

# Malattie retiniche ereditarie e nuovi approcci molecolari

Prof. Pier Paolo Piccaluga  
Università di Bologna



# DNA: la molecola della vita

- L'acido desossiribonucleico (DNA) è un acido nucleico, presente nel nucleo delle cellule, che contiene le informazioni genetiche indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento degli organismi viventi
- Il **DNA** contiene il patrimonio ereditario di ogni organismo, scritto in un linguaggio particolare chiamato codice genetico
- L'**RNA** rappresenta il tramite attraverso cui le istruzioni del DNA si traducono in **proteine**
- **Tutte queste molecole** rivestono un'importanza fondamentale per lo svolgimento di tutte le attività alla base dei processi vitali

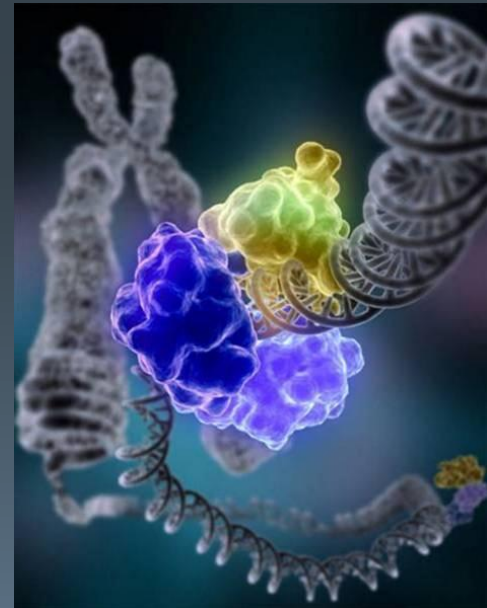
# Il Gene



- Il **gene** è l'unità ereditaria fondamentale degli organismi viventi
- I geni corrispondono a porzioni di codice genetico localizzate in precise posizioni all'interno della sequenza di DNA e contengono tutte le informazioni necessarie per la produzione di una proteina
- Essi sono contenuti ed organizzati all'interno dei cromosomi, presenti in tutte le cellule di un organismo
- un gene **controlla un carattere**, contiene l'informazione per quel carattere
- un gene **copia o riproduce la propria informazione**, prima di ogni divisione cellulare avviene la duplicazione del materiale cromosomico e poiché i geni si trovano all'interno del cromosoma si duplicano e copiano l'informazione che contengono
- un gene **esprime la propria informazione**, l'informazione genetica si esprime nei caratteri

# Mutazioni, geni e malattia

- Ogni singolo cambiamento nella sequenza del DNA costituisce una mutazione e può causare una conseguente alterazione nell'espressione e/o nel funzionamento di una proteina che può essere responsabile del manifestarsi di una malattia
- È stato calcolato che le alterazioni dei nostri geni sono responsabili di circa 5000 malattie ereditarie.
- Malattia genetica: una qualsiasi malattia che implica una mutazione genomica, cromosomica o genetica. Se questa è trasmessa alla prole si parla di malattia ereditaria.
- Altre mutazioni, anziché evidenziarsi in maniera diretta come malattia, possono causare una predisposizione ad esse.



# Riepilogando: cos'è il Genoma?

- Il genoma è l'insieme di tutte le informazioni genetiche depositate nella sequenza del DNA contenuto nel nucleo delle cellule sotto forma di cromosomi
- Nel genoma risiedono i geni, cioè le sequenze in cui risiede l'informazione genetica per la sintesi delle proteine, che stabiliscono le caratteristiche peculiari di ogni individuo
- Si stima che nel genoma umano siano presenti circa 50000 geni
- La sequenza del DNA risulta dalla disposizione lineare di quattro molecole differenti, i nucleotidi o basi
- A ogni tripletta di nucleotidi corrisponde una determinata informazione per la sintesi delle proteine, i macchinari che eseguono tutte le funzioni fondamentali delle cellule
- Se una di queste lettere cambia, subisce cioè una mutazione, l'informazione genetica può risultare alterata e le proteine potrebbero non venire più prodotte in modo funzionale causando lo sviluppo di una malattia genetica

