

Tesi di Laurea: “Ruolo delle varianti nel numero di copie nel *Disturbo dello Spettro Autistico*” (Sintesi)

Autore: C. Micolonghi

Relatore: A. Pizzuti

Abstract

Introduzione. Il disturbo dello spettro autistico (ASD) rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini del neurosviluppo dal punto di vista clinico ed eziologico. Finora sono stati identificati circa 100 geni che convergono su specifici *pathway* molecolari.

Obiettivo studio. Le Varianti nel Numero di Copie (CNV) rappresentano la causa genetica dell'autismo in circa il 10-15% dei pazienti. Sebbene vi sia un accordo quasi universale sul fatto che l'ASD sia una condizione complessa, in cui concorrono molteplici fattori genetici e ambientali, è ancora discusso il ruolo delle varianti genetiche comuni e rare nella patogenesi dell'ASD. Questo studio ci ha permesso di identificare diverse CNV, che sono state studiate per andare ad analizzare il loro ruolo nel fenotipo del paziente, soffermandoci sulla possibile correlazione tra CNV ereditate e familiarità, differenziazione delle capacità linguistiche nei due sessi e il ruolo dei geni coinvolti in tali varianti.

Materiali e Metodi. Per rilevare la presenza di CNV abbiamo condotto un'analisi di ibridazione genomica comparativa *array* (*array*-CGH) e un'analisi di ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP-*array*) in 120 bambini con fenotipo ASD diagnosticato con l'*Autism Diagnostic Observation Schedule-Second Edition* (ADOS-2) e l'*Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R).

Risultati. Le analisi hanno documentato la presenza di 58 pazienti con CNV, di cui 14 pazienti con varianti associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo (2 de novo e 12 ereditate) e 44 pazienti con CNV ad incerto significato, mentre 62 casi presentavano un *array* privo di CNV. La ricerca

di una correlazione tra la CNV ereditata e la familiarità per patologie neuropsichiatriche è risultata non statisticamente significativa, ma ciò potrebbe essere spiegato dalla variazione della manifestazione fenotipica di un allele in una data popolazione (OR=0.77, IC 95%=0.38-1.56 $P_{value}=0.58$). La categorizzazione e descrizione clinica in base alle capacità linguistiche nei due sessi ci ha permesso di osservare come il rapporto maschi/femmine sia spostato verso una maggiore averbaltà nel sesso maschile, ciò a sostegno della teoria del ruolo protettivo femminile nei confronti di varianti patogene (OR=2.4, IC 95%=0.93-6.09 $P_{value}=0.09$). L'analisi dei geni coinvolti nella variante ci ha permesso di osservare che i geni che codificano per proteine neuronali e citoscheletriche sono più spesso coinvolti nei casi associati ad alto funzionamento (OR=17.5, IC 95%=2.17-210.2 $P_{value}=0.006$; OR=7.0, IC 95%=1.37-39 $P_{value}=0.04$). Non risulta chiaro invece se i geni per Non-Coding RNA siano associati a un funzionamento cognitivo più basso rispetto alla popolazione ASD generale (OR=0.88, IC 95%=0.07-6.65 $P_{value}>0.99$).

Conclusioni. Premesso che la frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente all'interno di una popolazione varia, poiché la penetranza di queste varianti dipende sia dal genotipo che dall'influenza dell'ambiente, la relazione delle CNV con le diverse informazioni raccolte ci porta a riconoscere il loro ruolo fondamentale ma non del tutto chiaro. Nella varietà dei fenotipi dell'ASD concorrono più fattori: varianti comuni e/o rare, la capacità di buffering del background genetico sulle mutazioni più deleterie, la penetranza delle varianti, il sesso del probando, i geni compresi nelle varianti e i fattori ambientali. Alla luce di tutto ciò l'autismo non va considerato come una singola entità, ma come un continuum della diversità umana.

Introduzione

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini del neurosviluppo dal punto di vista clinico ed eziologico.

Fu inizialmente descritto intorno al 1940 quasi simultaneamente in America dallo psichiatra Kanner e in Austria da Asperger. Da allora sono stati fatti notevoli sforzi da parte della comunità scientifica per comprendere la genetica dell'autismo, che però rappresenta ancora una delle sfide più importanti della ricerca. L'autismo non si adatta esattamente ai modelli di ereditarietà noti e, sebbene questo potrebbe essere solo il risultato dell'eterogeneità eziologica non ancora completamente conosciuta, molti dati indicano che bisognerà incorporare nuove conoscenze dalle Neuroscienze e dalla Genetica per comprendere appieno le basi fisiopatologiche dell'autismo. Finora sono state associate anomalie in centinaia di geni, che includono varianti sia rare che comuni. Questi geni convergono su specifici percorsi molecolari comuni, che guidano lo sviluppo delle caratteristiche principali dell'ASD. Diversi studi genetici sul disturbo dello spettro autistico hanno identificato questi geni come regolatori chiave della plasticità sinaptica. In effetti, molti dei geni *di rischio*, che sono stati collegati a questo disturbo, codificano per proteine di *scaffolding* sinaptico, recettori, molecole di adesione cellulare o proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina, trascrizione, proteine sintesi o degradazione, o dinamiche del citoscheletro. Cambiamenti in una qualsiasi di queste proteine possono aumentare o diminuire l'adesione neuronale, il numero di sinapsi e quindi la connettività neuronale nel cervello, causando una ridotta omeostasi sinaptica, andando ad aumentare il rischio di un individuo di sviluppare l'ASD^{1,2}.

I disturbi dello spettro autistico (dall'inglese *Autism Spectrum Disorders*, ASD) sono un insieme eterogeneo di disturbi del neurosviluppo caratterizzati da deficit

persistente nella comunicazione sociale e nell'interazione sociale in molteplici contesti e pattern di comportamenti, e interessi o attività ristretti e ripetitivi.

Con l'introduzione nella pratica clinica del Manuale diagnostico e statistico dei Disturbi Mentali edizione 5 (DSM-V), la dizione "Disturbi Autistici" è stata sostituita da "Disturbi dello Spettro Autistico" a sottolineare che l'autismo rappresenta uno "spettro" di patologie differenti tra di loro, non solo dal punto di vista eziologico ma anche dal punto di vista clinico e fenotipico. Andando a sottolineare la scelta di una classificazione di tipo dimensionale, senza una distinzione in sottotipi, con la riorganizzazione della triade sintomatologica in due domini^{1,3}.

Ereditarietà

La prevalenza del disturbo dello spettro autistico nel 2018 negli Stati Uniti si attestava su un valore di circa 1 individuo su 59, secondo il *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), con un rapporto 4:1 tra il genere maschile e il femminile. Sebbene le persone con ASD clinico e gli individui con tratti di tipo autistico differiscano l'uno dall'altro per gravità e/o grado di compromissione funzionale, studi sui gemelli hanno dimostrato che potrebbero condividere gli stessi geni di suscettibilità. L'influenza relativa dei fattori genetici, epigenetici e ambientali sul rischio di ASD rimane in discussione, ma tutti gli studi epidemiologici indicano che vi è un forte contributo genetico al rischio di ASD. Tutti gli studi sui gemelli condotti fino ad oggi sull'ASD dimostrano come i gemelli monozigoti (MZ) abbiano tassi di concordanza più elevati per l'ASD (che vanno dal 60% al 90%) rispetto ai gemelli dizigoti (DZ) (dallo 0% al 30%).

In sintesi, gli studi epidemiologici forniscono informazioni cruciali sul contributo genetico all'ASD. Tuttavia, non ci informano sui geni coinvolti o sul numero e

sulla frequenza delle loro varianti. Negli ultimi decenni c'è stata quella che viene definita da molti come una "epidemia di autismo" attribuibile principalmente a una maggiore consapevolezza sia da parte delle famiglie che dei professionisti, che ha portato all'identificazione di un maggior numero di casi^{1, 3, 4}.

La genetica molecolare dell'ASD

Una distinzione importante nella genetica dell'autismo è la differenza tra autismo "sindromico" e "non sindromico" (o idiopatico).

Nella maggior parte dei casi si tratta di forme idiopatiche (non sindromico) ossia forme multifattoriali dovute alla compartecipazione di cause genetiche ancora sconosciute e cause ambientali. Inoltre, molti dei geni che sembrano coinvolti nei casi di ASD non sindromico sono coinvolti anche nella disabilità intellettiva e nell'epilessia, a dimostrare che probabilmente appartengono a un continuum di disturbi del neurosviluppo che si manifestano in modi diversi. Le forme sindromiche invece sono condizioni associate alla presenza di una variante genetica responsabile di vere e proprie sindromi genetiche che, tra le varie manifestazioni cliniche, presentano anche il disturbo dello spettro autistico, come la sindrome dell'X fragile (*FMR1*), la sclerosi tuberosa (*TSC1*, *TSC2*) e la sindrome di Rett (*MECP2*).

