VALUTAZIONE DELLE ASSOCIAZIONI TRA POLIMORFISMI DEL GENE OPA 1 E GLAUCOMA NORMOTENSIVO IN ITALIA

Paolo FREZZOTTI[1A], Alessandra RUFA[1B], Ilaria MOTOLESE[3], Michele IESTER[2], Gian Nicola GALLUS[1B], Elena CARDAIOLI[1B], Simone Alex BAGAGLIA[1A], Pietro MITTICA[1A], Cristina MENICACCI[1A], Dario TURCO[1A], Antonio FEDERICO[1B], Eduardo MOTOLESE[1A]

[A]Unità Operativa Complessa di Oftalmologia, [B]Unità Operativa Complessa di Neurologia
[1]Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena
[2]Clinica Oculistica DINOG, Università di Genova, Genova
[3]Dottorato in Patologie dell'Invecchiamento Università degli Studi di Genova, Genova

ABSTRACT

Purpose: To assess the influence and frequency of OPA1 polymorphisms in normal tension glaucoma (NTG) patients.
Methods: Eighteen patients with a previous diagnosis of NTG were enrolled in the study. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Analysis of the OPA1 gene included exons 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 27 and 28 (GTPase domain and coiled-coil domain), which are known to be associated with increased risk of pathogenic mutations.
Results: A new OPA1 mutation (a 3-bp in-frame deletion, c.2771_2773 of AGA) was found in exon 27 of two patients. The following intronic polymorphisms were found in our cohort: IVS8+4T>C (17); IVS8+32T>C (11); 1177A>C (R393R); IVS14+23G>A.
Conclusions: Recent reports show a significant association between OPA1 IVS 8+4 and 8+32 T/C polymorphisms and NTG. Our results do not confirm this association but indicate a new pathogenic mutation of the OPA1 gene in a patient with clinical NTG.

Ottica fisiopat 2013; XVIII: 103-109

INTRODUZIONE

Il glaucoma è la seconda causa di cecità irreversibile nel mondo[1,2] ed è caratterizzato da una progressiva escavazione del disco ottico, una perdita di cellule ganglionari retiniche e alterazioni tipiche al campo visivo.
La principale forma di glaucoma nella popolazione caucasica e afro-caraibica è il glaucoma ad angolo aperto (POAG), per la quale la pressione intraoculare (IOP) rappresenta il suo più importante fattore di rischio.
Il glaucoma normotensivo (NTG), nel quale la IOP non supera i 21 mmHg è una forma di POAG che secondo alcuni autori rappresenta circa un terzo dei casi[3-6].
Il glaucoma primario ad angolo aperto ed il glaucoma normotensivo sono malattie geneticamente eterogenee. Finora almeno tre geni [myocilin (MYOC), optineurin (OPTN) and WDR36][7-9] e quattro loci cromosomici sono implicati nella genetica del POAG[10-13].
Due polimorfismi del gene OPA1, IVS8+4C>T e IVS8+32T>C, sono spesso stati riportati in associazione con il glaucoma normotensivo nella popolazione caucasica[14,15], mentre nessuna associazione di polimorfismi di OPA1 con NTG è stata dimostrata nella popolazione afro-caraibica o nei pazienti coreani affetti da glaucoma normotensivo[17].
In questo studio è stato valutato se polimorfismi di singoli nucleotidi nel gene OPA1 fossero associati con NTG in una corte di pazienti italiani affetti da glaucoma normotensivo.

PAZIENTI E METODI

La popolazione studiata comprende 18 pazienti con glaucoma normotensivo (NTG) e 25 controlli sani reclutati nel Day Service Glaucoma dell'Azienda Ospedaliera

AUTORE CORRISPONDENTE
Paolo Frezzotti
Dipartimento di Chirurgia, Unità di Oftalmologia
Università di Siena
Policlinico Le Scotte
Viale Bracci 2
53100 Siena
Tel. 0577 233360
Fax 0577 271324
frezzottip@unisi.it

PAROLE CHIAVE:
glaucoma normotensivo, genetica, pressione intraoculare.
KEY WORDS:
Normal tension glaucoma, genetics, intra ocular pressure.

