

GENÉTICA DE PATOLOGÍAS DEL DESARROLLO OCULAR

MARTA CORTON

Genética & Genómica Enfermedades raras y complejas

Lab. Genética – 4ª planta (IIS-FJD)

mcorton@fjd.es (ext. 3437)

Reunión IIS-Fundación Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD)

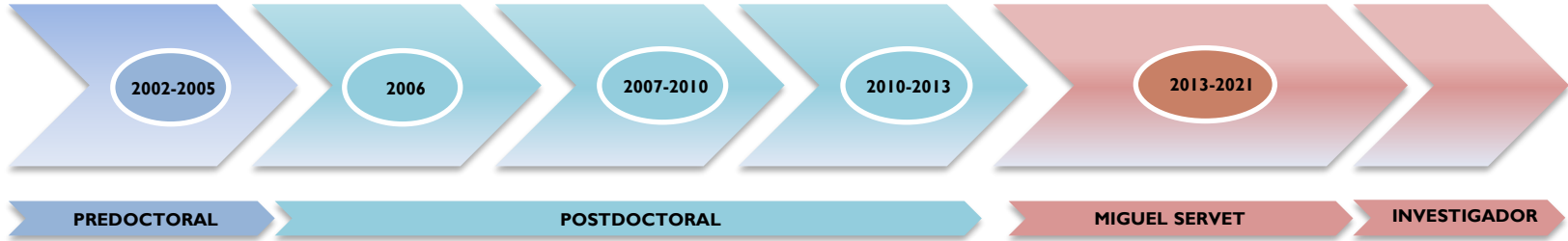
5 de Octubre de 2021

IIB "Alberto Sols"

CNIO

U. Santiago de Compostela
G. Medicina Xenómica

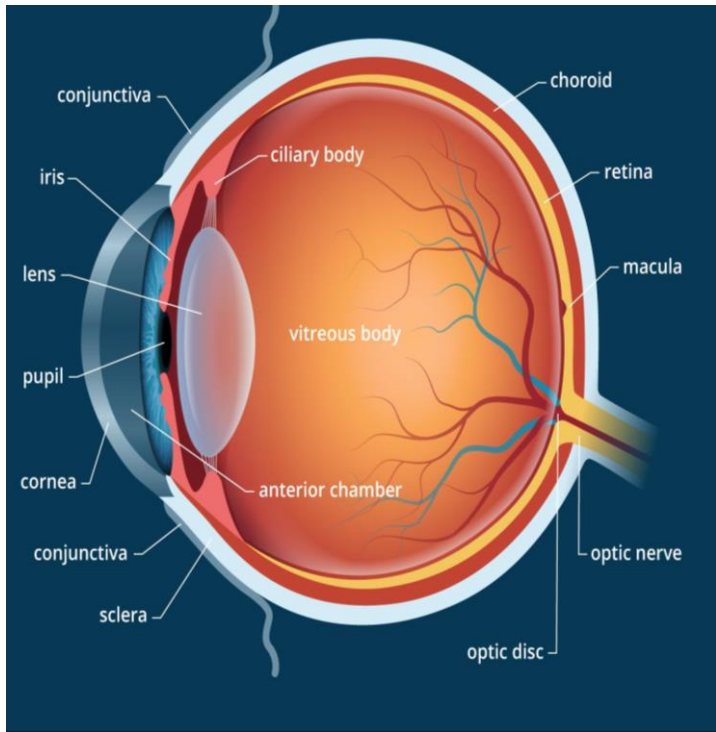
IIS-Fundación Jiménez Díaz



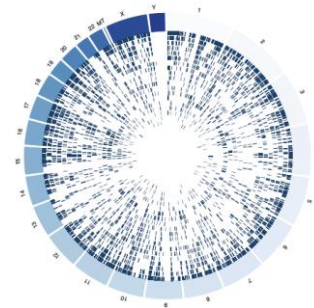
**GRUPO: GENÉTICA DE
PATOLOGÍAS
DEL DESARROLLO OCULAR**



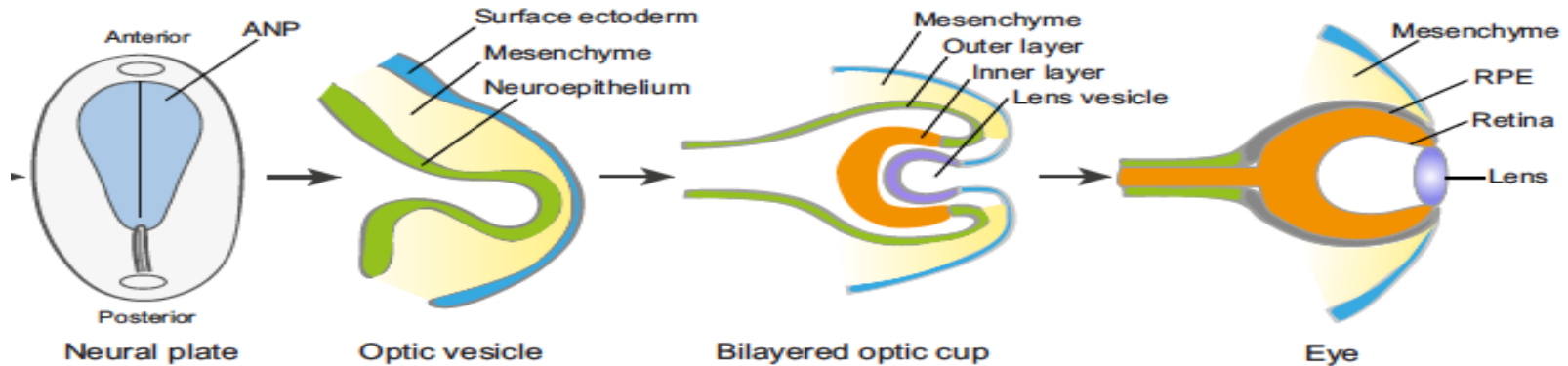
ANOMALÍAS DEL DESARROLLO OCULAR



- ✓ **Enfermedades raras** (3-4 casos / 10,000)
- ✓ **Elevada heterogeneidad clínica:** formas aisladas, panoftálmicas y sindrómicas
- ✓ **Genética:** Herencia mendeliana (AD,AR, XL), 50-60% **mutación de novo**
- ✓ **Elevada heterogeneidad genética** **>400 genes asociados**
- ✓ **Complejidad alélica:** variantes estructurales, SNVs