Usando le tecniche standard di valutazione genetica, è possibile identificare una causa genetica nel 20-25% dei bambini con spettro autistico, per il restante 75-80% le cause rimangono sconosciute.

Le cause genetiche identificate dell'autismo possono essere classificate come anomalie cromosomiche citogeneticamente visibili (5%), varianti nel numero di copie (CNV) (cioè, delezioni submicroscopiche e/o duplicazioni) (10-20%), e disordini di un singolo gene (5%)^{1, 5}.

L'interazione tra varianti comuni e rare nell'ASD

Sebbene vi sia un accordo quasi universale sul fatto che il Disturbo dello Spettro Autistico sia una condizione complessa, in cui concorrono molteplici fattori genetici e ambientali, c'è meno accordo sull'importanza delle varianti genetiche comuni e rare nella responsabilità dell'ASD. Nel "*Multiple Hits Model*" l'autismo viene definito come il risultato di combinazioni di tre tipi principali di mutazioni: varianti rare de novo, varianti rare ereditate e varianti comuni:

- le varianti **rare**, ereditate o de novo, possono essere presenti in una persona con autismo ma anche nei parenti non affetti;
- le varianti **comuni** sono quelle presenti in più del 5% della popolazione. Ogni variante comune ha un lieve effetto biologico, che in combinazione, influisce sul rischio di autismo.

La diversità dell'autismo è il principale argomento a favore di questa ipotesi, dove infatti la stessa mutazione può portare a un diverso insieme di tratti in due persone. I dati epidemiologici e molecolari suggeriscono che il contributo genetico all'ASD può essere il risultato di una combinazione di rare varianti causali deleterie e una miriade di alleli a basso rischio (definiti anche come *background genetico*, costituito da *single nucleotide polymorphisms* comuni). L'interazione tra rare varianti causali e comuni alleli a basso rischio influenzerà quindi la **diversità fenotipica** osservata nella popolazione. A seconda della capacità degli alleli comuni a basso rischio di tamponare l'impatto di rare varianti deleterie, può essere prodotto un fenotipo molto diverso.

Ad esempio in un individuo con un *background genetico* con un alto carico di varianti di rischio comuni dell'ASD, anche solo una variante rara causerà ASD. Al contrario, un individuo con un basso

background genetico di varianti a rischio comuni, solo un alto carico di mutazioni rare deleterie causerà ASD. Quindi un *background* genetico con una forte capacità di tamponamento o *buffering* genetico, farà fronte all'effetto di rare variazioni genetiche canalizzando l'esito fenotipico. Al contrario, un *background* genetico con una bassa capacità di *buffering* genetico potrebbe rivelare l'effetto di mutazioni taciute nei genitori.

Possiamo illustrare tre situazioni estreme (Fig. 1)⁶.

- Nella prima situazione, un individuo ha un elevato *buffer* genetico e quindi è a basso rischio di ASD, anche se ha un carico relativamente alto di geni a rischio ASD deleteri rari. In questa situazione, solo una mutazione altamente penetrante che appare de novo nel probando potrebbe causare ASD. Questo modello potrebbe rappresentare il 10-25% dei casi di ASD, specialmente quelli con disabilità intellettiva.
- Nella seconda situazione, un individuo ha

un *background* genetico che funge da *buffer* genetico moderato per ASD. Di conseguenza, svilupperanno ASD quando ricevono solo un carico relativamente moderato di mutazioni rare. Questo modello potrebbe spiegare l'osservazione di più varianti rare in alcuni pazienti con ASD.

- Infine, nella terza situazione, l'individuo eredita un *background* genetico con un *buffer* genetico molto basso ed è quindi ad alto rischio di ASD. In questo caso, non è necessario un carico di rare mutazioni deleterie, infatti l'accumulo di un carico elevato di alleli a basso rischio sarà sufficiente a causare ASD. Questo modello potrebbe spiegare le famiglie in cui i genitori hanno tratti autistici subclinici⁶.

In sintesi, mutazioni comuni, rare e de novo possono tutte contribuire al rischio genetico di ASD ma nonostante ciò, resta dogma indiscusso la combinazione dei fattori ambientali e predisposizione genomica a sviluppare un fenotipo clinico ASD^{6,7,8}.

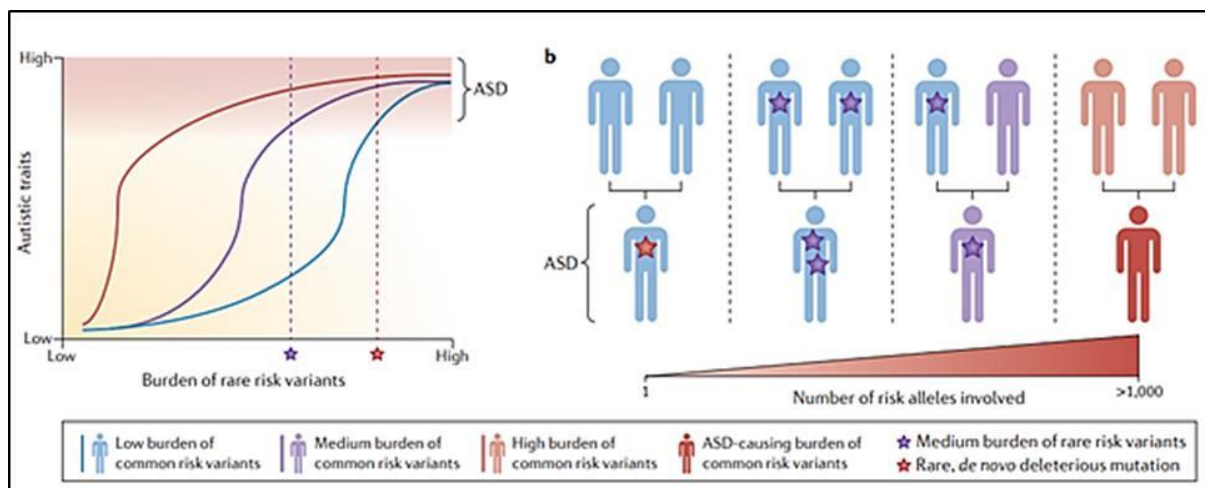


Fig. 1. Modelli diversi di sviluppo di ASD.

Test molecolari e consulenza genetica nel Disturbo dello Spettro Autistico

Prima della disponibilità della tecnologia di sequenziamento era possibile identificare alterazioni nella quantità e nella struttura dei cromosomi, definite come varianti strutturali microscopiche (dimensioni ~ 3 Mb o più). Più recentemente, nuove strategie e strumenti per l'analisi del genoma umano hanno rivelato variazioni del DNA (con dimensioni comprese tra ~ 1 kb e 3 Mb), coinvolgenti segmenti più piccoli rispetto a quelli identificati al microscopio ottico, ma più grandi di quelli rilevabili mediante sequenziamento. Queste tecnologie sono rappresentate da:

- ibridazione genomica comparativa su Microarray;
- ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide su Microarray.

Le varianti strutturali submicroscopiche, definite come CNV, sono segmenti di DNA più grandi di 1000bp (> 1kb), con un numero di copie variabile rispetto a un genoma di riferimento.

Numerose CNV (duplicazioni e delezioni) sono state descritte negli individui con ASD. Queste variano in dimensioni: da riarrangiamenti citogeneticamente visibili, a regioni con variazione del numero di copie (tipicamente > 1 kb) e regioni più piccole di inserzione e delezione (indel, tipicamente < 1 kb), ereditata o insorta de novo. Gli studi di array-CGH concordano in gran parte sull'evidenza di un maggior carico di riarrangiamenti de novo (sia delezioni che duplicazioni) nelle famiglie con ASD rispetto ai controlli sani, con la presenza di CNV da tre a cinque volte più alta. Inoltre, vi è un carico mutazionale maggiore per le CNV di grandi dimensioni tra i casi di ASD rispetto ai controlli non ASD. Queste varianti, inoltre, si sovrappongono a geni noti per disabilità intellettiva o a geni che sono espressi maggiormente a livello cerebrale, più

specificamente quelli che sono strutturalmente e/o funzionalmente correlati ai set di geni di regolazione della densità postsinaptica o del rimodellamento/trascrizione della cromatina. Le varianti più comunemente identificate associate all'ASD sono delezioni o duplicazioni nel locus 16p11.2, duplicazioni nei loci 15q11-13 e delezioni nel locus 22q11. Questi loci vengono regolarmente deleti o duplicati, probabilmente a causa di eventi di ricombinazione che si verificano nelle regioni genomiche introniche fatte di ripetizioni a bassa copia che fiancheggiano i siti di start/end delle CNV^{8,9,10}.

