

Ricerca Futura Ruolo della Genetica

di Paolo Frezzotti

L'ereditarietà del glaucoma è stata riconosciuta più di 150 anni fa ma solamente nell'ultima decade è stata utilizzata come uno strumento per meglio comprendere le basi molecolari della malattia. Infatti un considerevole numero di mutazioni specifiche sono state identificate nel codice genetico di pazienti che segregavano per specifici fenotipi della malattia glaucomatosa. Così come è già stato sequenziato il genoma umano e così come sono già rapidamente migliorati i metodi utilizzati per identificare i geni relativi a determinate malattie, così anche i geni che sono coinvolti nella patogenesi del glaucoma saranno sicuramente identificati in futuro. Questo porterà ad una nuova e migliore conoscenza della malattia che ci consentirà di classificare le forme di glaucoma probabilmente in maniera diversa dall'attuale e permetterà ai ricercatori e ai clinici di meglio comprendere la patogenesi della malattia glaucomatosa a livello cellulare e a livello di biologia molecolare. Le forme più comuni di glaucoma non mostrano una ereditarietà di tipo mendeliano, ma i consanguinei di individui glaucomatosi hanno una probabilità più alta della popolazione generale di sviluppare la malattia. Tuttavia, una pressione intraoculare (IOP) elevata è ancora il maggior fattore conosciuto di rischio per il glaucoma, sebbene non sia né necessario né sufficiente perché insorga la otticopatia. Ci sono infatti individui che sviluppano glaucoma senza avere una IOP superiore ai limiti considerati normali, e comunque la maggior parte degli individui con una IOP elevata non ha glaucoma, e molti non svilupperanno glaucoma nemmeno dopo molti anni di osservazione. La familiarità del glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) è stata messa in evidenza, tra gli altri, anche dal "Beaver Dam Eye Study", che ha quantificato i valori di correlazione per l'ereditarietà tra genitore e figlio dei maggiori fattori di rischio per il glaucoma: 0,36 per la IOP, 0,55 per il diametro della papilla, 0,57 per il diametro del disco ottico, 0,48 per il rapporto papilla/disco ottico. L'eterogeneità delle forme di presentazione e di progressione del glaucoma, la loro diversa risposta ai trattamenti terapeutici e la loro familiarità suggeriscono quindi che il glaucoma sia una patologia ad eziologia multifattoriale influenzata tanto da fattori genetici, quanto ambientali. Sebbene esistano forme di glaucoma autosomiche dominanti o recessive, il decorso della malattia anche in questi pazienti è ancora complesso e soggetto a fattori multipli. Tutto questo lascia pensare che esistano fattori di carattere genetico e/o epigenetico individuali che possono influenzare la regolazione della IOP e/o la soglia di apoptosi dei neuroni Relazione presentata al "2nd Siena Glaucoma Summer School" Anno quindicesimo dicembre 2010 212 ganglionari, e che quindi determinano la suscettibilità alla malattia, nonché il suo decorso e la risposta ai farmaci. Il glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) è la forma più comune di glaucoma (60-70% di tutti i glaucomi). Il POAG si può manifestare sia in condizioni di IOP elevata: High Tension Glaucoma (HTG) che di IOP normale: Normal Tension Glaucoma (NTG, secondo alcuni autori circa il 30% dei casi di POAG). Perciò, sembra ipotizzabile che possa esistere uno spettro di suscettibilità allo sviluppo della malattia in presenza di pressioni diverse, e che quindi IOP definite normali possano innescare fenomeni neurotossici in alcuni individui, così come altri individui possano essere maggiormente tolleranti a IOP ritenute elevate. Infatti, un certo numero di pazienti NTG trova comunque giovamento da un ulteriore abbassamento della IOP. Considerati nel loro insieme, questi dati suggeriscono perciò che possano esistere più gruppi di geni rilevanti per la suscettibilità al glaucoma; ad esempio, un primo gruppo potrebbe essere coinvolto nella regolazione della IOP, un secondo gruppo essere responsabile del decorso anatomico del nervo ottico, principalmente a livello della lamina cribrosa, ed un terzo gruppo influenzare la soglia di resistenza dei neuroni ganglionari alle alterazioni del trofismo. Di conseguenza, l'insorgere o meno del glaucoma dipenderebbe dalle particolari combinazioni di questi gruppi di geni, e dalla loro interazione con i fattori ambientali. L'insieme di queste complesse relazioni potrà essere meglio compreso con l'identificazione di tutti i principali elementi genetici ivi coinvolti. Al momento, gli studi genetici di linkage e di mappatura hanno consentito di individuare almeno 15 loci implicati nell'insorgere del glaucoma primario ad angolo aperto (Tab. 1). Fra tutti questi loci, due soli geni sono stati identificati che influenzano in maniera dominante l'insorgere precoce del glaucoma: il gene della miocilina (MYOC) e il gene dell'optineurina (OPTN). Il gene della miocilina (GLC1A) è