PROCESOS MALFORMATIVOS DURANTE EL DESARROLLO OCULAR



ANOFTALMIA

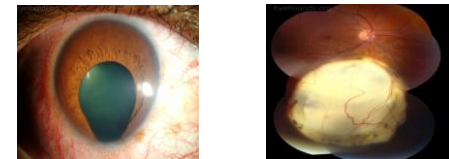


MICROFTALMIA



> 150 genes

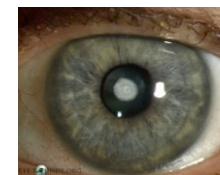
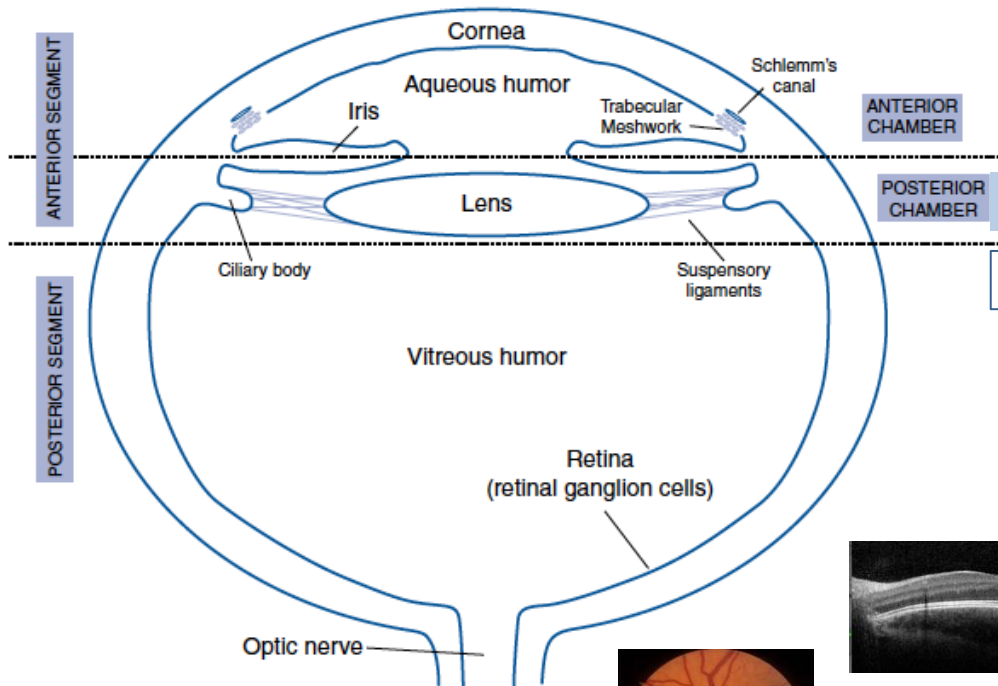
COLOBOMA





Microcórnea
Iridodisgenesias
Glaucoma congénito

> 50 genes

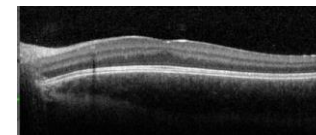


Cataratas congénitas

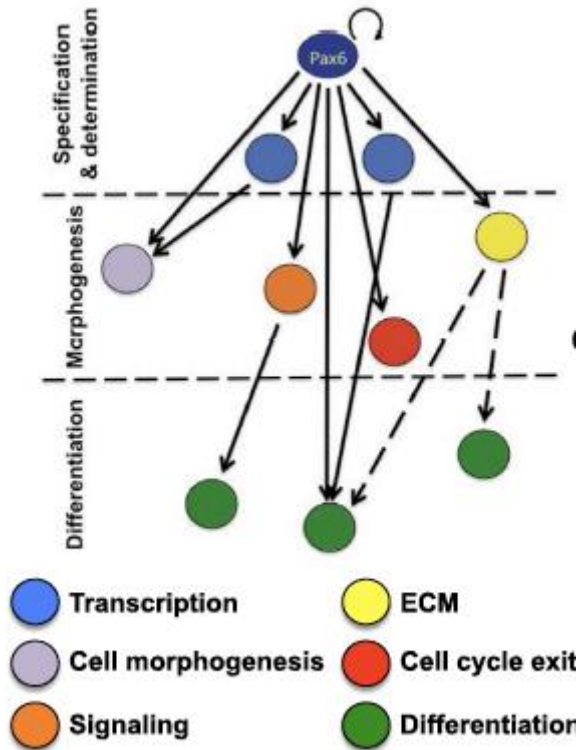
> 150 genes

Hipoplasia macular
y/o nervio óptico

> 100 genes

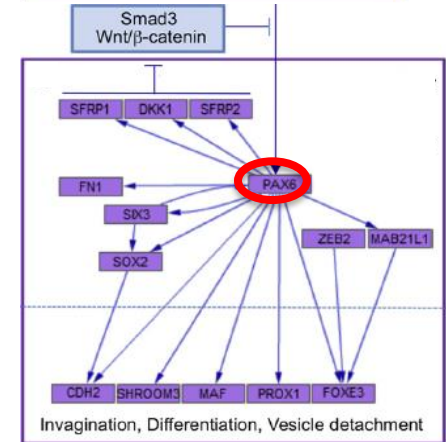
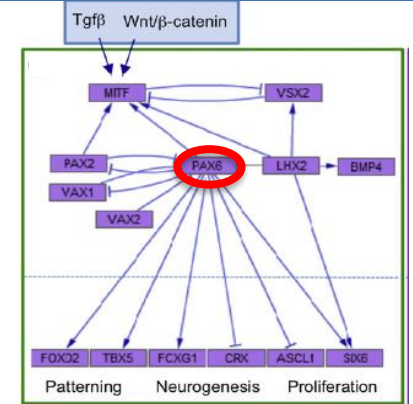


COMPLEJA REGULACION TRANSCRIPCIONAL



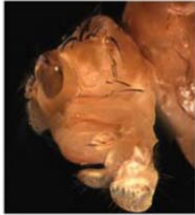
PAX6: Regulador clave multinivel

- Iniciación del desarrollo inicial de la vesícula óptica.
- Patterning vesícula y copa óptica
- Especificación y diferenciación **neuroectodermo** (retinogénesis)
- Especificación y diferenciación **ectodermo** (polo anterior y cristalino)