Interpretazione dei risultati dei test genetici

Una delle principali sfide dopo l'esecuzione dei test genetici è l'interpretazione dei risultati e, in particolare, la definizione di una probabile patogenicità delle varianti identificate. L'*American College of Medical Genetics and Genomics* e l'*Association for Molecular Pathology* hanno pubblicato linee guida congiunte per la classificazione delle varianti in *benigne*, *patogenetiche* e *incerto significato*¹⁰. Per classificare le varianti si tiene conto della frequenza delle varianti nella popolazione, della previsione computazionale in silico e dei risultati degli studi funzionali che considerano l'impatto della mutazione sulla struttura e sulla funzione cerebrale in vitro.

Nel complesso, l'interpretazione del significato clinico di una CNV identificata in un paziente autistico può essere impegnativa e insoddisfacente per la famiglia del paziente. Attualmente il ruolo dello specialista in Genetica è quello di discutere al meglio delle sue conoscenze le implicazioni dei risultati del array-CGH e di suggerire studi per ulteriori chiarimenti sui risultati^{7,8}.

Scopo dello studio

Il presente studio osservazionale si pone lo scopo di approfondire il ruolo delle CNV nel ASD.

Questo studio si è soffermato su:

- Correlazione tra la CNV ereditata, per segregazione materna o paterna, e la familiarità per patologie neuropsichiatriche raccolta in anamnesi. Studi dimostrano che se la CNV ereditata è potenzialmente patogena, la sua presenza in un genitore non-afetto può indicare una penetranza ridotta e un aumento del rischio per ASD nelle gravidanze future¹¹. È quindi molto importante effettuare un'accurata anamnesi familiare, con particolare attenzione alle caratteristiche comportamentali e alle altre condizioni neuropsichiatriche dei genitori del probando.
- Un altro punto in cui il nostro studio si è soffermato è la categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi (pazienti verbali/averbali). Il linguaggio espressivo, valutato mediante le scale di Griffiths, si è osservato essere compromesso nel 53% dei pazienti, definiti come *non verbali*, mentre il 47% presenta una compromissione del linguaggio espressivo di grado lieve e vengono definiti come *verbali*. Così come in letteratura, anche nel nostro studio si è osservata una maggiore capacità nelle femmine con autismo di attuare dei comportamenti di *mimetizzazione* rispetto ai maschi autistici, nonostante i simili dei loro tratti autistici. La *mimetizzazione*, è definita la strategia utilizzata per apparire “meno autistiche” nelle interazioni sociali, è considerata una caratteristica chiave del fenotipo femminile autistico. Diversi studi qualitativi hanno esplorato le esperienze di donne con diagnosi di autismo e questi hanno portato a resoconti ricchi e dettagliati del loro *camuffamento*, ma anche degli effetti deleteri che questa tecnica va a provocare sul soggetto. Infatti molte adolescenti hanno indicato che l'uso di queste strategie cognitivamente

impegnative ha provocato conseguenze psicologiche avverse¹².

- Ruolo dei geni coinvolti nelle CNVs e correlazione con il funzionamento cognitivo. Molti dei geni “di rischio”, che sono stati collegati all'ASD, codificano per proteine di *scaffolding* sinaptico, molecole di adesione cellulare o proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina, proteine del citoscheletro². È stato dimostrato che in pazienti con ASD portatori di mutazioni genetiche in **proteine neuronali**, il processo di omeostasi sinaptica potrebbe non essere in grado di contrastare gli effetti delle mutazioni sull'attività sinaptica, determinando un'attività neuronale troppo elevata o troppo bassa. L'anormale *sprouting* (o *pruning*) delle sinapsi a seguito di queste mutazioni potrebbe quindi portare a una anomala coordinazione e competizione tra le reti neuronali. Questo andrebbe a spiegare i problemi nell'integrazione delle informazioni attraverso diverse modalità sensoriali che si osservano negli individui con ASD⁶. Inoltre i neuroni dipendono dalle **proteine del citoscheletro**, come i microtubuli (MT), altamente dinamici per molti processi diversi durante lo sviluppo embrionale iniziale, tra cui la divisione e la migrazione cellulare, il traffico intracellulare e la trasduzione del segnale, nonché la corretta guida degli assoni e la formazione delle sinapsi. Il coordinamento e il supporto dei MT è cruciale affinché i neuroni appena formati migrino in modo appropriato al fine di stabilire connessioni neurali. Una volta stabilite le connessioni, i MT forniscono integrità strutturale e supporto per mantenere la connettività neurale durante lo sviluppo. Le anomalie nella migrazione neurale e nella connettività dovute a mutazioni genetiche delle proteine associate ai microtubuli possono portare a difetti di sviluppo dannosi. Prove crescenti suggeriscono che

queste mutazioni sono associate a molti diversi disturbi dello sviluppo neurologico, tra cui disabilità intellettive e disturbi dello spettro autistico¹³. Inoltre un gran numero di studi ha suggerito che gli **RNA non codificanti** (ncRNA) potrebbero essere nuovi promettenti bersagli per il trattamento dei disturbi dello sviluppo neurologico. Tuttavia i *pathway* regolatori, in cui sono coinvolti gli RNA non codificanti nei disturbi del neurosviluppo, sono molto complessi e i loro meccanismi molecolari sono ancora in gran parte sconosciuti. Molte sfide devono ancora essere intraprese prima che gli RNA non codificanti possano essere utilizzati di routine nelle indagini diagnostiche della pratica clinica¹⁴.

- Discussione, descrizione e analisi delle CNVs a suscettibilità riscontrate nel gruppo di pazienti selezionati.

Materiale e metodi

È stata condotta un'analisi di ibridazione genomica comparativa *array* (*array*-CGH) e/o un'analisi di ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP-array*) in 120 bambini con diagnosi di ASD effettuata tramite l'*Autism Diagnostic Observation Schedule-Second Edition* (ADOS-2) e l'*Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R). Il DNA estratto dai campioni ematici dei pazienti è stato analizzato tramite la piattaforma *SNP-array* (*Affymetrix Genome-Wide Human 6.0*; *Affymetrix*, Palo Alto, CA) secondo il protocollo fornito dal produttore. La piattaforma è costituita da circa 1.8 milioni di markers (906.600 SNPs e 946.000 sonde oligonucleotidiche), localizzati nel genoma ad una distanza mediana di 680 bp, con una risoluzione media effettiva di 75 Kb. I dati relativi a 270 controlli sani (*International HapMap Project*), sono stati usati come *reference*. L'analisi dei data è stata effettuata mediante il software *Chromosome Analysis Suite software* versione 4.0 (*Affymetrix*).

Sono state esaminate e interpretate clinicamente le indagini genetiche svolte su 120 pazienti tra i 2 e i 6 anni (età media di 3 anni e 4 mesi), valutando le possibili differenze significative derivate dal confronto tra le loro caratteristiche di età, sesso, funzionamento cognitivo (alto/basso funzionamento, QI/QS), severità dei sintomi, linguaggio (verbale e non-verbale), EEG, ruolo dei geni coinvolti nelle CNV e familiarità per patologie neuropsichiatriche. Ogni paziente è stato valutato presso la Neuropsichiatria Infantile del Policlinico Umberto I per un test per la valutazione del funzionamento cognitivo, mediante la somministrazione di test per quoziente intellettivo o quoziente di sviluppo come le Scale di *Griffiths* e le Scale di *Wechsler*.

Risultati e Discussione

Di questa coorte: 62 pazienti risultavano negativi all'*array*-CGH/*SNP-array*, mentre 58 pazienti presentavano un *array* positivo. Nei bambini con *array* positivo si sono riscontrate 44 duplicazioni e 20 delezioni, per un totale di 64 CNVs, 32 di origine materna, 25 di origine paterna, 4 de novo e 3 non valutabili per mancanza di dati (Fig. 2).

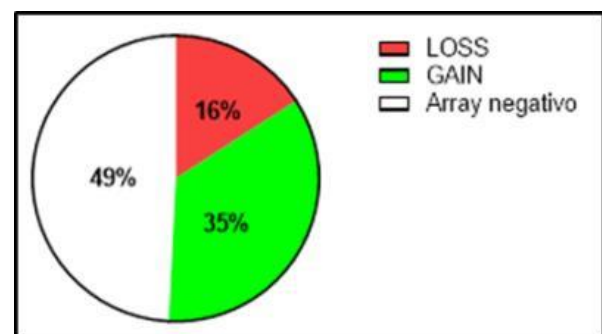


Fig. 2. Suddivisione dei pazienti.

Le 64 CNV riscontrate avevano una lunghezza media di circa 575 kb con un valore minimo e massimo compresi tra 36 kb e 16,6 Mb. I cromosomi che possedevano queste varianti erano tutti i cromosomi fatta eccezione per le coppie del 19, 20, 21 e il cromosoma Y. La maggiore frequenza di CNV si è riscontrata nei cromosomi X, 2 e 3. Dei

120 pazienti studiati 14 casi avevano CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo e 44 pazienti avevano CNVs associate ad un incerto significato.

