



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Multi-Omics Analysis of Alcohol Use Disorder in Postmortem  
Human Brain Tissue**

Autor: Lea Sigrid Silke Zillich  
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)  
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. S. Witt

Alcohol use disorder is characterized by a loss of control over alcohol intake and contributes to a large number of premature deaths worldwide by representing a strong risk factor for numerous diseases. Despite decade-long research on alcohol use disorder, treatment options are limited and relapse rates following withdrawal treatment are high. Currently, alcohol use disorder is understood as a brain disorder as neuroimaging studies have shown substantial alcohol use disorder-associated connectivity and activity alterations in the human brain. This led to the hypothesis of a neurocircuitry of addiction involving multiple brain regions such as the ventral and dorsal striatum, but also cortical regions that display aberrant functional connectivity patterns in alcohol use disorder. These profound brain changes in alcohol use disorder are assumed to be established by molecular processes such as aberrant DNA methylation and gene expression patterns. To investigate these processes in the human brain, postmortem brain tissue depicts a valuable resource. Previous studies have been published reporting on alcohol use disorder-associated differential methylation or differentially expressed genes mainly in the prefrontal cortex. So far, no analysis has integrated DNA methylation and gene expression data in a multi-Omics approach. Further, it remains unclear how alterations in DNA methylation and gene expression are related to each other in the alcohol use disorder brain. The overall aim of the presented studies was to identify functionally relevant molecular mechanisms of alcohol use disorder in the neurocircuitry of addiction.

To address these points, the first paper aimed to expand the epigenetic characterization of alcohol use disorder to the neurocircuitry of addiction by performing an epigenome-wide association study of DNA methylation in alcohol use disorder in five brain regions: the cortical regions anterior cingulate cortex and Brodmann Area 9, and the striatal regions caudate nucleus, putamen, and ventral striatum. In the second study, the gene expression profile of the striatal brain regions was investigated using RNA-Sequencing enabling the integration of DNA methylation and gene expression data in a multi-omics approach. The biological implication of alcohol use disorder-associated DNA methylation and expression signatures was investigated in both studies using a comprehensive set of bioinformatic tools including Gene Ontology- and gene-set enrichment analyses, weighted correlation network analyses, enrichment analyses of results from genome-wide association studies of substance use disorder phenotypes, and protein-protein interaction networks.

In the epigenome-wide association study of alcohol use disorder in five brain regions, 20 differentially methylated CpG sites were detected, two in caudate nucleus and 18 in the ventral striatum, that were associated with alcohol use disorder at epigenome-wide significance. Alcohol use disorder-associated DNA methylation signatures were strongest in the caudate nucleus, putamen, and ventral striatum and were enriched within immune-related cellular pathways. Gene expression analysis in the second study suggested converging evidence for inflammatory and immunological signaling in alcohol use disorder. While the overlap of differential methylation and differential expression at the gene level was limited, it was evident on the network level. Consistent differential expression of the ARHGEF15 gene was found in the caudate nucleus, putamen, and ventral striatum in alcohol use disorder. Further, the STAT3 gene was identified as a conserved hub node in alcohol use disorder-associated gene networks and might be a promising candidate for further evaluation.

In conclusion, this is the first study that integrated DNA methylation and gene expression data from the same individuals in multiple brain regions in the context of alcohol use disorder. Converging evidence from this study supports the role of (neuro) inflammation in the pathophysiology of alcohol use disorder. Methods for multi-omics integration are rapidly emerging and the integration of multiple omics including epigenome-wide DNA Methylation, transcriptomics, proteomics, and non-coding RNAs enables the

complementation, but also the prioritization of findings from single omics layers. In follow-up studies, functional validation of multi-omics-derived candidate genes and pathways should be performed using animal models and patient-derived brain organoids. Conducting such precision medicine approaches might lead to the discovery of novel therapeutic strategies in alcohol use disorder, which are urgently required.

Die Alkoholkonsumstörung ist gekennzeichnet durch Kontrollverlust über den Alkoholkonsum und trägt in hohem Maße zur weltweiten Morbidität und Mortalität bei, da sie einen Risikofaktor für zahlreiche Erkrankungen darstellt. Trotz jahrzehntelanger Forschung auf dem Gebiet der Alkoholkonsumstörung sind die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt, und die Rückfallquoten nach einer Entzugsbehandlung hoch. Gegenwärtig wird die Alkoholkonsumstörung als eine Störung des Gehirns verstanden, da Neuroimaging-Studien erhebliche, mit der Alkoholkonsumstörung zusammenhängende Konnektivitäts- und Aktivitätsveränderungen im menschlichen Gehirn nachgewiesen haben. Dies führte zu der Hypothese einer „neurocircuitry of addiction“ (neuronaler Suchtschaltkreis), an der mehrere Hirnregionen, wie das ventrale und dorsale Striatum, aber auch kortikale Regionen beteiligt sind, die bei der Alkoholkonsumstörung abweichende funktionelle Konnektivitätsmuster aufweisen. Es wird angenommen, dass diese tiefgreifenden Veränderungen des Gehirns bei der Alkoholkonsumstörung durch molekulare Prozesse wie veränderte DNA-Methylierung und Genexpressionsmuster bedingt sind. Postmortales Hirngewebe stellt eine wertvolle Ressource dar, um diese Prozesse im menschlichen Gehirn zu untersuchen. In früheren Studien wurde über eine mit Alkoholkonsum assoziierte differentielle Methylierung oder differentielle Genexpression vor allem im präfrontalen Kortex berichtet. Bislang gibt es keine Studie im Feld der Alkoholkonsumstörung, die DNA-Methylierungs- und Genexpressionsdaten in einem Multi-Omics-Ansatz integriert. Darüber hinaus ist nach wie vor unklar, wie Veränderungen der DNA-Methylierung und der Genexpression im Gehirn bei der Alkoholkonsumstörung zusammenhängen. Das übergeordnete Ziel der vorgestellten Studien bestand darin, funktionell relevante molekulare Mechanismen der Alkoholkonsumstörung in der neurocircuitry of addiction zu identifizieren.