COMPLEJIDAD FENOTIPICA ASOCIADA A PAX6

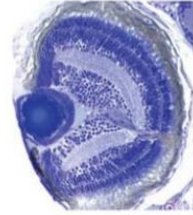
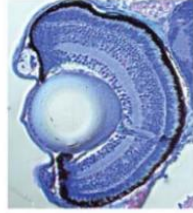
Drosophila



***Ey* -/-**

Anoftalmia

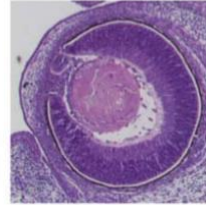
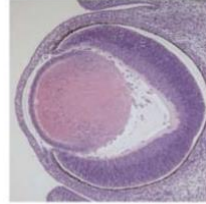
Pez Cebra



***pax6b* -/-**

Microftalmia
Anomalías retinianas

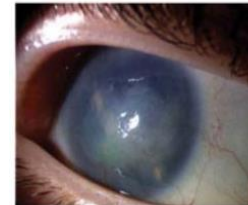
Ratón



Sey (Pax6 -/-)

Microftalmia
Malformación iridiana
Ausencia cámara anterior

Humano



***PAX6* +/-**

Haploinsuficiencia: Aniridia
(hipoplasia iris + fovea, déficit limbar + otros)
Missense: Microftalmia
Coloboma iris
Hipoplasia foveal
Anomalia Peters

OBJETIVOS DE NUESTRAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

Bases genéticas de malformaciones oculares altamente heterogéneas

Microftalmia, coloboma, cataratas congénitas, disgenesias del segmento anterior, hipoplasia foveal

Identificación de mecanismos moleculares en ANIRIDIA

OFTALMOGÉNÉTICA

Bases genéticas del ALBINISMO

Desarrollo de nuevas herramientas genómicas

Identificación de nuevas causas genéticas

- Paneles personalizados de NGS / aCGH
- Estudio de regiones **no codificantes** (paneles / WGS)
- Estudio de **variantes estructurales** (short and long WGS)
- Identificación de **nuevos genes** (WES / WGS)
- Implicación de **mosaicismo** (ddPCR / NGS)
- Implicación de **procesos epigenéticos**

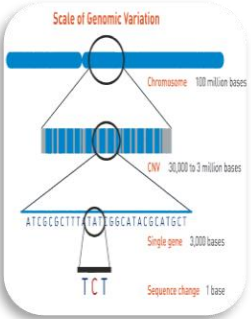
Caracterización funcional de mecanismos moleculares

- Caracterización funcional de **VUS y variantes no codificantes** (deep-intronic, UTRs)
- Implicación de **splicing alternativo** (long-reads RNAseq)
- Desarrollo de modelos experimentales para aniridia (minigenes, LCLs, hiPSCs + organoides oculares, pez cebra)

Estrategias terapéuticas

- Terapias antisentido para modulación mutaciones splicing
- Terapias readthrough para modulación mutaciones nonsense
- Corrección mediada por CRISPR

DESARROLLO APROXIMACIONES ÓMICAS



PANEL EyeDev_v1
121 Genes
Locus *PAX6*
(exones, intrones, enhancers)

SNVs



DIAGNOSTICO GENETICO

Genes prev:
PAX6, OTX2, CYP1B1, FI, PITX2, 1



DIAGNOSTICO GENETICO

Exoma clínico
Panel "virtual" MAFO

SNVs

SNVs + CNVs

- ANIRIDIA
- CATARATAS PEDIATRICAS
- DISGENESIAS POLO ANTERIOR
- GLAUCOMA CONGEN
- MICROFTALMIA COLOBOMATOSA
- HIPOPLASIA FOVEAL
- ALBINISMO
- ANOMALIAS NERVIÓ ÓPTICO



Baja

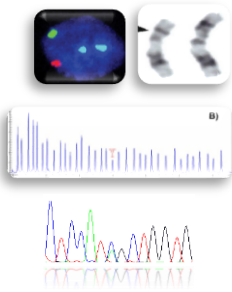
RESOLUCIÓN VARIANTES

Alta

<10-30%

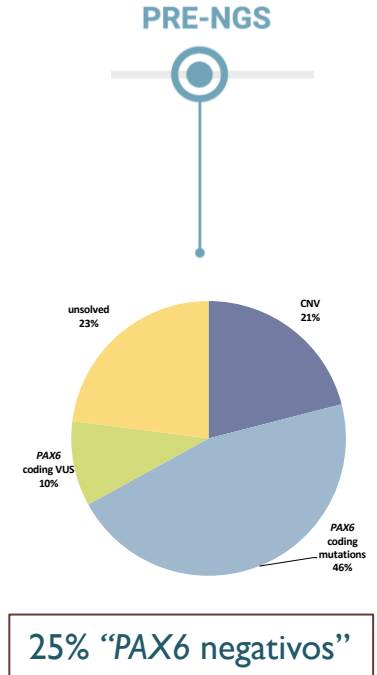
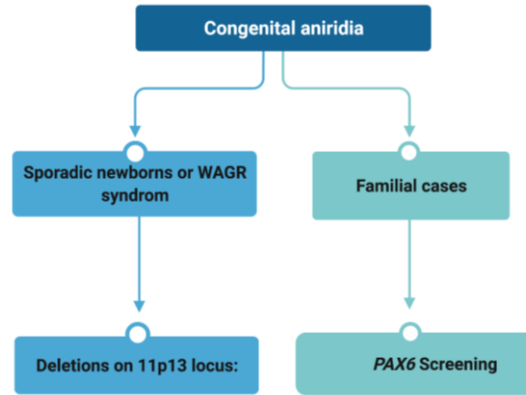
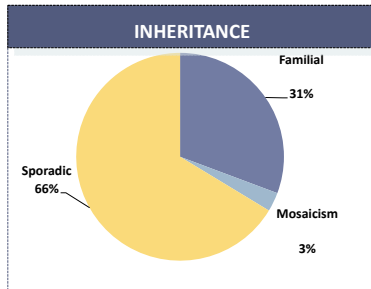
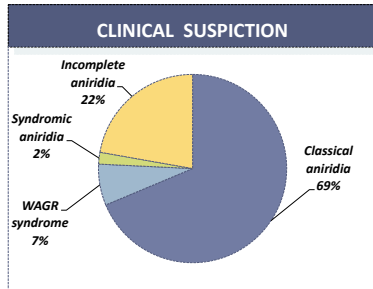
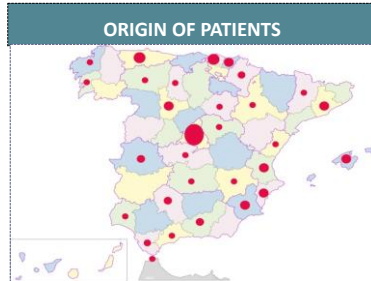
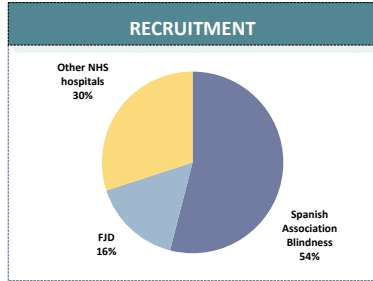
TASA DIAGNÓSTICA

