

L'identificazione delle reti genetiche rivela associazioni complesse e traiettoria di rischio che collega il lieve deterioramento cognitivo alla malattia di Alzheimer

Identification of Genetic Networks Reveals Complex Associations and Risk Trajectory Linking Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease

Negli ultimi decenni, sono stati compiuti diversi sforzi di ricerca per analizzare il complesso scenario alla base della neurodegenerazione, con una particolare attenzione al decadimento cognitivo lieve (MCI) e al Morbo di Alzheimer (AD). In particolare, l'MCI amnesico (aMCI) è lo stadio prodromico dell'AD ed è caratterizzato dal deficit di memoria, spesso associati al deterioramento di altre abilità cognitive, e con attività abbastanza intatte del vivere quotidiano. I pazienti con aMCI hanno un rischio elevato di rapida progressione verso l'AD, mentre i pazienti affetti da MCI non amnesico (naMCI) possono progredire verso altre forme di demenza come la demenza frontotemporale o la demenza a corpi di Lewy. Le caratteristiche strutturali/patologiche cerebrali dell'AD sono la perdita di neuroni nell'ippocampo e nella neocorteccia/corteccia entorinale e l'atrofia della corteccia temporale e della corteccia parietale. Ulteriori segni distintivi neuropatologici dell'AD sono la presenza di β -amiloide extracellulare (A β) placche e grovigli neurofibrillari intracellulari (NFT) derivante dalla deregolamentazione della proteina precursore dell'amiloide (APP) e dall'aumento della proteina Tau fosforilata (P-Tau). MCI e AD sono preceduti da una lunga fase asintomatica, preclinica, che può iniziare fino a 20 anni prima della comparsa dei primi sintomi, con il verificarsi di cambiamenti cerebrali, disfunzione sinaptica, perdita di sinapsi e accumulo di amiloide. Per molti anni, la cosiddetta "ipotesi amiloide" ha fornito una visione dell'AD come modello lineare di malattia incentrato sui neuroni dalla deposizione di A β e seguita da una cascata di eventi anomali che, alla fine, hanno portato alla progressiva neurodegenerazione. Anche se questo modello ha rappresentato una tappa importante per indagare su potenziali caratteristiche diagnostiche e bersagli farmacologici per l'AD, gli ampi progressi nel campo della biomedicina mettono in discussione la linearità dell'"ipotesi amiloide" come il principale meccanismo eziologico della malattia. È quasi evidente che l'"ipotesi dell'amiloide" incentrata sui neuroni è probabilmente giusta solo in parte con una etiopatogenesi più complessa che include diversi tipi di cellule che interagiscono tra loro, diversi determinanti genetici e diversi percorsi biologici che influenzano sia l'invecchiamento che condizioni neurodegenerative. Sebbene l'allele epsilon 4 di APOE (Apolipoproteina E) rappresenta la principale variante di rischio per AD sporadico, Genome-Wide Association Studies (GWAS) hanno identificato diverse varianti genetiche che conferiscono un piccolo ma significativo rischio di sviluppare AD e MCI. Queste varianti sono state localizzate in prossimità di diversi geni, tra cui SORL1 (Sortilin Related Receptor 1), BIN1 (Bridging Integrator 1), CR1 (Complement C3b/C4b Receptor 1-Knops Blood Group), CLU (clusterina), PICALM (fosfatidilinositolo legante clatrina Assembly Protein), ABCA7 (ATP Binding Cassette Sottofamiglia A Membro 7), cluster MS4A (Membrane Spanning 4-Domains A10), TOMM40 (traslocasi della membrana mitocondriale esterna 40), TREM2 (recettore attivatore espresso su cellule mieloidi 2), ADAM10 (ADAM Metallopeptidase Domain 10) e molti altri. Ad oggi, diversi fenomeni biologici (trasporto e metabolismo dei lipidi, intracellulare traffico vescicolare, risposta immuno-infiammatoria, apoptosi, insufficienza sinaptica, stress ossidativo, metabolismo del calcio, ferro omeostasi, disfunzione mitocondriale) sono stati proposti come meccanismi guida di AD e MCI. Tuttavia,

come il background genetico o architettura genomica, i meccanismi biologici diversi dall'A β , la patologia a cascata o Tau possano determinare il rischio e lo sviluppo della malattia negli individui sono ancora in discussione. Il presente studio ha inteso indagare l'associazione di varianti localizzate all'interno di geni e di miRNA che potrebbe migliorare le conoscenze dei fattori genetici che contribuiscono alla suscettibilità e alla fisiopatologia di aMCI e AD.