Correlazione tra la concordanza della CNV ereditata e la familiarità per patologie neuropsichiatriche

All'interno di questo studio sono state valutate le segregazioni di origine materna o paterna delle varianti riscontrate. In particolare, mediante l'analisi statistica dei dati e le raccolte anamnestiche effettuate sui pazienti, si è ricercata una possibile correlazione tra la/e CNVs ereditate e la familiarità per patologie neuropsichiatriche. La familiarità per suddette patologie è stata presa in considerazione solo nel caso in cui vi fosse una concordanza col tipo di segregazione (linea materna/paterna). Tra i pazienti con varianti del numero di copie, l'analisi di segregazione ha mostrato una segregazione materna nel 50% dei casi (32 casi), paterna nel 39% dei casi (25 casi) e una origine de novo delle CNVs nel 6% dei casi (4 casi), con un 5% non valutabile per la mancanza di dati relativi ai genitori di alcuni pazienti (Fig. 3).

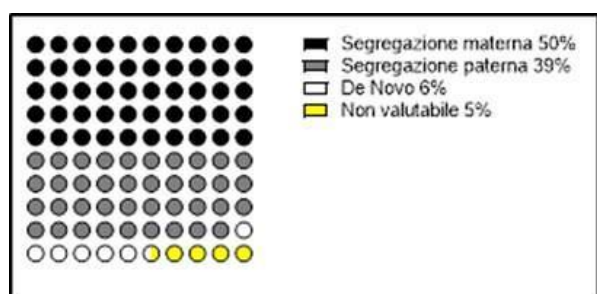


Fig. 3. Analisi di segregazione delle varianti.

Dei 120 pazienti in studio 61 presentavano familiarità per patologie neuropsichiatriche, contrariamente ai restanti 59. I probandi con familiarità positiva sono stati ulteriormente suddivisi in base al risultato dell'array in pazienti con **CNV ereditate con concordanza** tra la segregazione paterna/materna e la linea di familiarità, e **CNV non ereditate**, perché de

novo o per assenza di concordanza o per assenza di riscontro di varianti all'analisi genetica. I soggetti con positività all'array per varianti segregate ma senza familiarità sono risultati essere 25 mentre i negativi all'analisi e senza familiarità 34 (Tab. 1).

	CNV ereditate	CNV non ereditate
<i>Familiarità +</i>	22	39
<i>Familiarità -</i>	25	34

Tab. 1. Suddivisione delle CNV.

In base a questi dati non è stata riscontrata nei nostri pazienti una correlazione significativa tra la segregazione delle CNV e la familiarità. Infatti non si sono riscontrate differenze significative nei due gruppi, visto che all'interno del gruppo con familiarità positiva il 36% possedeva CNV ereditate mentre il 64% no, mentre nel gruppo con familiarità negativa rappresentavano rispettivamente il 42.4% contro il 57.6% (OR=0.77, IC 95%= 0.38-1.56 $P_{value}=0.58$) (Fig. 4).

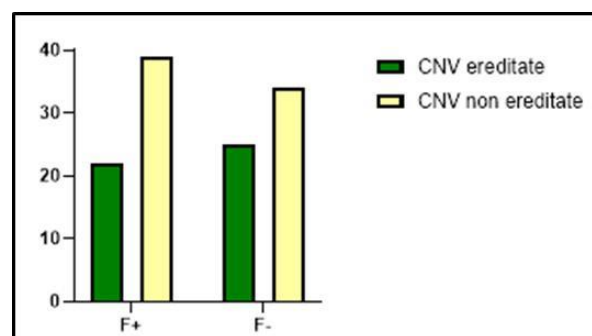


Fig. 4. Correlazione tra segregazione delle CNV e familiarità.

Categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi

In 120 bambini con diagnosi di ASD 99 sono maschi e 21 femmine, con un rapporto maschi/femmine di 5:1, in accordo con i dati di letteratura^{1, 2, 15}.

Tra i 99 maschi il 51% (51 casi) presentava un *array* negativo e il 49% (48 casi) un *array* positivo.

Tra le 21 femmine con diagnosi di ASD il 62% dei casi (13 casi) mostrava un *array* negativo, mentre il restante 48% (8 casi) un *array* positivo per CNV. Abbiamo riscontrato una distribuzione omogenea fra verbali e averbali nei pazienti maschi, a differenza delle femmine in cui le verbali risultano essere il doppio delle verbali (Tab. 2).

	Averbali	Verbali
Maschi	54	45
Femmine	7	14

Tab. 2. Distribuzione verbali e averbali in pazienti maschi e femmine.

Possiamo notare come il fenotipo averbale sia maggiormente presente nel sesso maschile, rappresentandone il 54,6%, rispetto a quello femminile in cui corrisponde al 33,3% (OR=2.4, IC 95%=0.93-6.09 $P_{value}=0.09$) (Fig. 5).

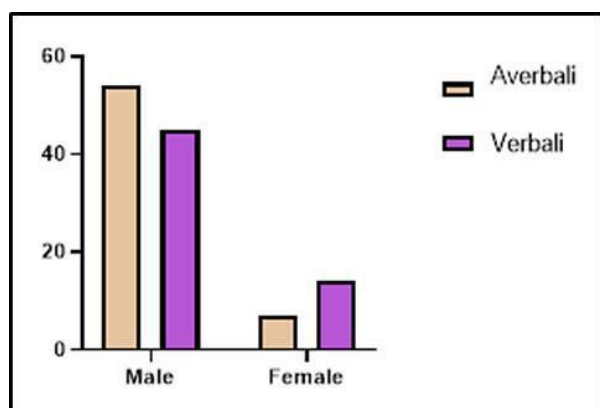


Fig. 5. Prevalenza del fenotipo averbale nei maschi.

Questo dato, se paragonato ai risultati presenti in letteratura fa risaltare la presunta capacità del sesso femminile di mitigare l'impatto fenotipico della variante genetica. Nel disturbo da spettro autistico vi è una forte prevalenza di pazienti di sesso maschile, ma nessun meccanismo sa ancora spiegare

definitivamente questa differenza. Recenti studi portano l'attenzione su ulteriori differenze nella presentazione fenotipica, inclusi un minor numero di comportamenti ripetitivi e problemi comportamentali nelle femmine¹². Gli studi dimostrano che le femmine sono protette dagli effetti delle varianti ereditate e/o de novo, suggeriscono un ruolo dei geni presenti sui cromosomi sessuali e/o degli ormoni sessuali, in particolare il testosterone. Infatti una possibile spiegazione potrebbe essere il cosiddetto "effetto protettivo femminile" per varianti genomiche patogene. A supporto di ciò un recente studio ha esaminato gli effetti dell'esposizione prenatale all'acido valproico nel cervello dei roditori¹⁶. Tale esposizione porta a comportamenti di tipo autistico con una maggiore prevalenza di manifestazioni negli animali maschi. Gli autori infatti hanno dimostrato che il tessuto cerebrale femminile ha una maggiore espressione di alcune varianti di splicing del gene BDNF rispetto a quello maschile. Ciò suggerisce che queste varianti di splicing conferiscano una migliore neuroprotezione. Tale reazione dipendente dagli agenti nocivi può quindi essere alla base dell'effetto protettivo femminile osservato nell'uomo.

È stato dimostrato infatti che vi è un eccesso di CNV ereditate dalla madre, dovute all'aumentata tolleranza del genere femminile per le aberrazioni genomiche. Per tale ragione le CNV ereditate da madri non-affette possono avere maggiori probabilità di essere patogene rispetto a quelle ereditate da padri sani¹⁷.

Ruolo dei geni coinvolti nelle CNVs e correlazione con il funzionamento cognitivo

Mediante l'utilizzo di piattaforme di bioinformatica e l'analisi della letteratura scientifica, di banche dati e di database sono stati studiati i geni coinvolti nelle 56 CNVs dei pazienti in studio (Fig. 6).

In totale le varianti del numero di copie coinvolgono circa 166 geni di cui:

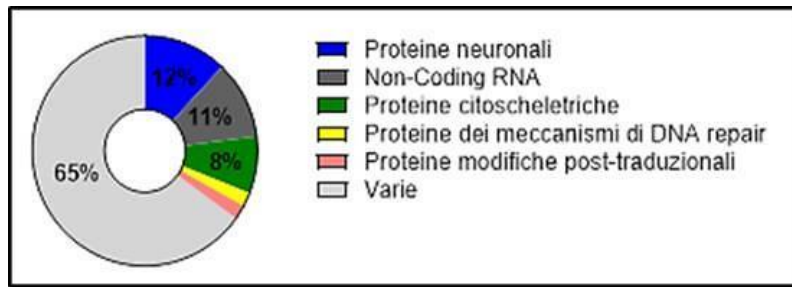


Fig. 6. Geni coinvolti nelle CNVs dei pazienti in studio.