Universitaria Senese. Tutti i soggetti sono di razza caucasica. Lo studio, approvato dal Comitato Etico, è in linea con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato dopo che la natura dello studio è stata precedentemente spiegata loro.
Ogni soggetto è stato sottoposto ad una valutazione oftalmologica completa, comprensiva di: anamnesi; autorefrattometria; oftalmoscopia con oftalmoscopio di Javal; massima acuità visiva (BCVA); esame con lampada a fessura; misurazione della pressione intraoculare con tonometro ad applanazione di Goldmann; gonioscopia con classificazione secondo Van Herich-Shaffer[18]; misurazione dello spessore corneale centrale (CCT) ed oftalmoscopia indiretta con lente a 78 diottrie.
In aggiunta all'esame clinico, ciascun soggetto ha eseguito un campo visivo computerizzato utilizzando il programma 30-2 dell'Humphrey Field Analyzer (HFA, Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA). I soggetti che avevano eseguito l'esame perimetrico tre mesi prima dell'arruolamento hanno ripetuto un secondo campo visivo meno di sette giorni prima dell'arruolamento, insieme ai soggetti che non avevano ancora effettuato l'esame perimetrico. Il tipo di difetto perimetrico e la sua stadiazione sono stati valutati usando il sistema di stadiazione del glaucoma secondo Brusini[19].
I criteri d'inclusione dello studio per i pazienti glaucomatosi ed i controlli erano: una BCVA non inferiore a 20/40; refrazione sferica entro ± 5 D; astigmatismo entro ± 3 D; evidenza gonioscopica di angolo aperto ed un normale aspetto del disco ottico. La testa del nervo ottico è stata considerata anormale nei seguenti casi: cup/disc ratio (CDR) >0.6; incisura a "colpo d'unghia" del bordo neuronale; asimmetria verticale del CDR >0.2 nei due occhi; emorragie peripapillari; riduzione dello strato di fibre neuronali e nasalizzazione e inginocchiamento dei vasi.
I criteri di esclusione erano: storia di malattie neuro-oftalmologiche o retiniche; uveiti; pregressi trattamenti chirurgici oculari o trattamenti laser; storia di traumi oculari; malattie reumatologiche sistemiche e diabete.
I criteri d'inclusione specifici per i controlli erano: una IOP <21 mmHg in entrambi gli occhi; risultati del glaucoma hemifield test entro i limiti della norma e una deviazione media (MD) e un modello di deviazione media (PSD) entro il 95% di limite di confidenza confermato in due SAP affidabili e consecutivi. I criteri di esclusione per i controlli erano: una storia familiare di glaucoma; nessuna patologia oculare in atto o pregressa e un utilizzo a lungo termine di steroidi per via topica o sistemica.
I criteri d'inclusione per i NTG erano: una storia documentata di IOP in cartella clinica ≤ 21 mmHg durante le misurazioni diurne; due campi visivi consecutivi con un glaucoma hemifield test con valori al di fuori della norma; MD e PSD fuori dai limiti di confidenza del 95% e un gruppo di almeno 3 punti contrassegnati da simboli di probabilità corrispondenti alla significatività P<0.05 nel pattern deviation plot, uno dei quali con P<0.01 nello stesso hemifield;

il gruppo non doveva essere contiguo alla macchia cieca e non doveva attraversare la linea orizzontale.
Ai pazienti è stata richiesta un'anamnesi familiare e personale, età, sesso, razza, età alla diagnosi, albero genealogico, anamnesi farmacologica, precedente intervento chirurgico e trattamento laser, coesistenza di altre patologie sistemiche e presenza di fattori di rischio quali ipotensione arteriosa, difetti valvolari cardiaci o stenosi carotidee. Dopo un'attenta valutazione clinica, è stato prelevato a ciascun paziente un campione di 10 ml di sangue per l'analisi del DNA.