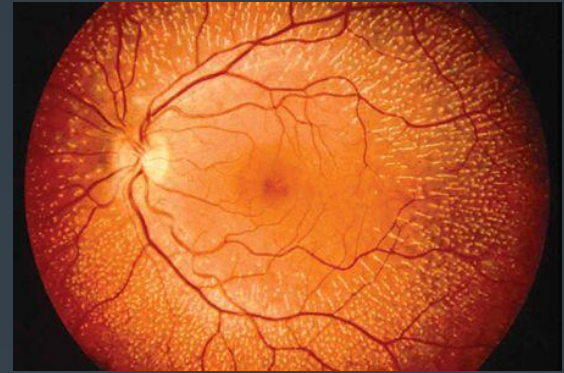
# Analisi del DNA: leggere oggi il DNA completo dell'uomo a fini diagnostici e terapeutici

- L'analisi del DNA permette l'acquisizione di informazioni utili per individuare l'eventuale implicazione di alterazioni nella sequenza del DNA nello sviluppo di patologie genetiche e per comprendere le basi genetiche dell'evoluzione e del funzionamento dell'organismo umano
- Il sequenziamento consiste nell'individuare e ordinare tutti i nucleotidi che costituiscono il nostro patrimonio genetico così come sono posizionati nel genoma
- Sequenziare vuol dire quindi leggere l'ordine in cui sono disposte lungo il DNA le basi, cioè le lettere del codice genetico
- Il sequenziamento costituisce una tappa fondamentale per la comprensione del ruolo delle varie parti del genoma umano, è un trampolino di partenza per decodificare il nostro patrimonio genetico



## Test molecolari per identificare le malattie

- Nel caso delle malattie rare l'identificazione di una mutazione porta alla certezza di una malattia
- Più rapida ed efficace sarà la lettura del genoma, prima si arriverà a comprendere i geni responsabili di alcune patologie, con la possibilità di arrivare a diagnosi rapide e allo sviluppo di una medicina personalizzata, fatta anche di farmaci intelligenti studiati per la malattia e l'individuo



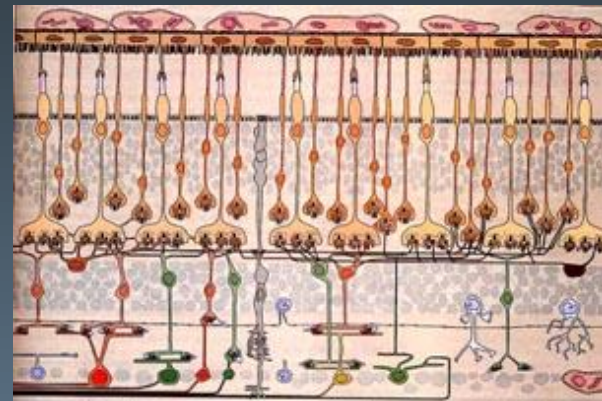
# Malattie retiniche ereditarie

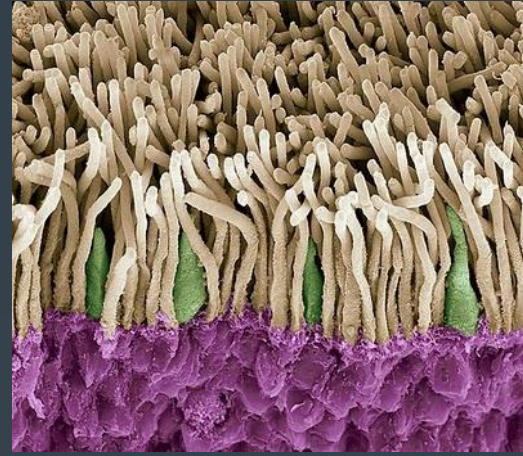
- Le malattie ereditarie della retina colpiscono circa 1 su 2,000 individui, più di 2 milioni di persone nel mondo
- In alcuni gruppi di pazienti la malattia può essere stazionaria e lieve (cecità notturna stazionaria congenita, acromatopsia)
- Altri disordini sono progressivi come la retinite pigmentosa
- Negli ultimi 20 anni la conoscenza delle basi molecolari delle malattie retiniche ha avuto un importante sviluppo
- La ricerca ha permesso di migliorare la valutazione diagnostica tramite l'uso di nuovi test genetici
- L'introduzione di tecnologie avanzate ha cambiato l'approccio allo studio delle malattie genetiche