RISULTATI

Valutazione e associazione APOE

Analisi

L'analisi di valutazione degli alleli APOE (ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3 o ϵ 4), ha rivelato la presenza di diverse distribuzioni di frequenza tra casi sporadici di AD, aMCI e soggetti di controllo. Come previsto, ϵ 1 non è stato trovato in tutte le coorti. Nei pazienti con AD, sono stati evidenziati gli alleli APOE le seguenti distribuzioni di frequenza ϵ 2: 1,5%, ϵ 3: 75,5%, ϵ 4: 23%, mentre nei casi aMCI, le frequenze degli alleli APOE (ϵ 2: 6,4%, ϵ 3: 80.1%, ϵ 4: 13.5%) erano simili a quelle dei controlli (ϵ 2: 8%, ϵ 3: 78%, ϵ 4: 14%). A supporto di questi risultati, il modello di classificazione eseguita dal pacchetto r:vcd ha rivelato che il genotipo APOE- ϵ 4 è stato in grado di discriminare in modo significativo i casi di AD dai controlli ($p = 6,00 \times 10^{-4}$), ma non è stato in grado di distinguere i casi di aMCI da controlli ($p = 0,64$).

Analisi delle associazioni statistiche

L'analisi dell'associazione statistica ha riportato 21 SNP e 13 SNP associati rispettivamente con aMCI e AD sporadico. Tabelle 2, 3 riportare i risultati dell'associazione degli SNP, che hanno superato il p e q soglie e sono stati quindi presi in considerazione per ulteriori analisi.

In particolare, l'analisi di associazione ha rivelato una serie di varianti condiviso tra aMCI e AD (Figura 1A), che ha visualizzato OR leggermente superiori nella coorte AD rispetto al gruppo aMCI (Figura 1B). Questo dato è risultato essere statisticamente significativo ($p < 1,00 \times 10^{-3}$) secondo la proporzione di un campione test, suggerendo che i pazienti con aMCI portatori di queste varianti condivise potrebbe essere più suscettibile a sviluppare l'AD.

Le varianti associate con AD e aMCI sembravano essere distribuite in diversi loci cromosomici. Dato questo risultato, abbiamo valutato i modelli LD per gli SNP situati sullo stesso cromosoma per cercare diversi modelli LD tra casi e campioni di controllo, che possono influenzare la suscettibilità a AD e aMCI. L'analisi LD non ha riportato alcuna differenza significativa tra i modelli LD osservati nei casi e nel controllo soggetti, nel senso che rappresentano un'associazione indipendente segnali per il rischio AD e aMCI.

Sono stati inoltre testati diversi approcci di apprendimento automatico al fine di trovare quello più adatto in grado di identificare rilevanti predittori di rischio aMCI e AD, considerando gli associati SNP, genotipo APOE e caratteristiche del paziente come candidato variabili. Per i casi aMCI, il modello più appropriato è risultato essere il "foresta casuale" su 65 modelli testati. Le variabili evidenziate con tale modello sono rs2910164 (MIR146A, MicroRNA 146a), rs9891119 (STAT3, Trasduttore Di Segnale E Attivatore Di Trascrizione 3), rs3745453 (ZSWIM4, tipo SWIM Zinc Finger contenente 4), rs1800795 (IL6, Interleuchina 6), rs11614913 (MIR196A2, MicroRNA 196a2), rs1077667 (TNFSF14, membro della superfamiglia TNF 14), rs10466829 (CLECL1, lectina di tipo C simile a 1), rs35349669 (INPP5D, inositolo Polifosfato-5-fosfatasi D), rs2300747 (CD58, CD58 molecola), rs6897932 (IL7R, recettore dell'interleuchina 7), rs1250550 (ZMIZ1, tipo MIZ Zinc Finger contenente 1), rs3746444 (MIR499A, MicroRNA 499a) e sesso maschile, e sono risultate essere i più rilevanti predittori

di rischio aMCI, con un punteggio > 60. La valutazione dei parametri di qualità ha rivelato che questo modello ha mostrato un AUC = 0,71, con uno 0,74 di sensibilità e 0,68 di specificità. Per quanto riguarda i casi di AD, il modello bayesiano lineare generalizzato si è rivelato il più performante modello per valutare le variabili più predittive per il rischio di AD su 52 modelli testati. In particolare, rs1800795 (IL6), rs62182086 (PNKD, dominio PNKD metallo-beta-lattamasi contenente), rs11218343 (SORL1), rs3745453 (ZSWIM4), rs1491942 (LRRK2, Leucina Rich Repeat Kinase 2) e il sesso femminile sono stati identificati come le variabili più significative per la previsione del rischio di AD. Come parametri di qualità, un AUC = 0,74, una sensibilità = 0,80 e a specificità = 0,69 sono stati riportati per questo modello.