ANALISI GENETICA

L'analisi del gene OPA1 includeva gli esoni 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 27 e 28 (GTPase domain and coiled-coil domain), i quali sono noti per essere associati ad un aumentato rischio di mutazioni patogenetiche. In un paziente abbiamo riscontrato una mutazione nell'esone 27. In questo caso i 30 esoni di codifica e la regione promotrice del gene, incluse le giunzioni esone-introne, sono state amplificate e sequenziate usando direttamente primer specifici, come già documentato (Delettre et al 2001; Shimizu et al 2002; Anikster et al 2001).

Patogenetica della mutazione p.Lys924Del
Uno screening per mutazioni subsequenziali è stato effettuato con l'analisi degli eteroduplex in 400 cromosomi controllo. Il prodotto di PCR (227-bp) contenente la presunta mutazione è stato amplificato usando i seguenti nucleotidi: 5'-TTAAACAG-TTAGGCGATTAGAGAAA-3' (FW) e 5'-CAGTTCCTTGTAACTTTTCTGTA-AG-3' (RV).
Condizioni cicliche tipiche erano le seguenti: iniziale denaturazione a 95°C per 30 secondi; 37 cicli a 95°C per 10 secondi; 54°C per un minuto e 72°C per un minuto; estensione finale a 72°C per 5 minuti. Le PCR prodotte sono state analizzate in elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturato al 12% a 150 V per 3 ore. Il gel è stato fissato con bromuro di etidio e visualizzato con un transilluminatore a raggi UV.

RISULTATI

In un probando, l'analisi del gene OPA1 mostra una mutazione eterozigotica patogenetica consistente in una delezione della struttura di 3 basi, c.2771_2773delAGA, nell'esone 27, p.Lys924, risultando in una perdita di frammenti fortemente espressa nel cromosoma in questo paziente NTG (Fig. 1B) e nella sua figlia asintomatica. La mutazione era assente nei 400 cromosomi dei controlli sani (Fig. 1C).
Le analisi sequenziali hanno identificato i seguenti polimorfismi nelle sequenze degli introni codificanti e adicenti del gene OPA1 in 18 pazienti: c.IVS8+4T>C, c.IVS8+32T>C, c.IVS14+23G>A, come precedentemente descritto, e della nuova mutazione c.1177A>C (p.Arg393Arg) (Tab. 1).

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo esaminato le possibili correlazioni