# Malattie retiniche ereditarie

- Le malattie retiniche ereditarie sono causate da mutazioni del DNA ed in particolare di geni che codificano per proteine coinvolte nel processo che determina la trasformazione di impulsi luminosi in segnali nervosi.
- Questo fa sì che le proteine non funzionino regolarmente ed il metabolismo della cellula retinica ne sia alterato. La conseguenza di ciò è che le cellule programmate per durare molti anni muoiono prima.

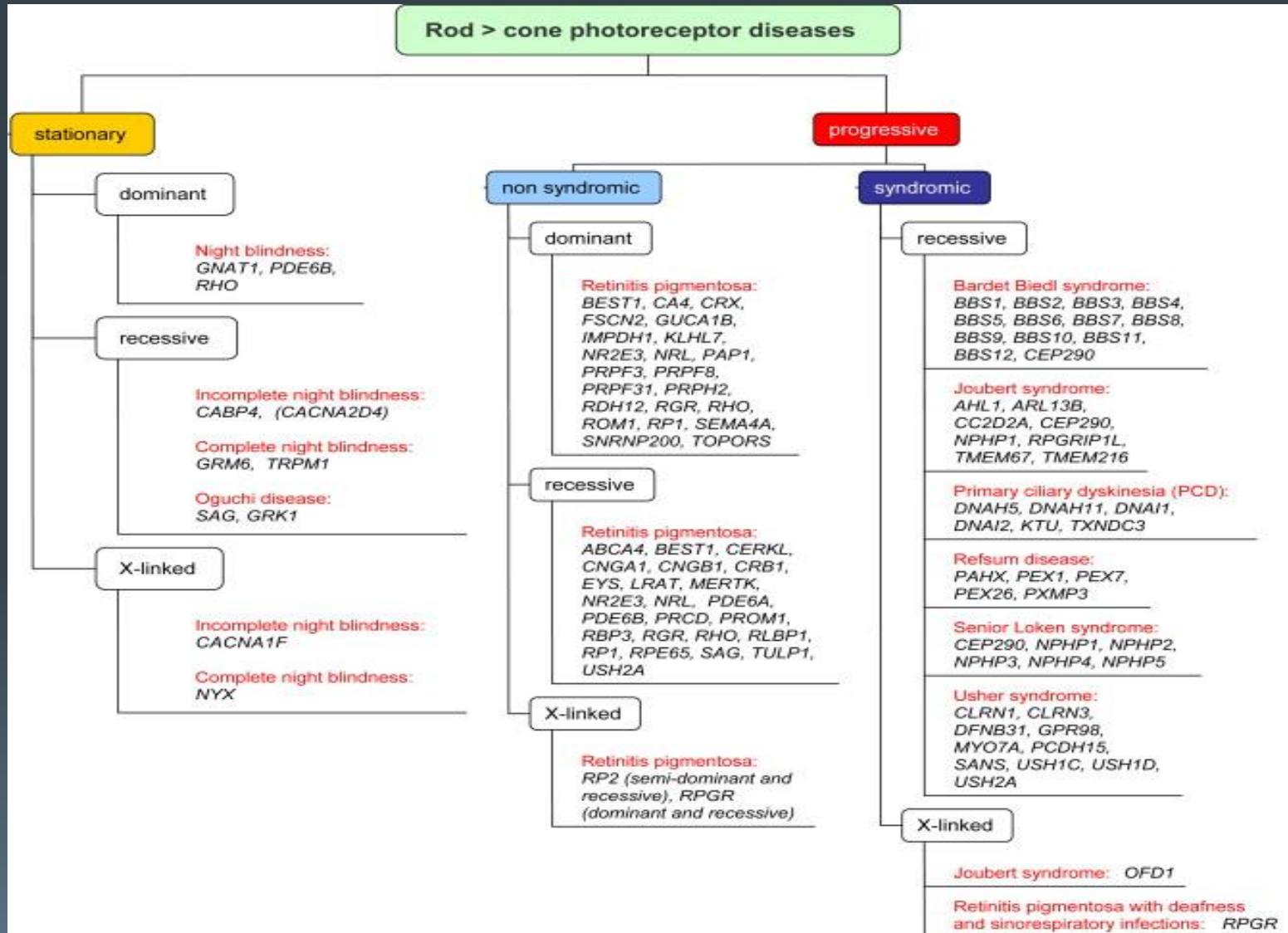




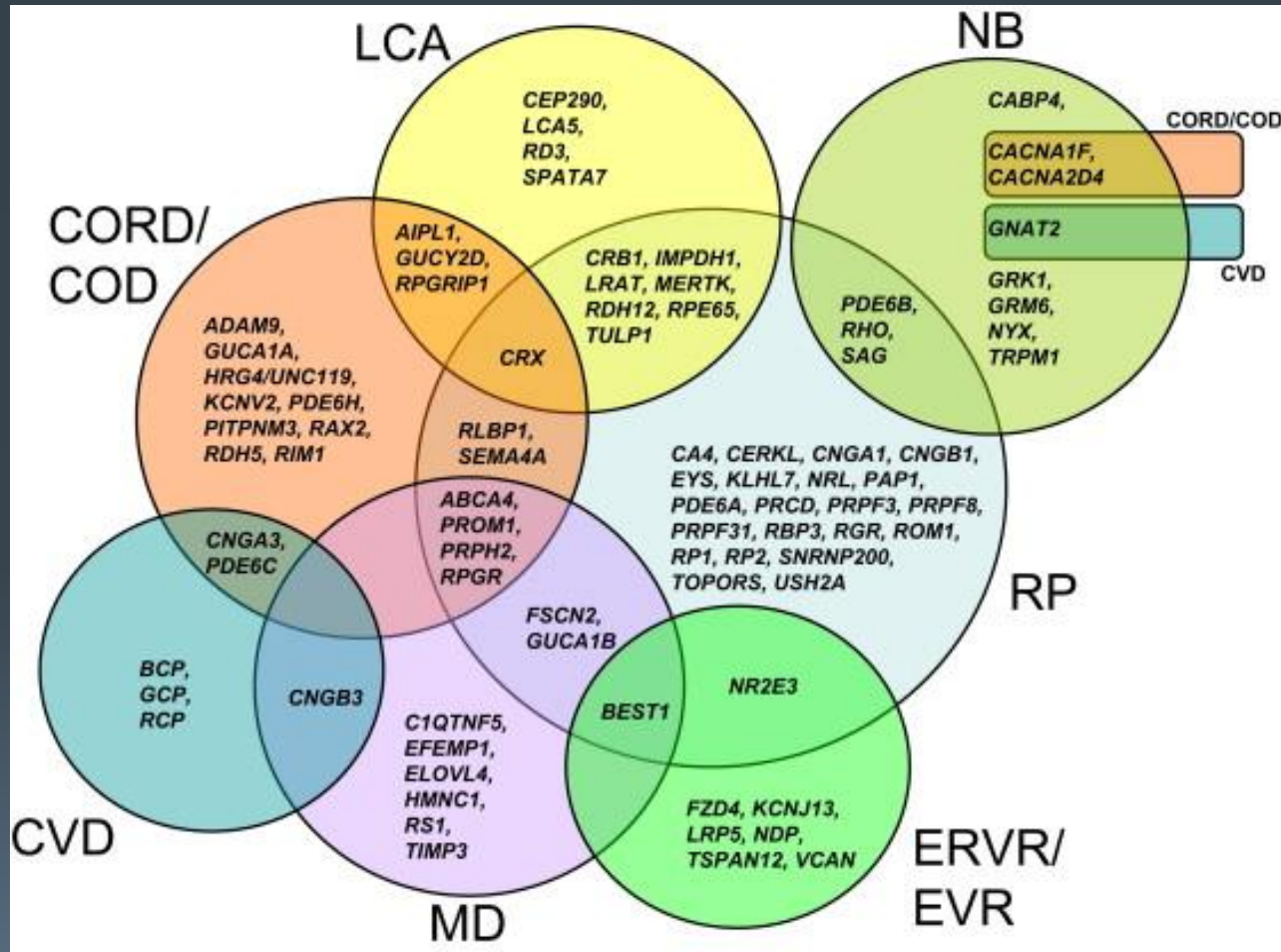
# Malattie retiniche ereditarie

- L'eterogeneità dei disordini retinici ereditari si riflette nell'elevato numero di geni mutati correlati