stato il primo gene identificato correlato con il glaucoma. Mutazioni della miocilina si ritrovano nel 2-4% degli individui affetti da POAG, e in una più ampia frazione di pazienti con JOAG (6-36%). La funzione di questa proteina non è ancora nota, ma il Ruolo della Genetica Tabella 1 Loci associati a glaucoma ad angolo aperto Locus Gene Chromosome Phenotype Inheritance GLC1A MYOC 1q23-24 JOAG/POAG AD GLC1B 2cen-q13 POAG AD GLC1C 3q21-24 POAG AD GLC1D 8q23 POAG AR GLC1E OPTN 10p15-p14 JOAG/POAG ? GLC1F 7q35-36 POAG AD GLC1G WDR36 5q22.1 POAG ? GLC1H 2p16.3-p15 JOAG AD GLC1I 15q11-q13 JOAG AD GLC1J 9q22 JOAG ? GLC1K 20p12 JOAG ? GLC1L 3p22-p21 POAG GLC1M 5q22.1-q32 JOAG GLC1N 15q22-q24 JOAG LOXL1 15q24.1 PEG GLC = glaucoma; 1 = angolo aperto; A/K = loci POAG: glaucoma primario ad angolo aperto JOAG: glaucoma primario ad angolo aperto giovanile PEG: glaucoma pseudoesfoliativo AD: Autosomico Dominante AR: Autosomico Recessivo 213

OtticaFisiopatologica® fatto che i tessuti oculari - quali iride, sclera e trabecolato – la esprimano in grande quantità, ne lascia supporre un ruolo importante in questo contesto. Tuttavia, la perdita della funzionalità della proteina, o la mancanza totale di uno dei due alleli non sembra causare glaucoma, in quanto si sono trovati individui perfettamente normali che esprimevano una di queste condizioni. Inoltre, individui portatori omozigoti di mutazioni autosomiche dominanti sul gene della miocilina non presentano sintomi di glaucoma. Infine, l'aumento di espressione della miocilina induce in alcuni casi apoptosi nelle cellule di trabecolato in vitro, ma non ha alcun effetto sulla IOP o sulla induzione di glaucoma in topi transgenici. Tutti questi dati suggeriscono che la miocilina non sia necessaria alla normale omeostasi per il mantenimento di una IOP normale, e perciò non tanto una perdita di funzione, quanto l'espressione di particolari mutazioni potrebbero essere legate alla patogenesi del glaucoma. Esperimenti in vitro hanno infatti mostrato che alcune forme mutanti della miocilina formano aggregati insolubili che non vengono secreti e si accumulano intracellularmente. Questo accumulo potrebbe indurre morte cellulare per apoptosi, e particolarmente nelle cellule del trabecolato, che si sono mostrate più sensibili a questo tipo di evento. Di particolare interesse è anche un polimorfismo (mt1: -1000 C/G) trovato nella regione del promotore del gene della miocilina. Questo polimorfismo è presente in circa il 15% degli individui di razza caucasica e sembra correlare con una maggior velocità di progressione della malattia, dimostrabile sia a livello del campo visivo che del nervo ottico dopo almeno 8 anni di osservazione retrospettiva. Il polimorfismo mt1 infatti non correla con la gravità della malattia valutata in un determinato momento (ragion per cui altri studi non hanno trovato associazione tra mt1 e severità del glaucoma), ma ha solo un valore prognostico in quanto suggerisce una predisposizione ad un decorso più infausto della patologia. Tuttavia, esiste in letteratura un solo studio pubblicato che dimostra in retrospettiva questa associazione tra mt1 e progressione del glaucoma, effettuato su un numero esiguo di pazienti (142 soggetti con POAG, di cui 20 positivi per mt1) osservati per un periodo di tempo di almeno 10 anni. Il gene dell'optineurina (GLC1E) è espresso in diversi tessuti oculari, tra cui trabecolato, epitelio ciliare non pigmentato e retina. La proteina è anche espressa in diversi altri tessuti dell'organismo, quali cervello, fegato, cuore, muscolo scheletrico, rene e pancreas. L'optineurina sembra essere coinvolta in malattie neurodegenerative come la corea di Huntington, e potrebbe avere un ruolo nel controllare la cascata dell'apoptosi attraverso la via che coinvolge il TNF α . Due mutazioni sono state identificate nel gene dell'optineurina che correlano con la presenza di glaucoma, e presumibilmente potrebbero giocare un ruolo, sia pur minore, nel glaucoma normotensivo (NTG) e in quello giovanile (JOAG). In particolare, la mutazione E50K sembra essere correlata con una progressione più veloce della malattia in individui affetti da NTG.