fig. 1

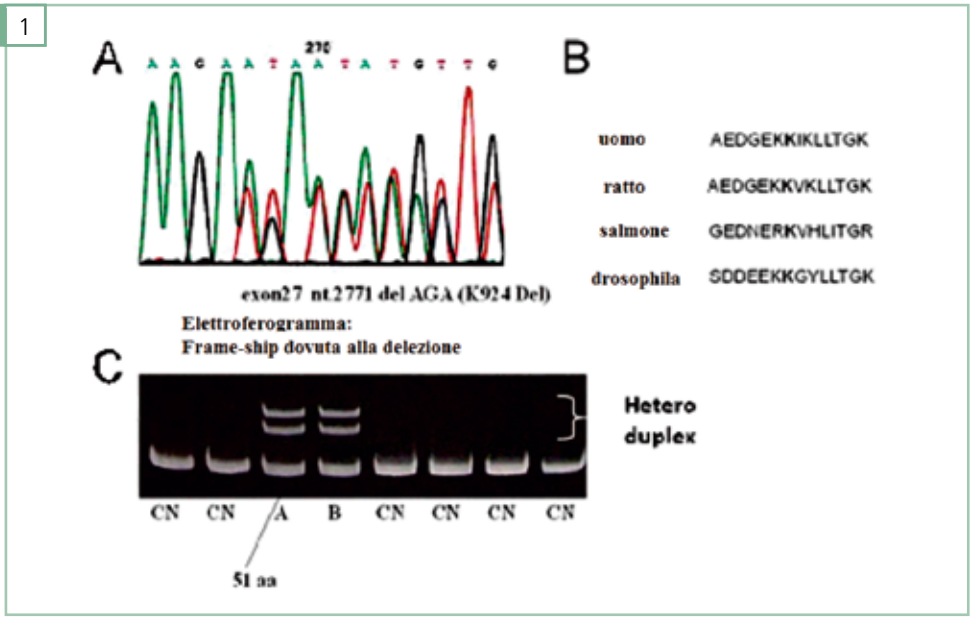

fig. 1
A) Sezione di Elettroferogramma dei pazienti che mostrano una delezione 3-bp nell'esone 27. B) Allineamento delle sequenze aminoacidiche dell'open-reading frame vicino alla posizione dell'aminoacido 924, rappresentante i peptidi ENOD40. C) Elettroforesi dei prodotti di amplificazione PCR che mostrano il wild-type allele (una singola banda) per i controlli negativi (CN) e l'allele mutato (tre bande, due delle quali eteroduplex) per il paziente con la mutazione (a) e sua figlia (b).

tra i polimorfismi del gene OPA1 e i pazienti affetti da glaucoma normotensivo nella popolazione italiana. Il gene OPA1 è implicato nelle funzioni mitocondriali e di regolazione strutturale. I mitocondri hanno un ruolo fondamentale nell'apoptosi, rilasciando il citocromo C nel citoplasma cellulare e determinando la frammentazione cellulare. Il gene OPA1 codifica la produzione di GTPasi, una proteina mitocondriale implicata nella formazione e nel mantenimento della rete mitocondriale e della sua morfologia[20]. La delezione del gene blocca la fusione mitocondriale determinando una cascata di eventi che porta ad un'importante frammentazione mitocondriale che è stato dimostrato avvenire durante il processo apoptotico[21].
Mutazioni del gene OPA1 sono associate con forme di neuropatia ottica autosomica dominante (ADOA)[21-22] in cui la presentazione clinica e l'età d'insorgenza variano notevolmente. È stato valutato che le forme cliniche di ADOA possono condividere alcune caratteristiche cliniche con il glaucoma normotensivo, nel quale una patogenesi mitocondriale è fortemente sospettata. Un recente report ha mostrato una significativa associazione tra i polimorfismi OPA1 IVS 8+4 e 8+32 T/C ed il glaucoma ad angolo aperto, indicando che questi polimorfismi aumentano il rischio di glaucoma normotensivo e non di glaucoma iperbarico[23].
Precedenti studi riportano che la frequenza di polimorfismi di OPA1 (IVS8 +4C/T and +32 CT) è più alta nei pazienti di razza caucasica rispetto ai controlli sani e che l'insieme dei genotipi IVS 8+4C/T e +32 T/C è strettamente associato al normotensivo, indicano che questi polimorfismi potrebbero essere marker di malattia[24].
L'analisi dei polimorfismi di singoli nucleotidi nei pazienti con glaucoma normotensivo e nei controlli sono riportati nella tabella 1. Poiché i dati presenti nella letteratura recente sono controversi, dato il nostro esiguo numero di casi non abbiamo sottolineato la correlazione tra i polimorfismi del gene OPA1

Tabella 1 **Frequenza dei polimorfismi di Ivs8+4C>T e Ivs8+32T>C nei pazienti normotensivi e nei controlli sani**

	CONTROLLI (n = 25)	NTG (n = 18)
Ivs8+4C>T		
Genotipo		
TT	0	3 (16.7%)
CT	15 (60%)	4 (22.2%)
CC	10 (40%)	11 (61.1%)
Allele		
T	15 (30%)	10 (27.8%)
C	35 (70%)	26 (72.2%)
Ivs8+32T>C		
Genotipo		
TT	6 (24%)	6 (33.3%)
CT	18 (72%)	10 (55.6%)
CC	1 (4%)	2 (11.1%)
Allele		
T	30 (60%)	22 (61.1%)
C	20 (40%)	14 (38.9%)