- il 12% codificanti per proteine neuronali
- l'11% codificanti per Non-Coding RNA
- il 8% codificanti per proteine citoscheletriche (tubuline, proteine coinvolte al legame con l'actina, etc)
- il 2% codificanti per proteine coinvolte nei meccanismi di riparazione del danno al DNA
- il 2% codificanti per proteine coinvolte nei meccanismi post-traduzionali
- il restante 65% codificante per proteine di varia funzione non categorizzabili (da proteine coinvolte nel Sistema immunitario a fattori di trascrizione, proteine coinvolte nel metabolismo dei glucidi, etc.

Di questi geni i numeri più cospicui si sono osservati nelle categorie di geni per proteine

neuronali, per ncRNA e per proteine citoscheletriche, suggerendo un loro ruolo chiave nella patogenesi dell'ASD.

Ogni paziente ha effettuato test per la valutazione del funzionamento cognitivo, mediante Scale di *Griffiths* e *Weschler*. Del totale di 120 pazienti circa 85 mostravano un basso funzionamento, mentre 35 presentavano un alto funzionamento. All'interno di questi due gruppi siamo andati a identificare quale tipo di geni era coinvolto nelle CNV, riscontrando la seguente suddivisione (Tab. 3).

Si è evidenziato come vi fosse una diversa distribuzione tra alto e basso funzionamento tra i vari gruppi di geni. Tale diversità è stata analizzata per ognuno dei tre gruppi in rapporto ai geni non categorizzabili.

	Alto funzionamento	Basso funzionamento
Geni per proteine neuronali	5	1
Geni per Non-Coding RNA	1	4
Geni per proteine citoscheletriche	4	2
Geni per altre proteine (non categorizzabili)	10	35

Tab. 3. Test di valutazione del funzionamento cognitivo.

Per quanto riguarda i geni per **proteine neuronali** l'83,3% dei casi risultava ad alto funzionamento, mentre il 16,7% a basso funzionamento, diversamente dai geni *non categorizzabili* coinvolti in cui risultavano essere ad essere ad alto funzionamento il 22,2% e a basso il 77,8% (OR=17.5, IC 95%=2.17-210.2 $P_{value}=0.006$) (Fig. 7).

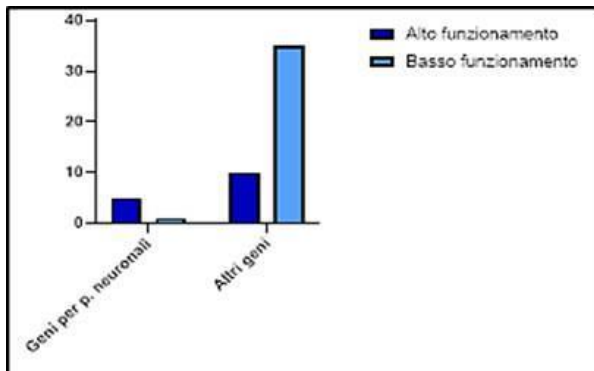


Fig. 7. Funzionamento dei geni per proteine neuronali.

Nei geni per **ncRNA** si è riscontrata una distribuzione tra alto e basso funzionamento del 20% contro l'80%, pressoché sovrapponibile ai valori dei geni non categorizzabili, già riportati (OR=0.88, IC 95%=0.07-6.65 $P_{value}>0.99$) (Fig. 8).

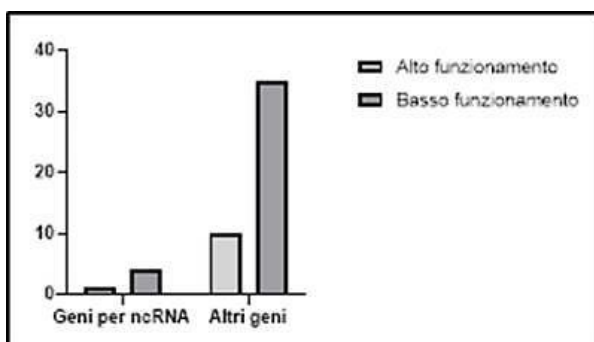


Fig. 8. Funzionamento dei geni per ncRNA.

Nel gruppo dei geni per **proteine citoscheletriche** il 66,7% è risultato essere ad alto funzionamento, mentre il 33,3% a basso, significativamente al 22,2% e 77,8% riportate per le mutazioni non categorizzabili (OR=7.0, IC 95%=1.37-39 $P_{value}=0.04$) (Fig. 9).

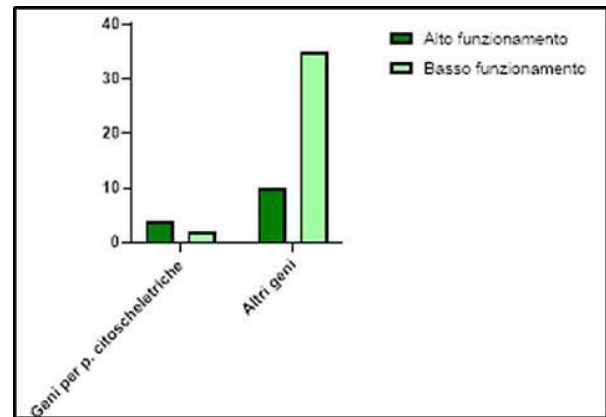


Fig. 9. Funzionamento dei geni per proteine citoscheletriche.

Da questi dati si evince l'importanza del ruolo delle proteine neuronali e citoscheletriche nell'autismo ad alto funzionamento. Per quanto riguarda le varianti nei geni per ncRNA risulta una maggiore presenza di un basso funzionamento, ma non differente da una maggiore prevalenza del basso funzionamento nella popolazione generale ASD.

Geni candidati in CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo

I 14 pazienti con CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo comprendevano i geni *NDE1*, *IMMP2L* e *LRRN3*, *GPHN*, *ZMYND11*, *SHOX*, *ASTN2*, *DLGAP1*, *PARK2* e i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*, *NIPA1* coinvolti nella medesima variante.

- NDE1

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo, classificato come un autismo ad alto funzionamento con un QI di 140 ed un EEG negativo.

L'analisi SNP-array ha identificato una microduplicazione di origine paterna del braccio corto del cromosoma 16 nella regione 16p13.11 di circa 1 Mb (15481920-16516109), comprendente i geni *ABCC6*, *NDE1*, *MYH11*, i quali sono associati a

suscettibilità per patologie neurocognitive a penetranza incompleta. La CNV 16p13.11 è una variante nel numero di copie ricorrente associata a una serie di disturbi del neurosviluppo tra cui autismo, ADHD, disabilità intellettiva e schizofrenia.

Seppur questa CNV sembri essere una variante comune nella popolazione (5/1682, 0.29%), il ruolo delle duplicazioni (de novo o ereditate) nel fenotipo ASD rimane incerto. Infatti la duplicazione 16p13.11 è stata riscontrata in altri pazienti con ritardo mentale e disturbi comportamentali da Hannes et al. e Ullmann et al.^{18, 19, 20}. La proteina codificata dal gene *ABCC6* è un membro della superfamiglia dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*), con funzione di trasporto di varie molecole attraverso le membrane extracellulari e intracellulari. Mutazioni in *ABCC6* sono responsabili dello pseudoxantoma elastico (OMIM 264800). La proteina codificata dal gene *MYH11* è una miosina (isoforma del tessuto muscolare liscio) appartenente alla famiglia delle catene pesanti della miosina. È il più importante gene candidato nella regione 16p13.11 per la predisposizione all'aneurisma e alla dissezione dell'aorta toracica (TAAD); mutazioni eterozigoti nel gene *MYH11* sono state identificate in individui con TAAD familiare e si ritiene siano in grado di interrompere la funzione contrattile della SMC, portando a una precoce e grave diminuzione dell'elasticità della parete aortica²¹.

Il gene *NDE1* codifica la proteina di distribuzione nucleare nudE omologa 1, una proteina centrosomiale che gioca un ruolo cruciale nel processo di encefalizzazione dei mammiferi e crescita della corteccia cerebrale umana, a causa del suo coinvolgimento nella mitosi, migrazione neuronale e organizzazione dei microtubuli durante lo sviluppo cerebrale. Questo gene rappresenta il candidato più forte per i fenotipi dello sviluppo neurologico associati alle CNV nel locus 16p13.11. La perdita di

NDE1 nei modelli murini causa profondi difetti nella corticogenesi cerebrale e nella proliferazione e migrazione neuronale, e le mutazioni in *NDE1* sono state associate a microlissencefalia negli esseri umani. *NDE1* e il suo omologo *NDEL1* (*Nuclear distribution protein nudE-like 1*) interagiscono fisicamente con LIS1 (lissencefalia 1), il primo gene della lissencefalia identificato, e formano un complesso coinvolto nella proliferazione, differenziazione e migrazione neuronale all'interno del cervello. È importante sottolineare che il complesso *NDE1 / LIS1 / NDEL1* fa parte del percorso che risulta interrotto nella schizofrenia-1 (*DISC1*), uno dei pathway più rilevanti alla base della psicosi, e si lega direttamente al gene *DISC1*; inoltre, la localizzazione subcellulare di *NDE1* e le interazioni proteina-proteina sono modulate attraverso la fosforilazione dalla protein-chinasi A (PKA) attivata da cAMP e *DISC1* è in grado di modulare la fosforilazione da PKA di *NDE1* tramite la regolazione dell'attività di PDE4, un enzima idrolizzante da cAMP che crea un co-complesso con *DISC1* e *NDE1 / LIS1 / NDEL1*²².