Inoltre, l'associazione di un'altra particolare mutazione, normalmente silente (L41L) con la mutazione Gln368Stop della miocilina sembra anche predisporre ad una Ruolo della Genetica Anno quindicesimo dicembre 2010 214 peggior prognosi gli individui affetti. Più recentemente un nuovo gene, WDR36 (GLC1G), è stato descritto sul cromosoma 5, che risulta essere mutato (diverse mutazioni sono state riportate finora) in pazienti con POAG (sia HTG che NTG), ma non in soggetti normali. Il gene è espresso in molti tessuti dell'occhio, ed è quindi un buon candidato per essere un nuovo fattore che può contribuire allo sviluppo e/o progressione del glaucoma. Il significato dell'espressione di questo gene nell'occhio non è ancora noto. Abbiamo recentemente pubblicato la nostra esperienza nella popolazione italiana confermando che le variazioni di sequenza in esso presenti sono raramente causa di malattia nelle famiglie affette da glaucoma primario ad angolo aperto. Data però la natura multigenica e complessa del glaucoma, è presumibile che, oltre ai geni direttamente coinvolti nella eziopatogenesi, ve ne siano ancora altri il

cui effetto è quello di influire sull'andamento e quindi sulla gravità del decorso della malattia stessa. Il gene APOE è un gene che codifica per una proteina, la apolipoproteina-E, che svolge un ruolo essenziale nel metabolismo lipidico. La apolipoproteina-E è la principale apolipoproteina del SNC, dove è prodotta sia da neuroni, che cellule gliali e macrofagi. Il gene APOE è stato coinvolto nella degenerazione neuronale che si verifica nella malattia di Alzheimer, la quale mostra una associazione clinica con il glaucoma. Si è perciò ipotizzato che polimorfismi del gene APOE potrebbero contribuire anche alla malattia glaucomatosa. Esistono però fino ad ora evidenze controverse sia per il coinvolgimento di polimorfismi nelle regioni trascritte del gene, che per quelli a livello della regione del promotore. Più recentemente, è stato descritto che due polimorfismi a livello della regione del promotore del gene APOE, e in precedenza già associati alla malattia di Alzheimer, potrebbero intervenire nel POAG, probabilmente in concomitanza con alterazioni del gene della miocilina. La mutazione del gene OPA1 è legata all'insorgenza dell'Atrofia Ottica Autosomica Dominante (ADOA, Autosomal Dominant Optic Neuropathy), che è la più comune atrofia ottica ereditaria ma è stata anche messa in relazione all'insorgenza del glaucoma normotensivo. Nel 25%-70% dei casi di ADOA, infatti si ha una mutazione del gene OPA1, mentre la letteratura suggerisce come due polimorfismi (l'IVS8+4C>T e il VS8+32T>C) all'interno del gene OPA1 siano associati allo sviluppo del NTG nella popolazione Caucasica; al contrario nessun legame tra il polimorfismo dell'OPA1 e l'NTG sembra essere stato riscontrato nelle popolazioni AfroCaraibiche e Coreane con NTG. Anche in questo caso il nostro gruppo ha recentemente realizzato uno studio sulla popolazione italiana confermando come differenti siano le ipotesi genetiche che possano favorire l'insorgenza del glaucoma nelle diverse popolazioni studiate. Un altro gene, sicuramente responsabile del glaucoma congenito quando mutato, e probabilmente coinvolto anche in altre forme di POAG, è il CYP1B1, che esprime, anche in diversi tessuti oculari, incluso il trabecolato, una proteina (ossidoreduttasi) appartenente alla classe del citocromo P450, presente a livello mitocondriale e del reticolo endoplasmico, e coinvolta Ruolo della Genetica 215