Genotipo Ivs8+4C>T Ivs8+32T>C	**CONTROLLI (n = 25)**	**NTG (n = 18)**
CC/CC	1 (4%)	1 (5.6%)
CT/CT	10 (40%)	5 (27.8%)
CC/CT	8 (32%)	6 (33.3%)
CT/TT	5 (20%)	0
CC/TT	1 (4%)	3 (16.7%)
TT/TT	0	3 (16.7%)

e il glaucoma normotensivo. In un paziente e in sua figlia asintomatica abbiamo trovato una nuova mutazione OPA1. Questo potrebbe indicare una possibile coesistenza delle due condizioni cliniche.
I nostri risultati non confermano alcuna associazione significativa. Non è ancora ben noto come possano agire tali polimorfismi. Ulteriori studi sono necessari per chiarire la funzione del gene OPA1 e gli effetti dei suoi polimorfismi sull'espressione della proteina e la sua funzione a carico della retina e della testa del nervo ottico.

RIASSUNTO

Scopo: valutare l'influenza e la frequenza dei polimorfismi nel gene OPA1 in pazienti con glaucoma normotensivo (NTG).
Metodi: diciotto pazienti con una precedente diagnosi di NTG sono stati arruolati nello studio. il DNA è stato estratto da leucociti di sangue periferico. L'analisi del gene OPA1

comprendeva gli esoni 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 27 e 28 (GTPasi dominio e dominio coiled-coil), che sono noti per essere associati con aumentato rischio di mutazioni patogene.
Risultati: è stata trovata una nuova mutazione del gene OPA1 (una 3-bp in-frame delezione, c.2771_2773 di AGA) nell'esone 27 di due pazienti. Nella nostra coorte di pazienti sono stati trovati i seguenti polimorfismi intronici: IVS8 +4 T> C (17); IVS8 +32 T> C (11); 1177A> C (R393R); IVS14 +23 G> A.
Conclusioni: studi recenti mostrano una significativa associazione tra OPA1 IVS 8 4 e 8 32 T / C polimorfismi e RTN. I nostri risultati non confermano questa associazione, ma indicano una nuova mutazione patogena del gene OPA1 in un paziente con glaucoma normotensivo.

BIBLIOGRAFIA

1) Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R et al. *Global data on blindness.* Bull World Health Organ **73**: 115-121, 1995
2) Quigley HA, *Number of people with glaucoma worldwide.* Br J Ophthalmol **80**: 389-93, 1996
3) Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukashara S, et al. *Epidemiology of glaucoma in Japan - a nationwide glaucoma survey.* Jpn J Ophthalmol **35**: 133-135, 1991
4) Sommer A, Tielsch JM, Katz J et al. *Ralationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans: The Baltimore Eye Survey.* Arch Ophthalmol **109**: 1090-1095, 1991
5) Klein BE, Klein R, Sponsel WE et al. *Prevalence of glaucoma.* The Beaver Dam Eye Study **99**: 1499-1504, 1992
6) Bonomi L, Marchini G, Marraffa M et al. *Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study.* Ophthalmology **105**: 209-253, 1998
7) Rezaie T, Child A, Hitchings R Brice G, Miller L, Coca-Pradons M, Heon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. *Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin.* Science **295**: 1077-1079, 2002
8) Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, Nishimura D, Clark AF, Nystuen A, Nichols BE, Mackey DA, Ritch R, Kalenak JW, Craven ER, Sheffield Vc. *Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma.* Science **275**: 668-670, 1997
9) Monemi S, Spaeth G, Da Silva A, Popinchalk S, Ilitchev E, Liebmann J, Ritch R, Heon E, Crick RP, Child A, Sarfarazy M. *Identification of a novel adult-onset primary open angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1.* Hum Mol Genet **14**: 725-733, 2005
10) Stolova D, Child A, Trifan OC, Crick RP, Coakes RL, Sarfarazi M. *Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region.* Genomics **36**: 142-150, 1996
11) Trifan OC, Traboulsi EI, Stoilova D, Alozie I, Nguyen R, Raja S, Sarfarazi M. *A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region.* Am J Ophthalmol **126**: 17-28, 1998
12) Wirtz MK, Samples JR, Kramer PL, Rust K, Topinka JR, Yount J, Koler RD, Acott TS. *Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q.* Am J Hum Genet **60**: 296-304, 1997
13) Wirtz MK, Samples JR, Rust K, Lie J, Nordling L, Schilling K, Ascott TS, Kramer PL. *GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36.* Arch Ophthalmol **117**: 237-241, 1999
14) Aung T, Ocaka L, Ebenezer ND, Morris AG, Krawczak M, Thiselton DL, Alexander C, Votruba M, Brice G, Child AH, Francis PJ, Hitchings RA, Lehmann OJ, Bhattacharya SS. *A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene.* Human genet **110**: 52-56, 2002
15) Powell BL, Toomes C, Scott S, Yeung A, Merchbank NJ, Spry PG, Lumb R, Ingleharn CF, Churchill AJ. *Polymorphisms in OPA1 are associated with normal tension glaucoma.* Mol Vis **9**: 460-464, 2003
16) Yao W, Jiao X, Hejtmancik JF, Leske MC, Hennis A, Nemesure B. *The Barbados Family Study Group.* Mol Vis **12**: 649-654, 2006
17) Woo SJ, Kim DM, Kim JY, Park SS, Ko HS, Yoo T. *Investigation of the association between OPA1 polymorphisms and normal-tension glaucoma in Korea.* J Glaucoma **13**: 492-495, 2004;
18) Van Herick W, Shaffer RN, Schwartz A. *Estimation of width of angle of anterior chamber. Incidence and significance of the narrow angle.* Am J Ophthalmol **68**: 626-629, 1969

