinare il corso del neurosviluppo. L'epigenetica rappresenta un campo ancora poco esplorato nell'ASD, ma con il potenziale per massimizzare la nostra conoscenza. In generale, l'epigenetica si riferisce ai "cambiamenti ereditabili nell'espressione genica senza modificare la sequenza del DNA sottostante" [1]. Finora, la ricerca sull'epigenetica nell'ASD si è concentrata principalmente sulle differenze tra gruppi di pazienti e controlli, trascurando altri aspetti come l'accelerazione dell'età epigenetica, la deriva epigenetica e le variazioni epigenetiche rare che coinvolgono interi loci genomici. Inoltre gli studi presenti in letteratura, spesso con potenza statistica limitata, hanno prodotto risultati incongruenti.

Obiettivi

L'obiettivo dello studio è stato condurre un'analisi più approfondita del ruolo dell'epigenetica nell'ASD, utilizzando dati grezzi genomici provenienti da datasets pubblici. Ciò ha permesso di adottare un originale approccio multilivello che ha coinvolto: i) un'analisi epigenetica del genoma su larga scala (EWAS) considerando tutti i datasets disponibili pubblicamente ed una meta-analisi dei risultati, ii) una analisi a livello di caratteristiche epigenetiche mai esplorate precedentemente come come l'invecchiamento biologico, la deriva epigenetica e le variazioni epigenetiche rare.

Metodi

I dataset sono stati identificati cercando il termine "autismo" nel repository Gene Expression Omnibus (GEO) e nella piattaforma EWAS Data Hub. Per essere inclusi, gli studi dovevano essere studi caso-controllo che riportavano dati utilizzando le piattaforme Illumina Methylation450 o MethylationEPIC, su campioni di sangue o tessuti cerebrali. Abbiamo incluso solo studi con una dimensione del campione superiore a 20. 6 studi sono stati considerati idonei e inclusi nelle analisi [2-6]. L'analisi è stata condotta su un totale di 164 casi di ASD e 102 controlli considerando campioni di sangue e su un totale di 49 casi di ASD e 50 controlli considerando tessuti cerebrali.

Il pacchetto RnBeads è stato utilizzato per analizzare i dati di metilazione del DNA, inclusa la verifica del controllo di qualità. Algoritmi di deconvoluzione sono stati applicati per inferire la composizione cellulare e l'età epigenetica. L'effetto del batch è stato identificato e corretto con il metodo ComBat. Le analisi di metilazione differenziale sono state condotte sia a livello di sito che di regione genomica. Sono state considerate covariate come l'età, l'effetto del batch e la presenza di mutazioni genetiche. È stata eseguita una meta-analisi per combinare i risultati delle analisi di metilazione differenziale. Sono state inoltre identificate le mutazioni epigenetiche stocastiche (SEMs) e sono state condotte analisi di epivariation come descritto da Gentilini et al [8]. Le epivariation sono state identificate come regioni arricchite di SEMs.

Risultati

La meta-analisi dei risultati della metilazione differenziale ha mostrato un numero maggiore di regioni metilate in modo diverso nei casi rispetto ai controlli nel sangue. Sono state identificate associazioni significative tra la firma epigenetica dell'ASD e diversi composti chimici, tra cui acido valproico e bisfenolo A. La meta-analisi ha mostrato un aumento significativo della deriva epigenetica nei soggetti con ASD. In particolare, il carico di SEM è risultato un fattore di rischio

aumentato sia nel sangue che nel cervello. Considerando il sangue, l'OR per i SEM è stato di 1,68 (CI = 1,07-2,64). Risultati simili sono emersi anche dal tessuto cerebrale, dove l'OR per i SEM è stato di 2,39 (CI = 1,31-4,37). L'analisi delle epivariation ha identificato delle variazioni rare presenti solo nei malati. Alcuni geni sono risultati completamente downregolati tra questi, 9 geni (CCDC169-SOHLH2, FDFT1, C6orf48, WNK4, AKAP12, PLD6, CCDC169, FAR2, LINGO3) presenti in entrambi i tessuti. Non sono state osservate differenze significative nell'accelerazione dell'età epigenetica né nella previsione di mortalità tra casi e controlli.

Conclusioni

Il nostro studio fornisce preziosi spunti sul ruolo dell'epigenetica nel ASD. Abbiamo individuato una firma epigenetica associata all'ASD in campioni di sangue, suggerendo il suo potenziale utilizzo come strumento diagnostico e mettendo in evidenza l'importanza di considerare fattori ambientali, come i composti chimici, nella patogenesi dell'ASD. Abbiamo osservato un aumento significativo della deriva epigenetica nei soggetti con ASD, sia nei tessuti sanguigni che cerebrali. Questa scoperta fornisce una possibile spiegazione per l'alterata microanatomia dei tessuti cerebrali e le disfunzioni cellulari e molecolari nell'ASD. Abbiamo identificato un insieme di epivariation associate all'ASD, scoprendo potenziali geni candidati con funzioni legate allo sviluppo neuronale. Tra questi geni, NPY si distingue come un promettente bersaglio terapeutico a causa del suo coinvolgimento nella regolazione dei comportamenti emotivi e legati all'ansia. Il nostro studio illumina il complesso paesaggio epigenetico dell'ASD e evidenzia nuove vie per ulteriori ricerche e interventi terapeutici

Bibliography

- [1] Schiele, M.A.; Domschke, K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. *Genes Brain Behav.*, 2018, 17(3)e12423
- [2] Homs, A.; Codina-Solà, M.; Rodríguez-Santiago, B.; et al. Genetic and epigenetic methylation defects and implication of the ERMN gene in autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry*, 2016, 6(7)e855
- [3] Kimura, R.; Nakata, M.; Funabiki, Y.; et al. An epigenetic biomarker for adult high functioning autism spectrum disorder. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1), 13662.
- [4] Siu, M.T.; Butcher, D.T.; Turinsky, A.L.; et al. Functional DNA methylation signatures for autism spectrum disorder genomic risk loci: 16p11.2 deletions and CHD8 variants. *Clin. Epigenetics*, 2019, 11(1), 103.
- [5] Ladd-Acosta, C.; Hansen, K.D.; Briem, E.; et al. Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Mol. Psychiatry*, 2014, 19(8), 862-871.
- [6] Corley, M.J.; Vargas-Maya, N.; Pang, A.P.S.; et al. Epigenetic delay in the neurodevelopmental trajectory of DNA methylation states in autism spectrum disorders. *Front. Genet.*, 2019, 10, 907.
- [7] Nardone, S.; Sharan Sams, D.; Reuveni, E. et al. DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Transl. Psychiatry*, 2014, 4(9), e433.
- [8] Gentilini, D., Somigliana, E., Pagliardini, L. et al. Multifactorial analysis of the stochastic epigenetic variability in cord blood confirmed an impact of common behavioral and environmental factors but not of in vitro conception. *Clin Epigenet* 10, 77 (2018).