OtticaFisiopatologica® principalmente nella idrossilazione dell'estradiolo-17 β . Mutazioni e polimorfismi a livello di questa proteina potrebbero contribuire, in associazione a mutazioni e polimorfismi sul gene della miocilina, allo sviluppo e progressione della malattia glaucomatosa. Vincent e coll nel 2002 scoprirono un potenziale effetto modificatore sul MYOC del gene CYP1B1. Individui con mutazione in ambedue i geni sviluppavano il POAG ad una età molto inferiore (media: 27 anni) rispetto ai membri della famiglia con la mutazione presente solo nel gene MYOC (media: 51 anni). Questo lavoro afferma l'eredità digenica del glaucoma ad insorgenza precoce; infatti enfatizza l'eterogeneità e complessità genetica che sta dietro alla patogenesi del glaucoma.

Il glaucoma pseudoesfoliativo è la complicanza oculare più importante di una malattia sistemica complessa caratterizzata da un'alterazione della matrice extracellulare associata ad una produzione eccessiva e ad un progressivo accumulo di materiale fibrillare extracellulare nei tessuti la quale va sotto il nome di sindrome pseudoesfoliativa (PEX). La PEX è presente in numerose aree geografiche (Europa, Giappone, India ecc.) ed il numero di persone affette nel mondo è stimato tra i 60 e i 100 milioni. È una patologia prevalentemente dell'anziano, è estremamente rara al di sotto dei 40 anni e la probabilità di sviluppare glaucoma in occhi con PEX è del 40% in 10 anni. Le caratteristiche del glaucoma secondario a PEX sono la pressione intraoculare che appare particolarmente elevata, con oscillazioni di pressione particolarmente ampie e picchi ipertensivi alti, inoltre l'incremento della pigmentazione a livello dell'angolo camerulare, tutti elementi questi che determinano solitamente una rapida progressione della malattia e una scarsa risposta alla terapia medica. Il gene LOXL1 (15q24-q25) conferisce particolare suscettibilità allo sviluppo del fenotipo esfoliativo, in quanto implicato nella formazione del collagene e del tessuto elastico e nell'omeostasi della matrice extracellulare; inoltre, LOXL1 è espresso a livello di numerosi tessuti oculari, come la lamina cribrosa, l'epitelio lenticolare, la cornea, il muscolo ciliare, e il trabecolato; tutti tessuti coinvolti nella produzione di matrice extracellulare anomala. Il prodotto del gene LOXL1 è un membro della famiglia delle lisil-ossidasi, enzimi che catalizzano la deaminazione ossidativa dei residui di lisina della tropoelastina e il relativo cross-linking tra le varie molecole. L'apporto della genetica è per ora, come abbiamo visto, limitato all'individuazione di pochi geni, ma riserva per il futuro grandi potenzialità che potranno, se realizzate, riscrivere la nosografia e la tassonomia del glaucoma. Bibliografia - Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ, The genetics of primary open-angle glaucoma: A review. Exp Eye Res 88(4):837-844, 2009 - Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. Hum

Mol Genet 14: 725-33, 2005 - Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. Science 317(5843): 1397-1400, 2007 - Vincent AL, Billingsley G, Buys Y, Levin AV, Priston M, Trope G, Williams-Lyn D, Heon E. Digenic Inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. Am J Hum Genet 70: 448-460, 2002 Ruolo della Genetica