50-60%



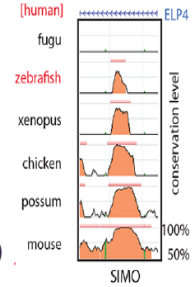
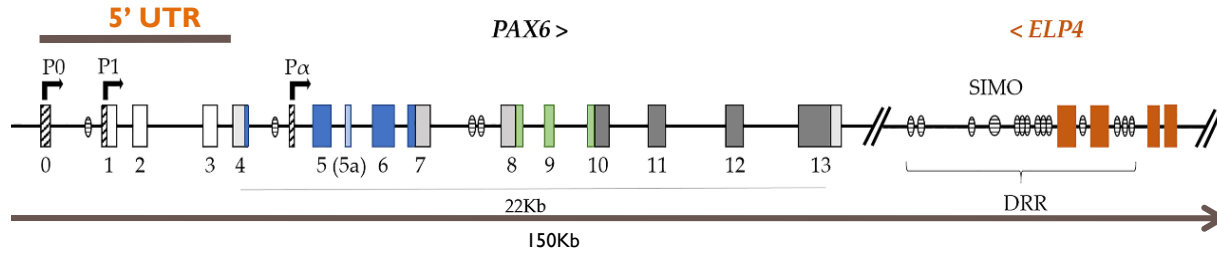
¿COMO MEJORAR LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN ANIRIDIA?

~100 familias aniridia



ESTUDIO DE CASOS DE ANIRIDIA PAX6 NEGATIVOS

11p13



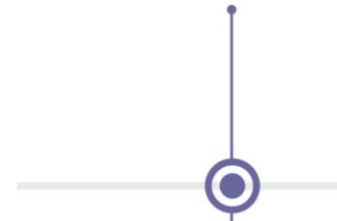
The Spectrum of PAX6 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in the Eye

Dulce Lima Cunha¹, Gavin Arno^{1,2,3}, Marta Corton^{4,5} and Mariya Moosajee^{1,2,3,*}

Elementos *cis*-reguladores PAX6 (>30)

Locus PAX6 + WAGR
(exones, intrones,
enhancers)

SNVs + CNVs



IDENTIFICACION VARIANTES NO CODIFICANTES

5' UTR
Non-canonical splicing variants
Deep-intronic
Sinónimas
3' UTR
Enhancers (3' del / SNVs)

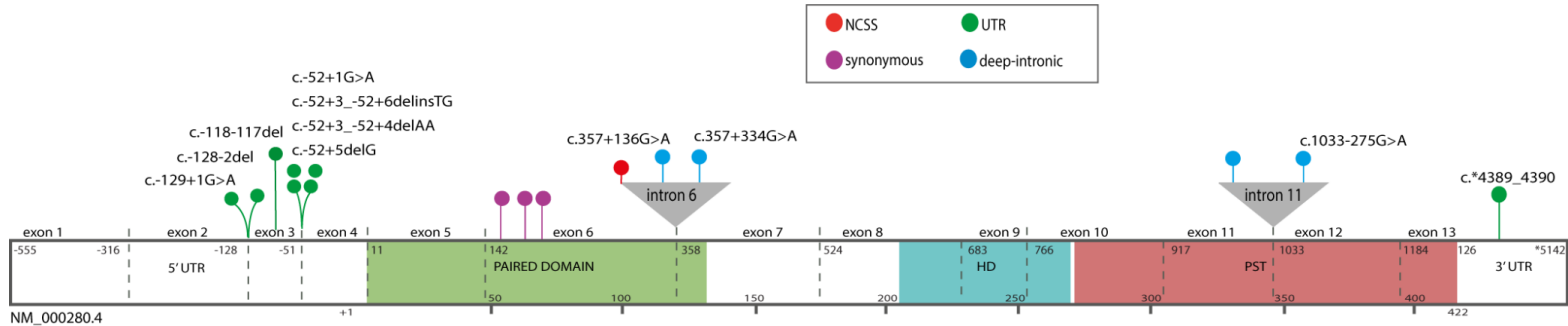


Likely pathogenic
Variants of unknown significance



¿ Impacto funcional
en la expresión PAX6 ?
Splicing
Transcriptional regulation

~15 % en nuestra cohorte



Human Genetics
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-1940-x>

ORIGINAL INVESTIGATION



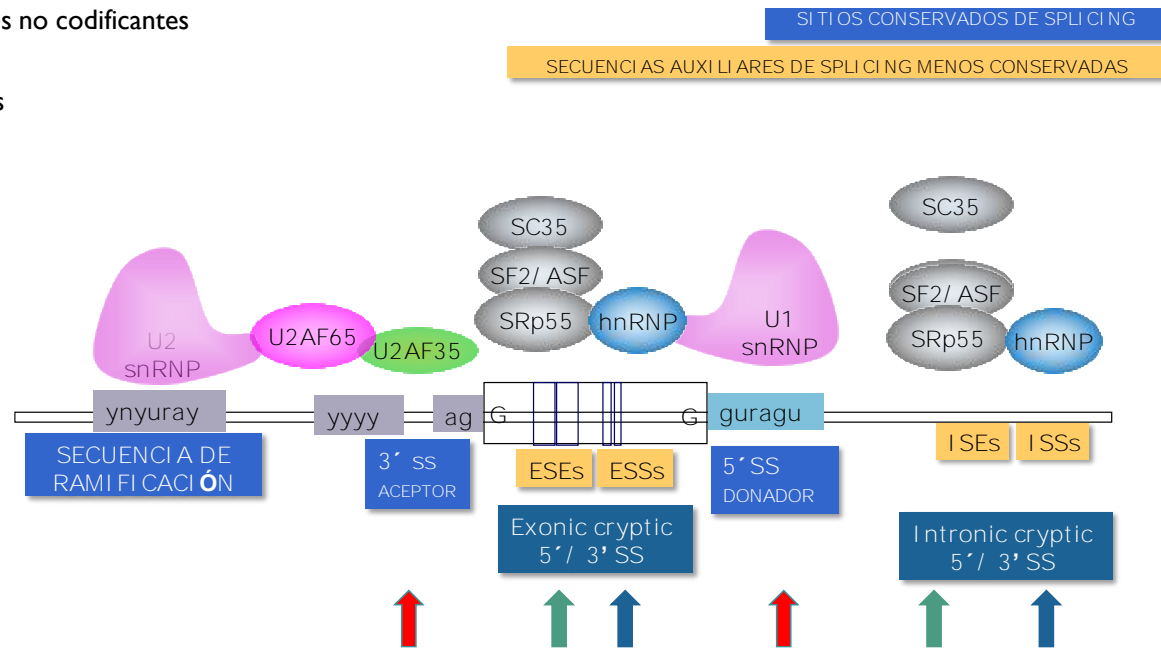
Implication of non-coding PAX6 mutations in aniridia