- **GPHN**

Qui vengono descritti e discussi due casi in cui è stata riscontrata una CNV nel locus del gene *GPHN*.

Caso 1

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e presentava un livello di sintomi al test ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS inferiore a 85 ed un EEG con anomalie aspecifiche. Inoltre veniva riferita familiarità per ritardo di linguaggio (cugino I in linea materna). L'analisi *array*-CGH ha identificato una microdelezione de novo del braccio lungo del cromosoma 14 nella regione 14q23.3 di circa 348 Kb (67031866-67415874) comprendente il gene OMIM *GPHN* (603930).

Caso 2

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS pari a 50-70 ed un EEG con anomalie aspecifiche. L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV, entrambe ereditate: una microdelezione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 14 nella regione 14q23.3 di circa 230 Kb (67111394-67341052) e una microduplicazione di origine paterna del braccio lungo del cromosoma 11 nella regione 11q21 di circa 368 Kb. La microduplicazione 14q23.3 include il gene *GPHN* (603930). La microduplicazione 11q21 include i geni: *CCDC67*, *SLC36A4*, *SMCO4* che, ad oggi, non rivestono un chiaro significato patogenetico.

GPHN è un gene aploinsufficiente che codifica per una proteina (gefirina) coinvolta sia nella sintesi del cofattore di molibdeno sia nel clustering del recettore sinaptico. Lionel et al. hanno descritto 6 soggetti non imparentati, con una gamma di diagnosi neurosviluppo tra cui ASD, schizofrenia o convulsioni, che possiedono rare microdelezioni de novo o ereditate che si sovrappongono agli esoni di *GPHN* sul cromosoma 14q23.3. La gefirina è una proteina di assemblaggio neuronale che ancora i recettori inibitori del neurotrasmettitore al citoscheletro postinaptico e si lega a un dominio di subunità del recettore e a dimeri di tubulina. La gefirina è una delle più importanti proteine dell'impalcatura postsinaptica nelle sinapsi inibitorie a causa della sua interazione con le subunità di GlyR e GABA_AR, regolandone la diffusione e la clusterizzazione. I canali ionici e le proteine del recettore sono le proteine più frequenti a livello della superficie cellulare neuronale, necessarie per facilitare la comunicazione intercellulare. La gefirina possiede un legame funzionale con diverse proteine sinaptiche come neurologine (*NLGN2*, *NLGN4*), neurexine (*NRXN1*, *NRXN2*, *NRXN3*) e

collibistina (*ARHGEF9*). È noto che queste proteine sono implicate nel rischio genetico per i disturbi del neurosviluppo, compresi i disturbi dello spettro autistico, la schizofrenia e l'epilessia²⁰.

- ***IMMP2L***

Qui vengono descritti e discussi due casi in cui è stata riscontrata una CNV nel locus del gene *IMMP2L* e *LRRN3*.

Caso 1

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS pari a 50-70 ed un EEG negativo. La famiglia riferiva familiarità per ritardo di linguaggio espressivo nel fratello del paziente. L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione 7q31.1 di circa 150 Kb (111106611-11256664) e una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 16 nella regione 16q22.2 di circa 200 kb (72249593-724491154). La microduplicazione 16q22.2 include parzialmente il gene RefSeq *LINC01572*, un gene che codifica per un long non coding RNA (lncRNA) e, ad oggi, non ha un chiaro significato patogenetico. La microdelezione 7q31.1 include parzialmente il gene OMIM *IMMP2L* (605977) e il gene OMIM *LRRN3* (619748).

Caso 2

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato-severo. È stato classificato come un autismo ad alto funzionamento, verbale con un QI di 117. L'analisi *array*-CGH ha identificato una microdelezione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione 7q31.1 di circa 949 Kb (109389060-110338543) che include i geni *EIF3IP1*, *IMMP2L*. *EIF3IP1* è il fattore di iniziazione alla traduzione eucariotica 3 subunità I

pseudogene 1, non associato a patologie. La microdelezione 7q31.1 include il gene *IMMP2L* (605977) e il gene *LRRN3* (619748).

Il gene *IMMP2L* contiene 6 esoni, si estende su 860 kb e codifica una proteina coinvolta nell'elaborazione delle sequenze peptidiche del segnale utilizzate per dirigere le proteine mitocondriali verso i mitocondri²¹. All'interno dei mitocondri questa proteina è essenziale per l'attività catalitica del complesso della peptidasi della membrana interna mitocondriale (IMP). Gimelli et al. hanno presentato nel loro studio la descrizione clinica nella quattro *pazienti* affetti da disturbi dello sviluppo neurologico, con CNV nel locus 7q31.1 che coinvolgono il gene *IMMP2L*, a favore del suo ruolo nella patogenesi dell'ASD, identificati da array-CGH^{22, 23}. Kreilau et al hanno sviluppato un modello murino per *IMMP2L* per studiare il comportamento dei topi portatori di una mutazione nel gene *IMMP2L*, confrontando il knockdown *IMMP2L* adulto eterozigote e omozigote di entrambi i sessi con compagni di cucciolata di tipo selvatico in campo aperto, interazione sociale e riconoscimento di nuovi oggetti. Hanno osservato che le conseguenze della carenza di *IMMP2L* non hanno avuto un impatto sulla salute degli animali, ma hanno indotto effetti comportamentali dipendenti dal gene e dal sesso, come l'iperlocomozione descritta nei topi knockdown eterozigoti maschi dell'*IMMP2L* rispetto agli omozigoti, ma non nei topi knockdown femminili. I topi erano molto più sensibili agli effetti stimolanti della desamfetamina. Grazie a questo studio sembra che la neurotrasmissione dopaminergica disfunzionale sembri essere un meccanismo che porta alla sindrome di Gilles de la Tourette e sembra avere un ruolo importante nei Disturbi dello Spettro Autistico²⁴. Il gene *LRRN3* codifica per una proteina neuronale, si trova sul cromosoma umano 7q31.1 ed è posizionato all'interno dell'introne 3 del gene *IMMP2L*. È probabile che gli *LRRN* funzionino come molecole di

adesione cellulare o recettori di trasduzione del segnale²⁵.

- **ZMYND11**

Al momento della nostra valutazione le pazienti (gemelle monozigoti) avevano 4 anni, con un livello di sintomi ADOS moderato. Entrambe le bambine avevano un autismo a basso funzionamento, erano averbali e presentavano un QS inferiore a 50. Inoltre veniva riferita familiarità per disturbo del linguaggio in linea paterna.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una microduplicazione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 10 nella regione 10p15.3 di circa 177 Kb (100026-277232) che include il gene *ZMYND11*, le cui mutazioni in eterozigosi sono state associate a disabilità intellettiva pertanto, sebbene ad oggi tale microriarrangiamento non assuma un chiaro significato patogenetico, non si può escludere un suo coinvolgimento nella determinazione del quadro clinico delle pazienti. La proteina codificata da questo gene si localizza nel nucleo e funziona come un repressore trascrizionale. Sono state identificate varianti di trascrizione espresse alternativamente che codificano diverse isoforme. Mutazioni in *ZYMND11* sono state associate a disabilità intellettiva e ritardo mentale a trasmissione autosomica dominante. Moskowitz et al. sostengono l'associazione di *ZMYND11* con la sindrome dello spettro autistico e suggeriscono che dovrebbe essere incluso nell'elenco dei geni candidati di suscettibilità ai disturbi del neurosviluppo. Ad oggi però il coinvolgimento di questo gene nel Disturbo dello Spettro autistico è ancora discusso²⁶.

- **SHOX**

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni e 4 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS moderato-severo, lassità legamentosa. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, non verbale con un QS inferiore a 50. La famiglia

riferiva familiarità per disturbo dello spettro autistico nel fratello del paziente.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione Xp22.33 di circa 688 Kb (539247-1226834) di origine materna, che include il gene *SHOX*.