- Più di 150 geni responsabili sono stati identificati come responsabili (<http://sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm>)
- Ad oggi non è stato ancora possibile identificare mutazioni geniche responsabili della malattia in un significativo numero di pazienti

# Mutazioni e disordini retinici ereditari



# Mutazioni e disordini retinici ereditari



RP: Retinitis Pigmentosa  
 LCA: Leber Congenital Amaurosis  
 NB: Night Blindness  
 CORD/COD: Cone rod and cone Dystrophies  
 CVD: Colour Vision Defects  
 MD: Macular Degeneration  
 ERVR/EVR: Erosive and exudative vitreoretinopathies

## Malattie retiniche e vitreoretiniche non sindromiche

### Malattie dei bastoncelli

Congenital stationary night blindness

Retinite pigmentosa

### Malattie dei coni e dei bastoncelli

Disfunzioni stazionarie dei coni

Degenerazioni maculari ( monogeniche e age-related)

### Malattie generalizzate dei fotorecettori

Amaurosi congenita di Leber (LCA)

Coroideremia

Atrofia girata della coroide e della retina

### Vireoretinopatie

Vireoretinopatie erosive

Vitreoretinopatie essudative

## Malattie retiniche sindromiche

Sindrome di Usher

Sindrome di Bardet Biedl

Malattia di Refsum

Sindrome di Joubert

Sindrome di Alagille (ALGS)

Sindrome di Alstrom (ALMS)

Lipofuscinosi ceroide neuronale (NCL)

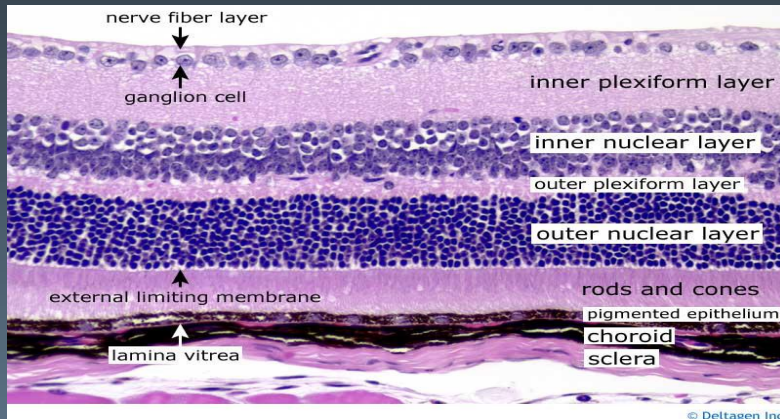
Discinesia ciliare primaria (PCD)