Julie Plaisancié^{1,2}, M. Tarilonte^{3,4}, P. Ramos^{3,4}, C. Jeanton-Scaramouche¹, V. Gaston¹, H. Dollfus⁵, D. Aguilera^{3,4}, J. Kaplan⁶, L. Fares-Tale⁶, F. Blanco-Kelly^{3,4}, C. Villaverde^{3,4}, C. Francannet⁷, A. Goldenberg⁸, I. Arroyo^{4,9}, J. M. Rozet⁸, C. Ayuso^{3,4}, N. Chassaing^{1,2}, P. Calvas^{1,2}, M. Corton^{3,4}

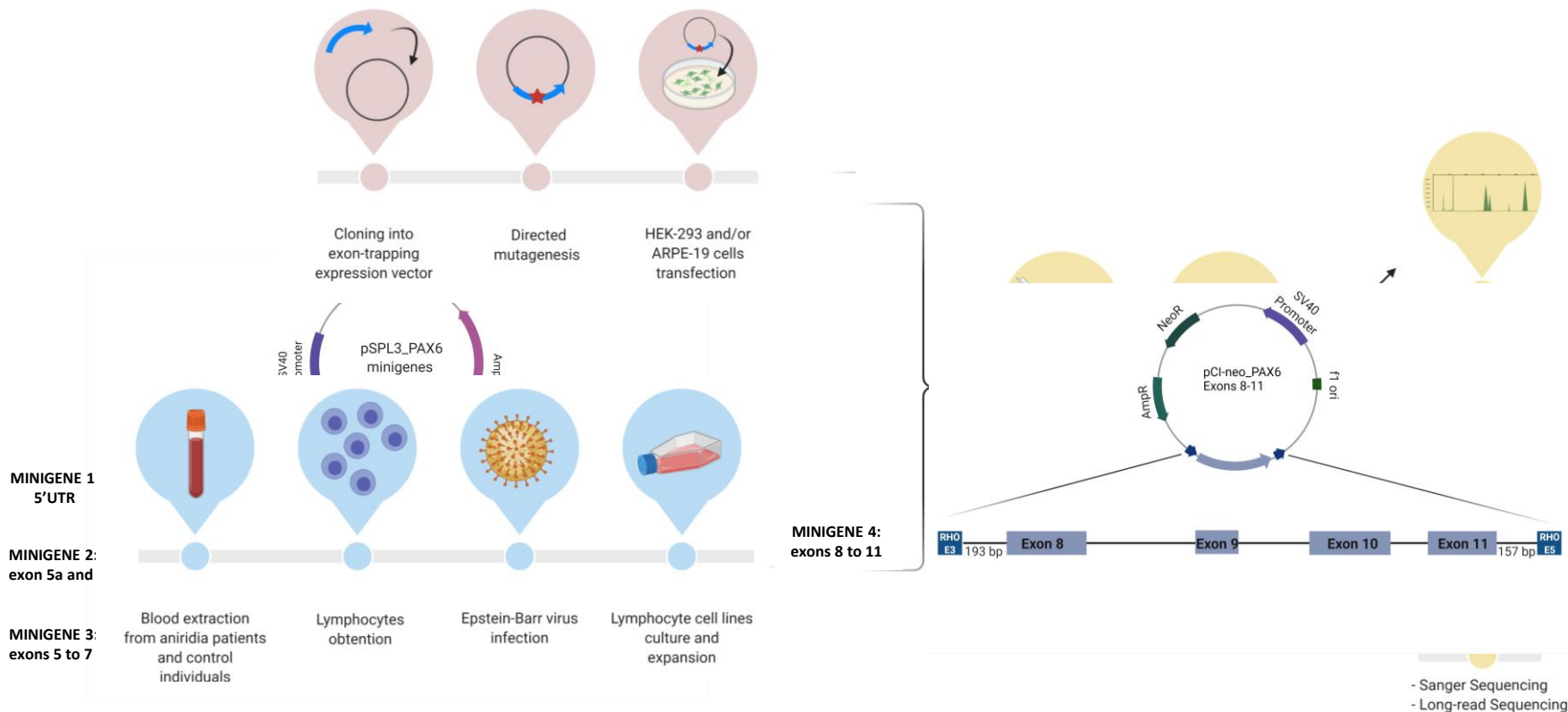
Received: 9 July 2018 / Accepted: 23 September 2018

IMPLICACION DE VARIANTES NO CODIFICANTES EN SPLICING

- 15% variantes en *PAX6* afectan potencialmente al correcto empalme del pre-ARNm
- >90% de las VUS identificadas en nuestra cohorte se localizan en sitios no canónicos de *splicing*:
 - Donadores / aceptores canónicos en exones no codificantes
 - Donadores crípticos exónicos (exón 6)
 - Elementos reguladores del *splicing* exónicos
 - Sitios *splicing* crípticos intrónicos