Analisi bioinformatica

L'analisi associativa mette in evidenza i geni in comune associati con aMCI e AD, coerenti con l'esistenza di un nesso tra queste due condizioni. La malattia e funzione ha permesso di raggruppare i geni in specifici percorsi e visualizzarli nel contesto del cellulare pleiotropico e delle funzioni molecolari da un lato, e di quelle neurologiche dall'altro. Di conseguenza, i geni associati a aMCI erano principalmente implicati nella regolazione delle vie biologiche pleiotropiche che influenzano il mantenimento di l'omeostasi cellulare e la risposta all'invecchiamento ed esogeno stress, sebbene fossero anche collegati a neuroinfiammazione, meccanismi di conduzione del neurone, disturbi cerebrali e progressivi disturbi neurologici. Per quanto riguarda i geni associati all'AD, erano associati a funzioni cellulari/molecolari e condizioni patologiche più specifiche dell'area neurologica. In effetti, l'associazione specifica con le malattie è mediata da neurodegenerazione (es. malattia di Alzheimer, movimento disturbi, atassia, disturbi dei gangli della base) e funzioni coinvolti nella neuroinfiammazione, morte neuronale, errori di conduzione e sono state segnalate disfunzioni mitocondriali. Geni coinvolti nell'omeostasi cellulare sono stati riportati anche nell'AD, anche se in misura minore rispetto a aMCI. Questi risultati suggeriscono un ruolo differenziale dei geni associati in determinare la suscettibilità alle condizioni aMCI e AD. Inoltre, l'analisi bioinformatica ha permesso di identificare un insieme di geni associati a MCI come regolatori a valle di miR155 ($p = 1,76 \times 10^{-5}$) e PPARG ($p = 1,36 \times 10^{-4}$). Per quanto riguarda i geni associati all'AD, per alcuni di questi è stato dimostrato che ricadono all'interno di APP ($p = 9,04 \times 10^{-4}$) e Asso2 ($p = 2,00 \times 10^{-4}$).

DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo dimostrato che l'aMCI e l'AD sporadico sono condizioni multifattoriali risultanti da un crosstalk complesso tra molteplici processi molecolari e biologici, la cui perturbazione, unitamente all'interruzione dei meccanismi di compenso che assicurano l'omeostasi cerebrale, possono portare a malattie croniche e a neurodegenerazione progressiva. In effetti, il presente lavoro ha evidenziato spunti interessanti sui fattori di rischio associati a questi condizioni. In particolare, l'identificazione di varianti condivise (rs10466829, CLECL1; rs1800795, IL6; rs3734050, FAT2; rs62182086, PNKD; RS11218343, SORL1; rs729022, SYT11; rs3745453, ZSWIM4) supporta l'esistenza di "geni ponte" che collegano entrambe le condizioni. In effetti, le varianti di rischio hanno mostrato OR leggermente più elevati in Pazienti AD rispetto ai soggetti aMCI. Questo risultato suggerisce che queste varianti potrebbero essere predittive di un rischio più elevato di progredire verso l'AD e sostenere l'esistenza di una linea di rischio che collega aMCI ad AD, sebbene è probabile che contribuiscano ulteriori varianti. Nel complesso, l'identificazione di varianti condivise suggerisce il loro potenziale utilizzo per lo screening di pazienti con aMCI a

rischio più elevato di sviluppare l'AD che potrebbero aver bisogno di cure cliniche personalizzate o trattamenti successivi.

L'uso di approcci di apprendimento automatico ha permesso di testare la capacità delle varianti associate nel discriminare i casi da controlli mediante l'uso di modelli di regressione affidabili. Questi risultati supportano la necessità di esplorare ulteriormente le varianti associate al fine di identificare i determinanti genetici che modellano la suscettibilità per aMCI e AD sporadico e, quindi, può essere impiegato per stratificare i pazienti a più alto rischio di malattia, che possono beneficiare di diagnosi e cure precoci o diverse programmi di follow-up. A questo proposito, l'identificazione del sesso come variabile predittiva della suscettibilità differenziale alla malattia ha evidenziato l'importanza di sviluppare approcci specifici per il trattamento precoce e il monitoraggio delle condizioni di aMCI e AD, tenendo conto della diversa prevalenza della malattia e dei fattori ambientali tra pazienti maschi e femmine.