Sindrome di Stickler

Sindrome di Senior Loken

# Tecniche molecolari in patologia oculare

- Conoscere la patogenesi delle malattie
- Diagnosi
- Prognosi
- Terapia mirata

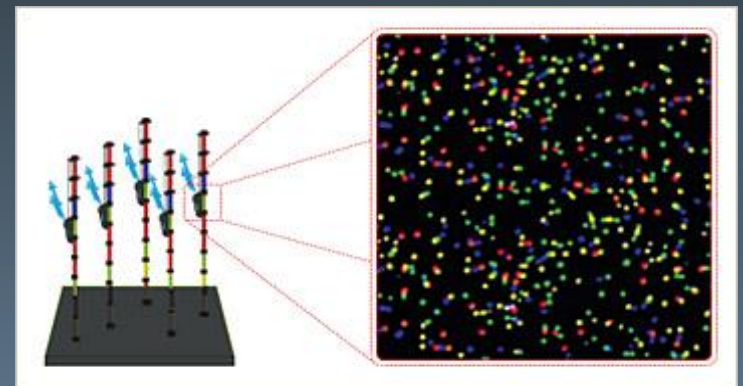
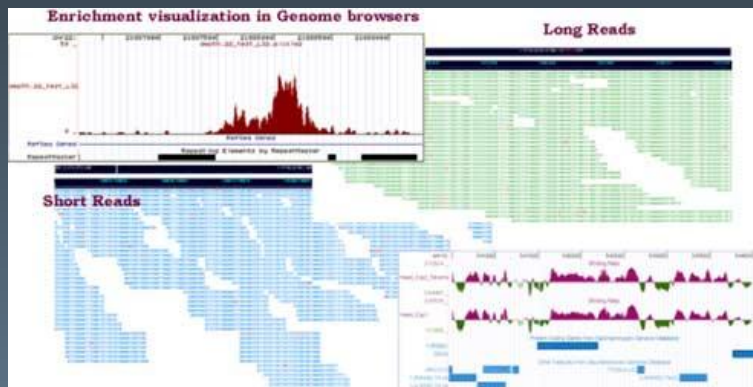
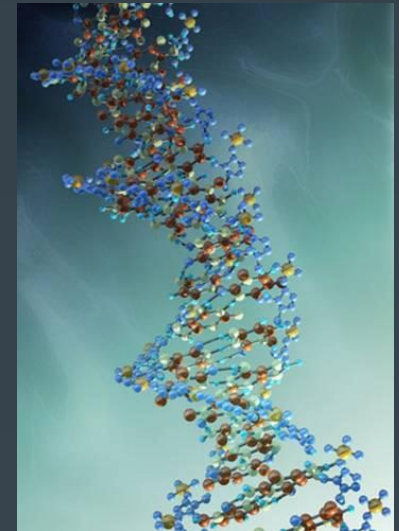


# Tecniche molecolari in patologia oculare

- La diagnosi molecolare dei disordini retinici è basata sull'analisi del DNA
- Diversi metodi possono essere usati per l'identificazione del difetto genetico:
  - Il **Sanger sequencing** è il gold-standard nel determinare il gene mutato, ma a causa dell'eterogeneità di questi disordini è costoso e richiede tempi lunghi
  - Alcuni **kit di microarrays** in commercio permettono di identificare soltanto i geni conosciuti in base al pattern di ereditarietà
  - Gli **SNP microarrays** sono tools utili per l'analisi di linkage
  - Il **Next-generation sequencing** (sequenziamento di nuova generazione) permette di identificare nuove mutazioni, oltre a quelle già note, in tempi brevi e a costi ridotti

# Next-generation sequencing: dalla ricerca di base alla diagnostica

- Ricerca: sequenziamento del genoma, scoperta di nuovi geni implicati nella patogenesi della malattia, identificazione di eventuali target terapeutici
- Diagnosi ad alta processività: diagnosi molecolare di patologie con elevata eterogeneità genetica con costi e tempi ridotti