IMPLICACION DE VARIANTES NO CODIFICANTES EN SPLICING



IMPLICACION DE VARIANTES NO CODIFICANTES EN SPLICING

NM_000280.4



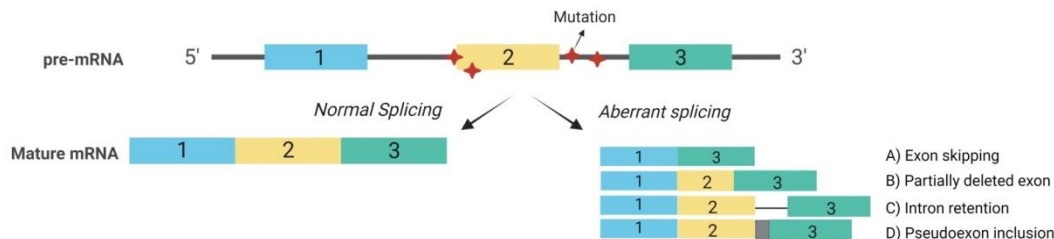
c.-129+1G>A
c.-128-2del
c.-52+1G>A
c.-52+3_-52+6delinsTG
c.-52+5del

c.142-3C>G
c.174C>T**
c.178T>C
c.180T>A
c.249T>G
c.249del
c.326_331dup
c.333C>A
c.349_357del

c.352_357+2del
c.356G>T
c.357_357+5del
c.357+1G>A*
c.357+5G>C
c.357+6T>G**
c.357+136G>A
c.357+334G>A
c.524-1G>A*

c.682+4del
c.683-5_683-3delinsGAA
c.683-5T>G
c.683-9C>G
c.687dup
c.765G>T
c.765A>G
c.766-3C>G

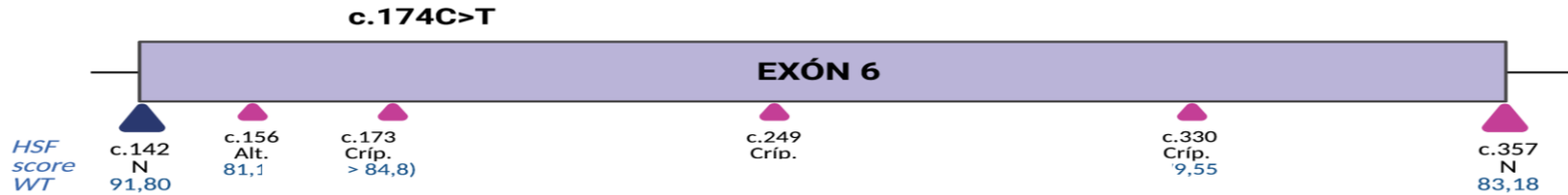
Plaisancie & Tatilonte et al. 2018
Tarilonte et al. 2020
C. Ruiz, TGF, 2021
A. Tamayo, Tesis doctoral (en proceso)



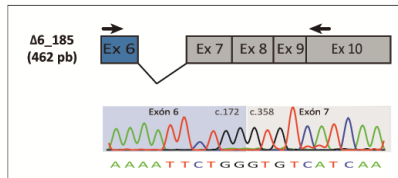
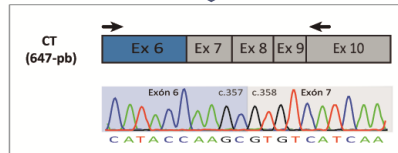
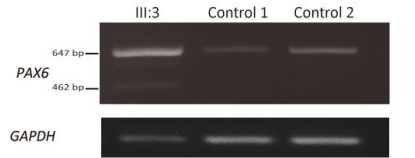
DISTINTOS MECANISMOS

- 1- creación /potenciación sitios splicing exónicos
- 2- creación /potenciación sitios splicing intrónicos
- 3- silenciamiento sitios splicing mediado por SREs

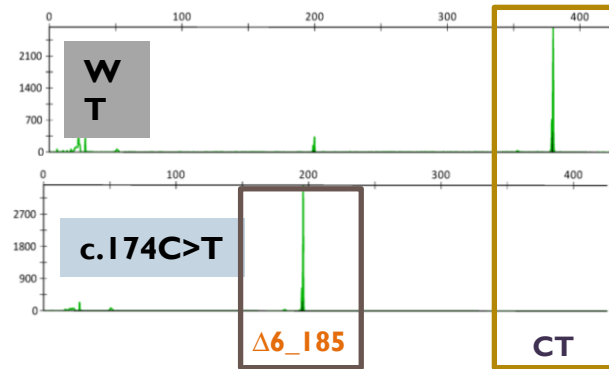
VARIANTES EXONICAS CREAN DONADORES CRÍPTICOS



ANÁLISIS EN LCL



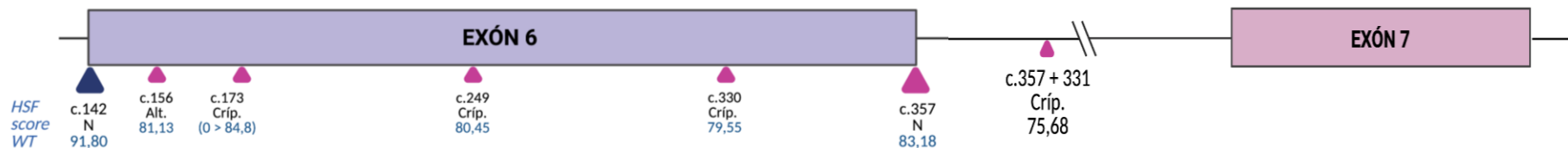
ANÁLISIS INVITRO (minigenes)



Minigenes representan una buena alternativa ante la falta de muestras de pacientes