19) Brusini P. *Clinical use of a new method for visual field damage classification in glaucoma.* Eur J Ophthalmol **6**: 402-407, 1996
20) Mabuchi F, Tang Sa, Kashiwagi K, Yamagata Z, Tsukahara S. *The OPA1 gene polymorphism is associated with normal tension glaucoma and high tension glaucoma.* Am J Ophthalmol **143**: 125-130, 2007
21) Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM et al. *Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.* Nat Genet **26**: 211-215, 2000
22) Alexander C, Votruba M, Pesch UE et al. *OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nat Genet **26**: 211-215, 2000
23) Man YW, Stewart JD, Hudson G et al. *OPA1 increases the risk of normal but not high tension glaucoma.* J Med Genet **47**: 120-125, 2010
24) Aung T, Okada K, Poinoosawmy D et al. *The phenotype of normal tension glaucoma patie*nts with and without OPA1 polymorphisms. Br J Ophthalmol **87**: 149-152, 2003
25) Powell B, Toomes C, Scott S, et al. *Polymorphisms in OPA1 are associated with normal tension glaucoma.* Mol Vis **9**: 460-464, 2003
26) Aung T, Ocaka L, Ebenezer ND et al. *A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene.* Hum Genet **110**: 513-514, 2002
27) Sato M, Kawase K, Yamamoto T, et al. L*ack of association between normal tension glaucoma and intron 8 polymorphisms in the gene causing autosomal dominant optic atrophy, OPA1, in Japan.* Invest Ophthalmol Vis Sci **44**: 1124, 2003
28) Kumaramanickavel G, Aung T, Sripriya S et al. *Lack of association of IVS8+4C/T and IVS8+32T/C polymorphisms in the OPA1 gene with normal tension glaucoma in patients from Singapore, India and Japan*. Invest Ophthalmol Vis Sci **46**: 3811, 2005
29) Yao WL, Jiao XD, Hejtmancik J et al. *Evaluation of the association between OPA1 polymorphisms and primary open angle glaucoma in Barbados families.* Mol Vis **12**: 649-654, 2006
30) Liu Y, Schmidt S, Qin XJ et al. *No association between OPA1 polymorphisms and primary open angle in three different populations.* Mol Vis **13**: 2137-2141, 2007