RESEARCH

Open Access

## Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases

Isabelle Audo<sup>1,2,3,4,5\*</sup>, Kinga M Bujakowska<sup>1,2,3</sup>, Thierry Léveillard<sup>1,2,3</sup>, Saddek Mohand-Said<sup>1,2,3,4</sup>,  
Maric-Elise Lancelot<sup>1,2,3</sup>, Aurore Germain<sup>1,2,3</sup>, Aline Antonio<sup>1,2,3,4</sup>, Christelle Michiels<sup>1,2,3</sup>, Jean-Paul Saraiva<sup>6</sup>,  
Mélanie Letexier<sup>6</sup>, José-Alain Sahel<sup>1,2,3,4,7,8</sup>, Shomi S Bhattacharya<sup>1,2,3,5,9</sup> and Christina Zeitz<sup>1,2,3\*</sup>

GENETICS IN MEDICINE | ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Next-generation sequencing in health-care delivery: lessons from the functional analysis of rhodopsin

Wayne I.L. Davies MA, PhD Susan M. Downes FRCOphth, MD Josephine K. Fu BSc Morag E. Shanks PhD Richard R. Copley BA, DPhil Stefanie Liss PhD Simon C. Ramsden PhD Graeme C. M. Black FRCOphth, DPhil Kate Gibson BSc Russell G. Foster BSc, PhD Mark W. Hankins PhD Andrea H. Németh FRCP, DPhil

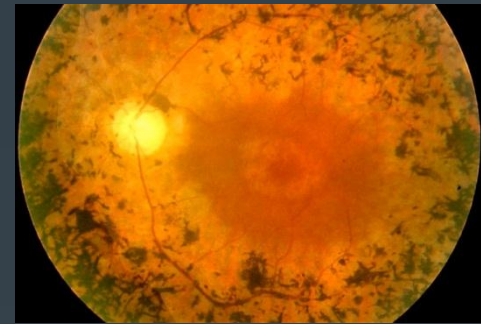
RESEARCH ARTICLE

Human Mutation

## Next-Generation Genetic Testing for Retinitis Pigmentosa



Kornelia Neveling,<sup>1,4</sup> Rob W.J. Collin,<sup>1-3</sup> Christian Gilissen,<sup>1,3,4</sup> Ramon A.C. van Huet,<sup>2</sup> Linda Visser,<sup>5</sup> Michael P. Kwint,<sup>1</sup> Sabine J. Gijsen,<sup>1</sup> Marijke N. Zonneveld,<sup>1</sup> Nienke Wieskamp,<sup>1</sup> Joep de Ligt,<sup>1,3,4</sup> Anna M. Siemiatkowska,<sup>1</sup> Lies H. Hoefsloot,<sup>1,4</sup> Michael F. Buckley,<sup>1</sup> Ulrich Kellner,<sup>6</sup> Kari E. Branham,<sup>7</sup> Anneke I. den Hollander,<sup>1-4</sup> Alexander Heischen,<sup>1,3,4</sup> Carel Hoyng,<sup>2,4</sup> B. Jeroen Klevering,<sup>2,4</sup> L. Ingeborgh van den Born,<sup>5</sup> Joris A. Veltman,<sup>1,3,4†</sup> Frans P.M. Cremers,<sup>1,3†</sup> and Hans Scheffer<sup>1,4†\*</sup>