Sinónima >>> frameshift

COMPLEJA MODULACIÓN DEL SPLICING DEL EXÓN 6

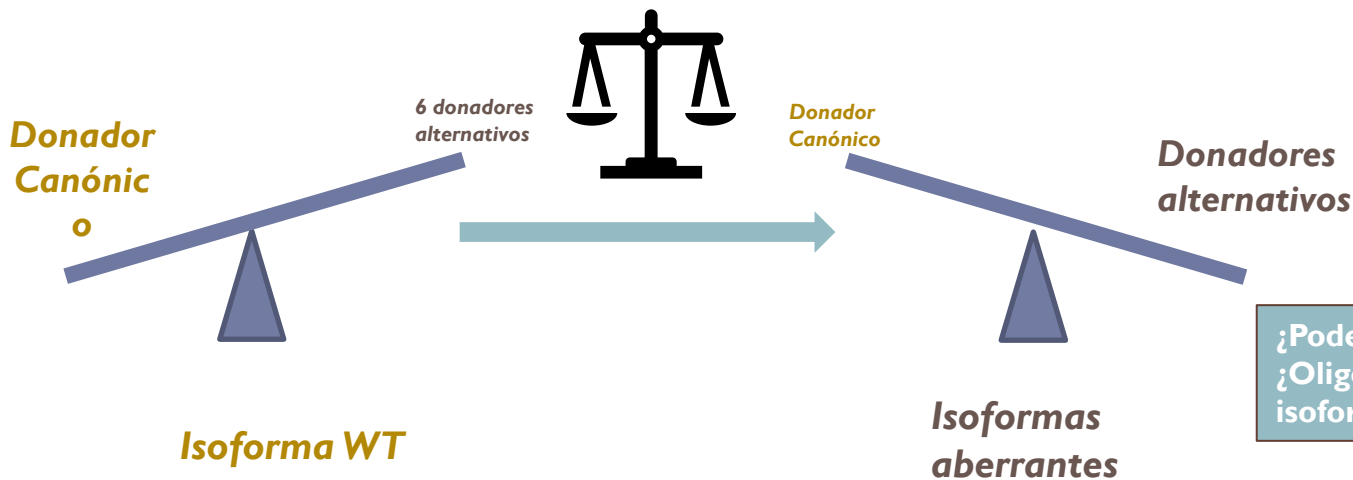


ESPECTRO DE DONADORES CRÍPTICOS EN EL EXON 6 DE PAX6

Desbalance Splicing exon 6

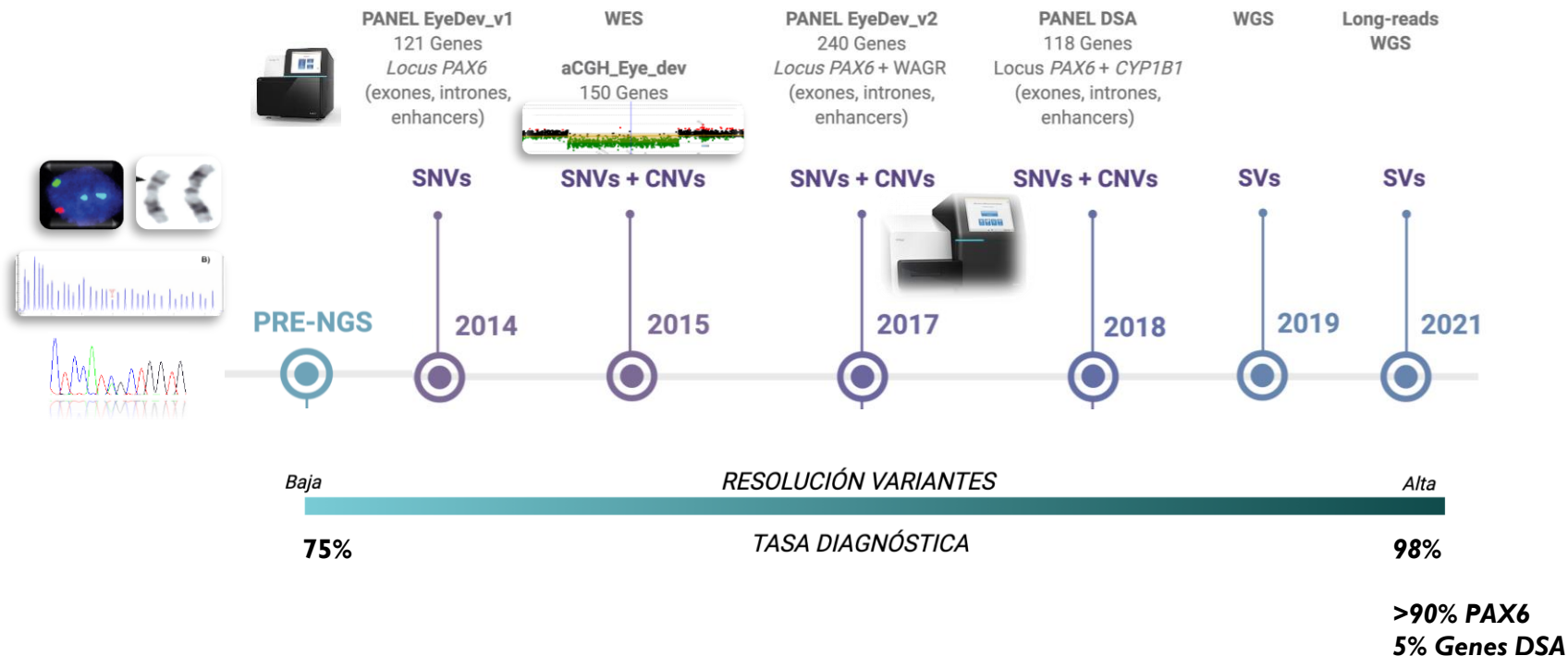
Variantes que:

- Alteran el donador canónico débil
- Potencian donadores crípticos
- Alteran sitios de unión a SREs