SHOX è un gene pseudoautosomico che codifica per un fattore di trascrizione dell'omeodominio coinvolto nel ciclo cellulare e nella regolazione della crescita cellulare. Le delezioni degli *enhancer* di *SHOX* causano bassa statura e anomalie scheletriche con trasmissione dominante legata al cromosoma X. Le microduplicazioni di questa regione sembrano essere considerate fattori di rischio a bassa penetranza per i disturbi del neurosviluppo, con un rischio aumentato in entrambi i sessi. Varie isoforme di *SHOX* specifiche sono espresse esclusivamente nel cervello fetale in via di sviluppo, ciò può spiegare l'effetto di una espressione alterata della proteina *SHOX* nel neurosviluppo²⁷.

- ***ASTN2***

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS tra 50 e 70. La famiglia riferisce altre due figlie che avevano presentato ritardo del linguaggio.

L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 9 nella regione 9q33.1 di circa 466 Kb (119005705-119431557) e una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 9 nella regione 9q33.3 di circa 99 Kb (127484621-127583436). La microduplicazione 9q33.3 include i geni *NR6A1*, *OLFML2A* e ad oggi non assume un chiaro significato patogenico. La microduplicazione 9q33.1 include i geni *ASTN2-AS1*, *PAPPA-AS1*, *PAPPA*, *ASTN2*.

Il gene *PAPPA* codifica per una metalloproteinasi secreta che scinde le proteine leganti il fattore di crescita simile all'insulina (IGFBP). Dopo la scissione dell'IGFBP, i fattori di crescita dell'insulina si dissociano dagli IGFBP e si legano ai recettori IGF, determinando l'attivazione della via dell'IGF. La proteina codificata svolge un ruolo nella formazione ossea, infiammazione, guarigione delle ferite e fertilità femminile e, ad oggi, non assume un chiaro significato patogenico.

Il gene ***ASTN2*** è il secondo membro della famiglia delle proteine dell'astrotactina, (astrotactina 2), interagisce con la proteina codificata da *ASTN1* nella membrana neuronale e regola la sua espressione sulla superficie neuronale, mediando così la formazione e il rilascio di aderenze neuronale-gliali durante la migrazione. Le astrotactine specifiche dei vertebrati, *ASTN2* e il suo paralogo *ASTN1*, hanno ruoli chiave nella migrazione neuronale guidata dalla glia durante lo sviluppo del cervello. Infatti l'astrotactina 1 (*ASTN1*) della proteina di membrana integrale, forma aderenze tra i neuroni e l'astroglia come antigene di superficie delle cellule neuronali. Nei modelli murini *ASTN1* è altamente espresso nella migrazione delle cellule dei neuroni dei granuli nel cervelletto e anche in altre regioni del cervello caratterizzate dalla formazione di strutture laminare tramite migrazione neuronale guidata da cellule gliali, tra cui la corteccia cerebrale, l'ippocampo e il bulbo olfattivo²⁸. I topi knockout per *ASTN1* mostrano una migrazione alterata dei granuli cerebellari, dimensioni cerebellari minori, ridotto legame dei neuroni gliali, morfologia anormale delle cellule di Purkinje e minore equilibrio e coordinazione nei test comportamentali rispetto al *wild-type*.

Rare CNV che interrompono *ASTN2* o sia *ASTN2* che *TRIM32* sono state riportate nel locus 9q33.1 da studi sull'intero genoma in alcuni individui con disturbi dello sviluppo neurologico (NDD). Per determinare la

prevalenza delle mutazioni dell'astrotactina e delineare il loro spettro fenotipico associato, sono stati esaminati da Lionel et al. sia ASTN2/TRIM32, sia ASTN1 (locus 1q25.2) per CNV esoniche in 89.985 individui. In questo set di dati clinici, sono state identificate 46 delezioni e 12 duplicazioni che interessano ASTN2. Le delezioni di ASTN1 erano molto più rare. Gli individui osservati con tali delezioni includono soggetti con disturbo dello spettro autistico (ASD), disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), ritardo del linguaggio, ansia e disturbo ossessivo compulsivo (DOC). Inoltre è stato osservato e quantificato l'RNA nel tessuto cerebrale che ha rivelato un'espressione ASTN1 costantemente elevata mentre l'espressione di ASTN2 ha raggiunto il picco nella neocorteccia embrionale precoce e nella corteccia cerebellare postnatale. Questi confermano l'importante ruolo svolto dalle astrotactine nello sviluppo neurologico umano e nella neurofisiopatologia dei suoi disturbi²⁹.

- **DLGAP1**

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, il paziente presentava ipomimia facciale, averbale con un QS inferiore a 50. La famiglia riferiva familiarità per disturbo depressivo maggiore.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 18 nella regione 18p11.31 di circa 129 Kb (4054162-4182981). La microduplicazione 18p11.31 include il gene **DLGAP1** (605445) dal *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM).

La proteina codificata da questo gene è espressa nel tessuto cerebrale, si localizza nella densità postsinaptica e interagisce con un numero di proteine associate all'ASD, tra cui *DLG1*, *DLG4*, *SHANK1*, *SHANK2* e *SHANK3*.

Questo gene è stato originariamente identificato come un gene candidato ASD, infatti il sequenziamento del tessuto cerebrale post mortem di 25 casi di ASD ha portato all'identificazione di varianti significative non sinonime in questo gene confermando il coinvolgimento di questo gene con l'autismo³⁰.

- **TUBGCP5, CYF1P1, NIPA2, NIPA1, LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2**

Riporto qui 3 casi che coinvolgono la regione 15q11.2. Il *Caso 1* e il *Caso 2* presentano una stessa CNV con delezione dei suddetti geni, il *Caso 3* invece una loro duplicazione.

Caso 1

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS inferiore a 50 ed un EEG con anomalie aspecifiche. La famiglia riferiva familiarità per ritardo del linguaggio in linea paterna. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 512 Kb (22770421-22770421). La microdelezione 15q11.2 include i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*, *NIPA1*, *LOC283683*, *WHAMMP3*, *GOLGA8IP*, *HERC2P2*.

Caso 2

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e 3 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS inferiore a 50. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV de novo: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 512 Kb (22770421-23282799). La microdelezione 15q11.2 include i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*,

NIPA1, LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2.

Caso 3

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni e 3 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS lieve. È stato classificato come un autismo ad alto funzionamento, verbale e con un QI di 109. La famiglia riferiva familiarità per ritardo del linguaggio in linea paterna e disturbi ansioso-depressivi in entrambe le linee. L'analisi *array*-CGH ha identificato tre CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 425 Kb, una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 2 nella regione 2p25.3 di circa 295 Kb e una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 1 nella regione 1p36.11 di circa 86 Kb. La microduplicazione 15q11.2 include i geni *ELM02P1, TUBGCP5, CYF1P1, NIPA2, NIPA1, WHAMMP3*. La microduplicazione 2p25.3 comprende i geni *RNASEH1-AS1, ALLC, AD11, RNASEH1, RPS7, COLEC11, TRAPPC12* e la microduplicazione 1p36.11 include il gene *BC013143* che, ad oggi non assumono un chiaro significato patogenetico relativo al quadro fenotipico del paziente. La regione deleta si estende su circa 300-500 kb nella regione critica della Sindrome di Prader-Willi (PWS; OMIM 176270)/Sindrome di Angelman (AS; OMIM 105830), tra i punti di interruzione 1 (BP1) e 2 (BP2). La regione tra BP1 e BP2 contiene 4 geni che non sono soggetti a imprinting: ***TUBGCP5*** (OMIM 608147), ***NIPA1*** (OMIM 608145), ***NIPA2*** (OMIM 608146) e ***CYFIP1*** (OMIM 606322).

La sindrome da microdelezione 15q11.2 è una rara monosomia autosomica parziale con un'espressione fenotipica variabile e una penetranza ridotta associata a una maggiore suscettibilità ai disturbi neuropsichiatrici o dello sviluppo neurologico (inclusi sviluppo psicomotorio ritardato, ritardo del linguaggio, ASD, ADHD, disturbo ossessivo-compulsivo disturbo, epilessia o convulsioni).

Può anche includere lievi caratteristiche dismorfiche aspecifiche (come orecchie displastiche, fronte ampia, ipertelorismo), palatoschisi, anomalie neurologiche e di neuroimaging (come atassia e ipotonia muscolare)³¹. Questa delezione comprende quindi:

- Il gene *TUBGCP5*, che codifica per la componente 5 della gamma-tubulina, proteina che fa parte del complesso gamma tubulina, necessario per la nucleazione dei microtubuli dal centrosoma;
- Il gene *CYF1P1*, codifica per una proteina cerebrale, componente del complesso CYFIP1-EIF4E-FMR1, il quale lega il cappuccio dell'mRNA del gene *FMR1* e ne media la repressione traduzionale.
- I geni *NIPA1* e *NIPA2* codificano per trasportatori di magnesio nelle cellule neuronali ed epiteliali, svolgendo un ruolo sia nello sviluppo che nel mantenimento del sistema nervoso²⁰.