Tra le varianti associate, è interessante citare il rs3745198 (PLD3), rs62182086 (PNKD), rs3734050 (FAT2, FAT Agraphical Cadherin 2), che sono riportati come espressione significativa Loci quantitativi (eQTL) nei gangli della base e in corteccia sul portale Gtex1. Entrambe le regioni del cervello sono note per essere colpite da processi neurodegenerativi e i suddetti geni sono stati associati con disturbi neurologici mediati da meccanismi degenerativi, incluso LOAD (PLD3), atassia spinocerebellare (FAT2, PLD3), discinesia parossistica non chinesigenica (PNKD). In effetti, queste varianti potrebbero essere ulteriormente esplorate come potenziali biomarcatori associati a una maggiore predisposizione allo sviluppo di disturbi neurodegenerativi, in combinazione con altri fattori. Inoltre, uno sguardo più da vicino ai geni che ospitano le varianti associate con aMCI e AD sporadico in questo studio ha rivelato interessanti spunti riguardanti il complesso molecolare e i processi biologici coinvolti nella fisiopatologia dell'aMCI e d.C. La maggior parte dei geni associati all'aMCI erano correlati a molti meccanismi regolatori coinvolti nella neuroinfiammazione, nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nella risposta allo stress. Tali meccanismi sono generalmente mediati dalle cellule del cervello (cioè microglia, astrociti, oligodendrociti, endoteliali), sebbene le cellule immunitarie di derivazione periferica (cioè monociti, macrofagi e cellule dendritiche) sono stati anche proposte come partecipanti ai processi infiammatori neuroimmuni che, infine, contribuiscono alla neurodegenerazione. L'analisi a monte ha evidenziato l'attenzione verso l'interazione tra geni associati aMCI e miRNA e miR-155 e PPARG nella trasduzione del segnale.

Inoltre, il presente studio ha evidenziato un'interazione tra la via di segnalazione miR-146 e miR-155, che è in linea con altri studi che mostrano la loro collaborazione nella modulazione del profilo infiammatorio microgliale e supportandoli come bersagli terapeutici per il ripristino della microglia attività in molteplici malattie neurodegenerative. In questo scenario, è importante includere anche miR499a e miR-196a2, che sono stati associati con aMCI in questo studio e con altri disturbi complessi.

Inoltre, alcuni dei geni e dei miRNA che trasportano le varianti associate all'aMCI sono state arricchite nell'omeostasi del ferro (IL6, STAT3, MAPK1, SORL1 e CYP24A1), nelle funzioni vascolari e nella proliferazione delle cellule endoteliali (IL6, STAT3, MAPK1, SEMA5A, ZMIZ1, miR-499a e miR146a) (Figura 3). Questi risultati hanno suggerito il ruolo potenziale di questi geni nella neuroinfiammazione e negli eventi correlati alla neurodegenerazione mediati dall'alterazione del ferro o dalla disfunzione vascolare, che sono stati associati con la funzione cognitiva e con AD. Anzi, entrambi di essi rappresentano due degli approcci terapeutici più promettenti per lo sviluppo di interventi terapeutici multi-target in grado di modificare o monitorare la progressione della malattia. In questa prospettiva, il presente studio suggerisce

il loro potenziale terapeutico e incoraggia studi funzionali volti ad esplorare il possibile contributo dei geni sopra identificati per lo sviluppo di approcci di trattamento multi-target per MCI.

Per quanto riguarda i geni associati all'AD, è stato dimostrato che sono per lo più arricchiti in condizioni e funzioni di malattie neurologiche. L'analisi a monte ha rivelato interazioni tra un insieme di geni associati (APOE, LRRK2, CLU, SORL1, PLD3, IL23R, PNKD) e le vie di segnalazione APP e ACE2. Entrambi sono stati ampiamente studiati nel contesto della patologia complessa dell'AD e della neurodegenerazione e come potenziali bersagli per scopi terapeutici. A questo proposito, l'identificazione dei geni regolati a valle ampliano la conoscenza di questi due percorsi, fornendo nuovi obiettivi terapeutici per la ricerca di farmaci efficaci multi-target per AD.

Nel complesso, questo studio ha evidenziato che la suscettibilità a La condizione aMCI può essere il risultato dell'interazione tra geni e miRNA coinvolti nella neuroinfiammazione, nella disfunzione sinaptica, nei disturbi di conduzione dei neuroni, nell'alterazione delle risposte immunitarie, nella funzione vascolare e nella disregolazione del ferro. In questo scenario, questi geni possono influenzare l'omeostasi sia di neuroni che di cellule non neuronali (cioè microglia, astrociti, cellule immunitarie cellule, cellule endoteliali), conferendo una maggiore suscettibilità a processi di invecchiamento, neuroinfiammatori e a eventi neurodegenerativi. Per quanto riguarda la suscettibilità AD, i geni associati e le loro interazioni a loro correlate confermano che la patogenesi di tale malattia è complessa ed eterogenea composta da molteplici caratteristiche genetiche, percorsi biologici, componenti cellulari e molecolari che alla fine alterano l'omeostasi e le funzioni cerebrali. L'identificazione di varianti di rischio condivise sia con aMCI che con AD, dovrebbero essere ulteriormente esplorata al fine di sviluppare approcci personalizzati in relazione al profilo di rischio individuale e allo stadio della malattia dei pazienti.