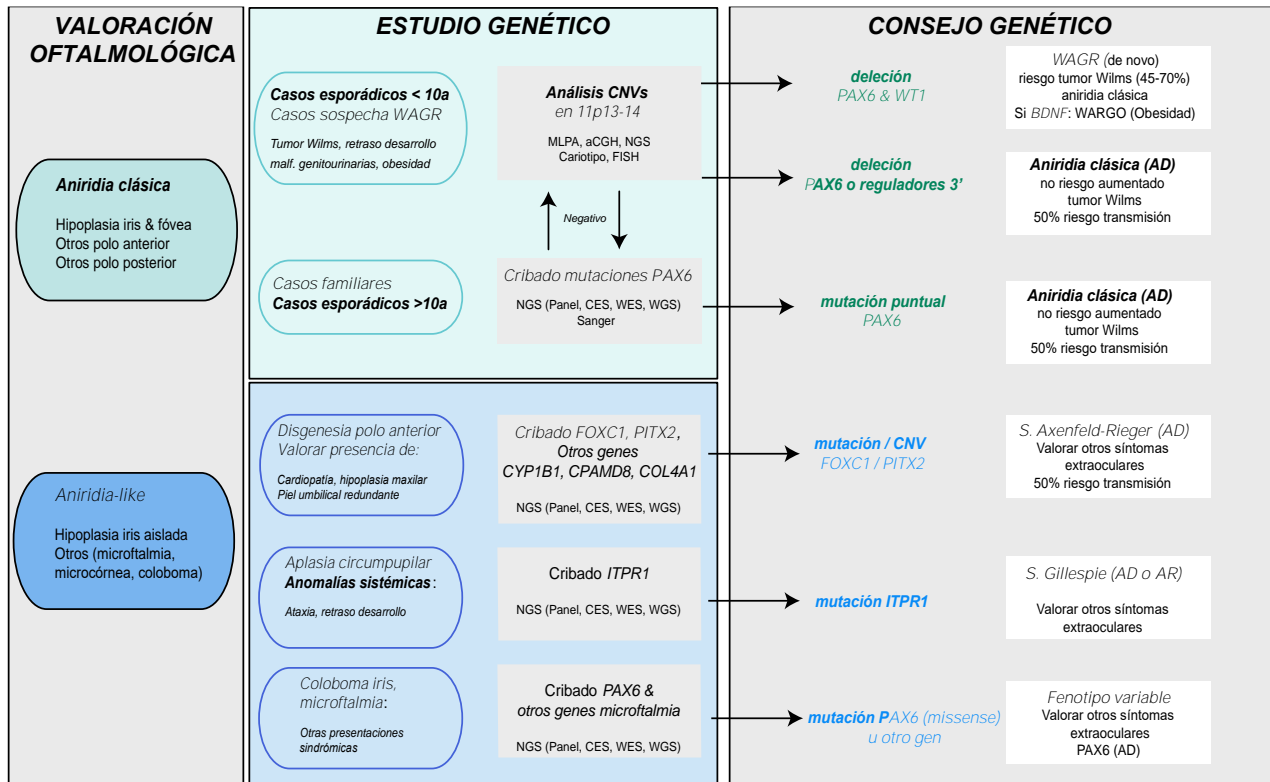


¿Podemos potenciar el donador débil?
¿Oligos antisentidos para modular las isoformas aberrantes?

MEJORA DE LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN ANIRIDIA



ACTUALIZACION ALGORITMO



Blanco-Kelly y cols. Genética y epidemiología de la aniridia congénita: actualización de buenas prácticas para el diagnóstico genético. Arch. Soc. Esp. Oftalmología. 2021

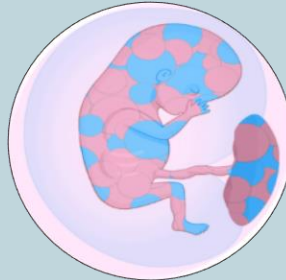
CONCLUSIONES



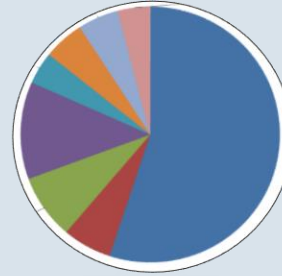
Variantes no codificantes en *PAX6* como causa de aniridia

Variant
Uncertain
Significance

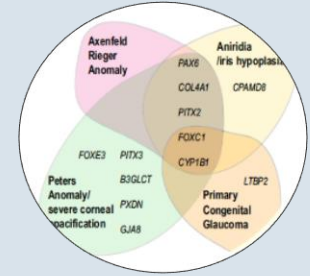
Modelización funcional de VUS implicadas en el *splicing*



Mosaicismo somático como causa de expresividad variable



Técnicas de NGS mejoran el rendimiento en el diagnóstico genético



Nuevas asociaciones fenotípicas

NUESTRA EXPERIENCIA

ANÁLISIS GENÓMICO

Next Generation Sequencing

- Amplia experiencia en diseños personalizados de paneles
- Implementación protocolos para distintas plataformas y aproximaciones (DNA, RNA, mtDNA, mosaicismo)

• Análisis de WES

- Validación de variantes con distintas técnicas (aCGH, PCR digital, etc.)

CGH arrays: Diseños personalizados o comerciales

- Análisis de mosaicismo y alelos de baja frecuencia

- Análisis de expresión y de isoformas de *splicing*

- Análisis bioinformático
Coding, non-coding SNV & CNVs

BIOBANKING

- DNA y RNA de distintos tejidos
- Lymphocytes cell lines
- Fibroblastos

ANÁLISIS *IN VITRO* VARIANTES SPLICING

- Vectores específicos *exon-trapping*
- Análisis cuantitativo y cualitativo de isoformas de *splicing*

SE AGRADECE AYUDA EN

DESARROLLO MODELOS PEZ CEBRA

Solicitud de autorizaciones y/o diseño experimental

Asesoramiento en diseño de guías
CRISPR

Cualquier otra ayuda / asesoramiento en microinyecciones de ADN /ARN en embriones

DESARROLLO DE iPSCs

- Cuarto de cultivo para trabajo con células madre inducidas y/o vectores virales

TÉCNICAS / EQUIPOS

- Técnicas de histología e **Inmunofluorescencia**
- **Ensayos de luciferasa**
- **Lupa estereoscópica de fluorescencia**
(fenotipado de larvas y/o peces adultos / organoides)

GRACIAS



Group of Genetics of Eye Developmental Disorders

Marta Cortón, PhD
Alejandra Damian, MSc
Alejandra Tamayo, MSc
Cristina Rodilla, MSc
Cristina Villaverde
Maria Tarilonte (ex)
Jenifer Moya (ex)
Patricia Ramos (ex)

Bioinformatic Unit

Pablo Minguez, PhD
Raquel Romero, PhD
Ionut Iancu, MSc
Lorena de la Fuente, PhD
Gonzalo Núñez, MSc

H. Purpan- INSERM Toulouse
Patrick Calvas
Nicolas Chassaing

H.U. Virgen Arrixaca, Murcia
Encarna Guillen

U. Castilla la Mancha
Julio Escribano

H.U. Niño Jesús, Madrid
Valentina Ortiz

Oxford Brookes University
Nicky Ragge

CBMSO – CSIC, Madrid
Paola Bovolenta

UCL-Institute of Ophthalmology
Mariya Mosajee

H.U. Ramon y Cajal, Madrid
Miguel Angel Moreno
Manuela Villamar

Hospital de Cruces, Bilbao
Blanca Gener

Department of Genetics & Genomics

Carmen Ayuso, MD PhD
Berta Almuoguera, PhD
Almudena Avila, PhD
Fiona Blanco-Kelly, MD, PhD
Isabel Lorda, MD PhD
Inmaculada Martín, PhD
Saoud T. Swafiri, MD
M^a José Trujillo, PhD

Department of Ophthalmology

Blanca G. Sandoval, MD PhD
Esther Carreño, MD PhD
Belén Jiménez, MD

Research Centre Medical Genetics, Moscow
Andrey V. Marakhonov
Tatyana Vasilyeva

CNB – CSIC , Madrid
Lluís Montoliu