I geni *LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2, ELM02P1* ad oggi, non assumono un chiaro significato patogeno relativo al fenotipo dei nostri pazienti.

- ***PARK2***

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS inferiore a 50. La famiglia riferiva familiarità per disturbo dello spettro autistico nella figlia della sorella gemella del padre del paziente. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 6 nella regione 6q26 di circa 1.2 Mb (16188913-163121898), che include i geni *LOC105378098, PARK2*.

LOC105378098 è un gene che codifica per un *long non coding* RNA (lncRNA) e, ad oggi, non ha un chiaro significato patogeno.

Il gene **PARK2** codifica per Parkin, un componente di un complesso multiproteina E3 ubiquitina ligasi che permette il legame dell'ubiquitina al substrato targettandole per la degradazione proteasomiale. Le mutazioni di **PARK2** sono frequentemente associate al morbo di Parkinson, ma sono state descritte anche alterazioni strutturali in pazienti con disturbi del neurosviluppo (NDD), suggerendo un effetto patologico ricorrente in processi cerebrali neurodegenerativi e neurodegenerativi. Inoltre uno studio di Yin et al su 335 pazienti con ASD ha dimostrato la presenza di 6 casi con delezione/duplicazione del locus 6q26. Questi risultati hanno dimostrato che delezioni e duplicazioni esoniche possono andare ad alterare la funzione del gene^{32, 33}.

Conclusioni

Questo studio ci ha permesso di identificare diverse CNV e analizzare il loro ruolo nell'ASD. La relazione di queste ultime con le diverse informazioni raccolte ci porta a riconoscere il loro ruolo fondamentale ma non del tutto chiaro, come anche è riportato in letteratura. La ricerca di una correlazione tra la CNV ereditata e la familiarità per patologie neuropsichiatriche è risultata non essere statisticamente significativa, ma ciò potrebbe essere dato dalla variazione di manifestazione fenotipica di un dato allele all'interno di una popolazione. Premesso che la frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente all'interno di una popolazione varia, poiché la penetranza di queste varianti dipende sia dal genotipo che dall'influenza dell'ambiente, l'identificazione di una CNV ereditata richiede un accurato studio dell'albero genealogico e la ricerca di possibili caratteristiche comportamentali del fenotipo ASD nel genitore portatore della variante. L'identificazione di CNV associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo, nei soggetti affetti da ASD, può facilitare la consulenza post-test poiché la variante può essere considerata responsabile della condizione clinica del paziente. Tuttavia,

l'identificazione di CNV non ricorrente richiede un accurato studio dell'analisi di segregazione di tale variante nella famiglia, e sul ruolo dei geni coinvolti al fine di identificare una possibile associazione con il quadro clinico del paziente. La categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi ci ha permesso di osservare come il rapporto maschi/femmine sia spostato verso una maggiore averbalità nel sesso maschile, a sostegno della teoria del ruolo protettivo del sesso femminile. Questa teoria può contribuire a spiegare perché le CNV ereditate da madri non-affette hanno maggiori probabilità di essere patogene rispetto a quelle ereditate da padri sani.

Altro aspetto fondamentale è l'analisi dei geni coinvolti nella variante. Il nostro studio mette in evidenza una possibile associazione tra ASD ad alto funzionamento e i geni per proteine neuronali e citoscheletriche, mentre rimane ancora incerto se i geni per *Non-Coding* RNA siano associati a un funzionamento cognitivo più basso rispetto alla popolazione ASD generale. Questo ci testimonia come questi geni, coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso fetale, nella regolazione dell'espressione genica, nelle funzioni del citoscheletro e nelle interazioni intersinaptiche, svolgano un ruolo chiave nella manifestazione fenotipica dell'ASD e nella sua patogenesi¹⁸. I presenti risultati concordano con la letteratura scientifica riguardo il dibattuto ruolo delle CNV nella patogenesi del ASD.

La varietà dei fenotipi dell'ASD può essere collegata a diverse varianti comuni e/o rare, ai fattori ambientali e alla capacità di buffering del background genetico sulle mutazioni più deleterie. L'identificazione di questa eterogeneità attraverso l'uso di informazioni provenienti da diversi campi di ricerca, dovrebbe consentire una migliore diagnosi, cura e integrazione nella società di individui con autismo.

Alla luce di ciò l'autismo non va considerato una singola entità ma come un continuum della diversità umana.

BIBLIOGRAFIA

1. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genetics in Medicine* 2011; 13: 278-94.
2. Oron O, Elliott E. Delineating the Common Biological Pathways Perturbed by ASD's Genetic Etiology: Lessons from Network-Based Studies. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 828.
3. Biblioteca Alessandro Liberati del Servizio Sanitario Regionale del Lazio. <https://bal.lazio.it/speciale-autismo/tabella-criteri-diagnostici/>.
4. Geschwind DH, Paulson HL, Klein C. Neurogenetics, Part I. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 147 (3rd series), Elsevier 2018.
5. Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Medica* 2015; 57: 19-28.
6. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 551-63.
7. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American college of medical genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011; 13: 680-5.
8. Velinov M. Genomic Copy Number Variations in the Autism Clinic-Work in Progress. *Frontiers Cell Neurosci* 2019; 13: 57.
9. Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, et al. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism* 2012; 3: 9.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015; 17: 405-24.
11. Chung BH, Tao VQ, Tso WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formosan Med Ass = Taiwan yi zhi* 2014; 113: 400-8.
12. Wood-Downie H, Wong B, Kovshoff H, et al. Sex/Gender Differences in Camouflaging in Children and Adolescents with Autism. *J Autism Dev Disord* 2021; 51: 1353-64.
13. Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 165.
14. Zhang S-F, Gao J, Liu C-M. The Role of Non-Coding RNAs in Neurodevelopmental Disorders. *Front Genet* 2019; 10: 1033.
15. Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014; 94: 677-94.
16. Konopko MA, Densmore AL, Krueger BK. Sexually dimorphic epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor in fetal brain in the valproic acid model of autism spectrum. *Dev Neurosci* 2017; 39: 507-18.
17. Werling DM, Geschwind DH. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2013; 26: 146-53.
18. Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014; 94: 677-94.
19. Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, et al. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 2009; 46: 223-32.
20. Lionel AC, Vaags AK, Sato D, et al. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 2055-66.
21. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, et al. Male-Biased Autosomal Effect of 16p13.11 Copy Number Variation in Neurodevelopmental Disorders. *PLoS One* 2013; 8: e61365.
22. Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Mol Cytogenet* 2014; 7: 54.
23. RefSeq. NCBI Reference Sequence Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.
24. Kreilhaus F, Chesworth R, Eapen V, Clarke R, Karl T. First behavioural assessment of a

- novel Immp2l knockdown mouse model with relevance for Gilles de la Tourette syndrome and Autism spectrum disorder. *Behav Brain Res* 2019; 374:112057.
25. Sousa I, Clark TG, Holt R, et al. Polymorphisms in leucine-rich repeat genes are associated with autism spectrum disorder susceptibility in populations of European ancestry. *Mol Aut* 2010; 1: 7.
 26. Moskowitz AM, Belnap N, Siniard AL, et al. A de novo missense mutation in ZMYND11 is associated with global developmental delay, seizures, and hypotonia. *Cold Spring Harbor Mol Case Studies* 2016; 2: a000851.
 27. Tropeano M, Howley D, Gazzellone MJ, et al. Microduplications at the pseudoautosomal SHOX locus in autism spectrum disorders and related neurodevelopmental conditions. *J Med Genet* 2016; 53: 536-47.
 28. Chung BH, Tao VQ, Tso WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formosan Med Ass = Taiwan yi zhi* 2014; 113: 400-8.
 29. Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, al. Disruption of the ASTN2/TRIM32 locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2752-68.
 30. Li J, Shi M, Ma Z, et al. Integrated systems analysis reveals a molecular network underlying autism spectrum disorders. *Mol Syst Biol* 2014; 10: 774.
 31. Orphanet. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=EN&Expert=261183.
 32. Yin CL, Chen HI, Li LH, et al. Genome-wide analysis of copy number variations identifies PARK2 as a candidate gene for autism spectrum disorder. *Mol Autism* 2016; 7: 23.
 33. Conceição IC, Rama MM, Oliveira B, et al. Definition of a putative pathological region in PARK2 associated with autism spectrum disorder through in silico analysis of its functional structure. *Psyc Genet* 2017; 27: 54-61.
- Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 giugno 2021
- Dott.ssa Caterina Micolonghi, Facoltà di Medicina e Odontoiatria, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Dipartimento di Neuroscienze Umane, "Sapienza" Università di Roma
- Prof. Antonio Pizzuti, Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma
- Per la corrispondenza: cate.mico@gmail.com