Dazu wurde eine epigenomweite Assoziationsstudie zur DNA-Methylierung bei Alkoholkonsumstörung in fünf Hirnregionen durchgeführt: in den kortikalen Regionen anteriorer cingulärer Kortex und Brodmann Area 9 sowie in den striatalen Regionen Nucleus caudatus, Putamen und ventrales Striatum. In der zweiten Studie wurde das Genexpressionsprofil der striatalen Hirnregionen mittels RNA-Sequenzierung untersucht, was die Integration von DNA-Methylierungs- und Genexpressionsdaten in einem Multi-omics-Ansatz ermöglichte. Die biologische Bedeutung der mit Alkoholkonsum assoziierten DNA-Methylierungs- und Expressionssignaturen wurde in beiden Studien mit Hilfe einer umfassenden bioinformatischen Analyse-Sequenz untersucht, darunter Gene-Ontology- und Gene-set-Enrichment-Analysen, Netzwerkanalysen, Enrichment-Analysen von Ergebnissen aus genomweiten Assoziationsstudien zu Phänotypen von Substanzkonsumstörungen und Protein-Protein-Interaktions-Netzwerke.

In der epigenomweiten Assoziationsstudie zur Alkoholkonsumstörung in fünf Hirnregionen wurden 20 differentiell methylierte CpG-Sequenzen entdeckt, zwei im Nucleus caudatus und 18 im ventralen Striatum, die auf Ebene der epigenomweiten Signifikanz mit der Alkoholkonsumstörung in Verbindung gebracht wurden. Die mit der Alkoholkonsumstörung assoziierten DNA-Methylierungssignaturen waren im Nucleus caudatus, im Putamen und im ventralen Striatum am stärksten ausgeprägt und zeigten eine Anreicherung für immunbezogene Signalwege. Die Genexpressionsanalyse in der zweiten Studie wies in Zusammenhang mit den Ergebnissen der ersten Studie auf konvergierende Befunde für entzündliche und immunologische Signalwege bei der Alkoholkonsumstörung hin. Während die Überschneidung von differentieller Methylierung und differentieller Genexpression begrenzt war, zeigte sich eine Überschneidung der Befunde in der Netzwerkanalyse. Eine konsistente differentielle Expression des ARHGEF15-Gens wurde im Nucleus caudatus, im Putamen und im ventralen Striatum bei der Alkoholkonsumstörung festgestellt. Darüber hinaus wurde das STAT3-Gen als konservierter Knotenpunkt in Gennetzwerken identifiziert, die mit der Alkoholkonsumstörung in Verbindung stehen. STAT3 stellt damit einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen dar.

Zusammenfassend ist dies die erste Studie, in der DNA-Methylierungs- und Genexpressionsdaten von denselben Personen in mehreren Gehirnregionen im Zusammenhang mit der Alkoholkonsumstörung integriert wurden. Die konvergierenden Erkenntnisse aus dieser Studie unterstützen die Rolle der (Neuro-) Inflammation in der Pathophysiologie der Alkoholkonsumstörung. Die Methoden für die Datenintegration auf Basis eines Multi-Omics-Ansatzes entwickeln sich rasant, und die Integration mehrerer Omics-Ebenen, einschließlich epigenomweiter DNA-Methylierung, Transcriptomics, Proteomics und nicht-kodierender RNAs, ermöglicht eine Erweiterung der Datenbasis und die Priorisierung von Erkenntnissen aus einzelnen Omics-Ebenen. In Folgestudien sollte eine funktionelle Validierung der aus der Multi-Omics-Analyse abgeleiteten Kandidatengene und Signalwege anhand von Tiermodellen und aus Patientengewebe generierten Hirnorganoiden durchgeführt werden. Die Durchführung solcher präzisionsmedizinischen Ansätze könnte zur Entdeckung dringend benötigter neuer therapeutischer Strategien bei der Alkoholkonsumstörung beitragen.