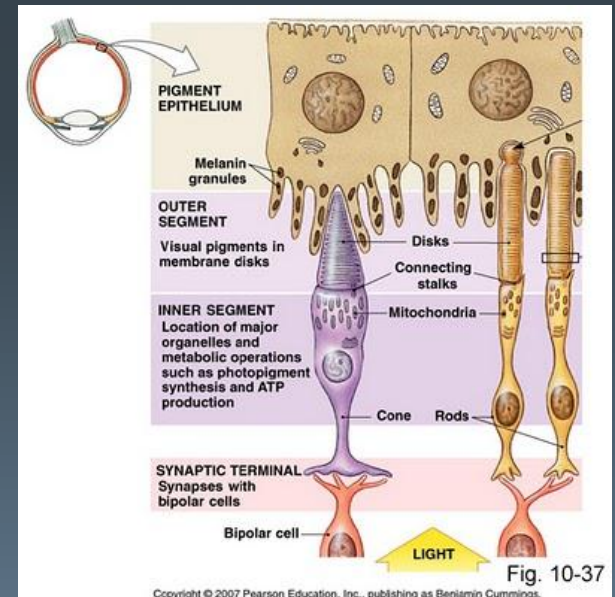
# La Retinite Pigmentosa

- Retinite pigmentosa (RP) è la denominazione applicata ad un gruppo di malattie ereditarie della retina, che è il tessuto sensibile alla luce dell'interno dell'occhio preposto alla ricezione dello stimolo luminoso e alla sua trasformazione in stimolo elettrico.
- La prevalenza è di circa 1:3500 individui (Hartong et al., 2006)
- Comprende un gruppo geneticamente eterogeneo di malattie ereditarie della retina con un simile fenotipo clinico
- Da un punto di vista cellulare, la malattia interessa il sistema dei fotorecettori, bastoncelli e coni responsabili della visione
- Morfologicamente la RP mostra una riduzione dello spessore dello strato nucleare esterno della retina e depositi di pigmento nel fondo oculare

# Genetica e Patologia molecolare della Retinite pigmentosa

- Più di 50 geni sono associati alla RP
- Le forme familiari possono avere una trasmissione autosomica dominante (30-40%), recessiva (50-60%) o X-linked (5-20%)
- Le funzioni dei diversi geni RP-associati possono essere raggruppati in 5 categorie:

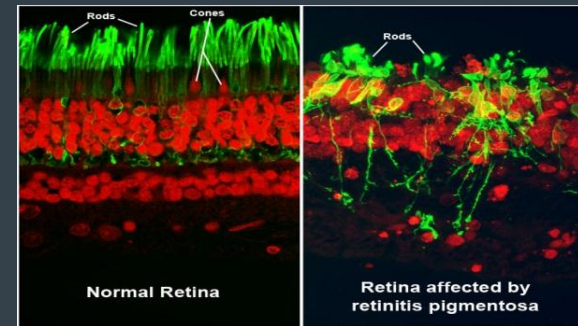
- Fototrasduzione
- Metabolismo retinico
- Sviluppo tissutale
- Struttura cellulare
- Splicing





# Genetica e Patologia molecolare della Retinite pigmentosa

- I geni che sono stati caratterizzati codificano per proteine importanti nella visione
- Le alterazioni più frequenti (presenti in circa il **10%** dei pazienti) riguardano il gene della **rodopsina** (il pigmento visivo che permette il funzionamento dei bastoncelli dell'occhio) localizzato sul cromosoma 3
- Un altro gene che risulta alterato in alcuni casi di RP è quello della **periferina**, (un'altra proteina importante per la visione) situato sul cromosoma 6
- Altre forme sono state associate ad alterazioni presenti nel **cromosoma X**



# La sindrome di Usher

- Questo disordine coinvolge non solo la retina, ma anche l'orecchio interno
- E' caratterizzata da RP e compromissione neurosensoriale uditiva
- Clinicamente si presenta in 3 sottotipi
- Il sottotipo 1 rappresenta la forma più severa con sordomutismo e RP precoce
- Trasmissione prevalentemente autosomica recessiva
- Rappresenta il 10-30% dei casi di RP autosomica recessiva
- I geni prevalentemente colpiti sono MYO7A e USH2A

A colorful DNA double helix structure is shown against a light blue background. The two strands are intertwined, with one strand appearing more purple and the other more yellow/green. The text is overlaid on the right side of the image.

## In conclusione...

**Il test genetico permette di identificare il gene responsabile della malattia, consentendo una diagnosi di certezza.**

**In un futuro prossimo tali informazioni genetiche potrebbero garantire un approccio terapeutico personalizzato.**

