



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche - Curriculum Biomolecolare

Genetica della Sordità e Terapie Innovative

Hearing Loss Genetics and Innovative Therapies

Tesi di laurea di: Gerini Riccardo

Docente referente: Barucca Marco

Sessione Estiva
Anno Accademico 2023/2024

Introduzione

Table 1. Severity of Hearing Loss in Decibels (dB)

Severity	Hearing Threshold in dB
Slight	12-25 dB
Mild	26-40 dB
Moderate	41-60 dB
Moderately severe	61-70 dB
Severe	71-90 dB
Profound	>90 dB

Frequency (See Table 2.)

Table 2. Human Hearing by Frequency of Sound

Frequency Level	Hertz (Hz)
Low	<500 Hz
Medium	501-2,000 Hz
High	>2,000 Hz

La sordità è la quarta più diffusa forma di disabilità congenita, si presenta in un bambino su 500, prevalentemente con gravità da severa a profonda e bilaterale. Può manifestarsi in forma sindromica, non sindromica e mimica.

Genetic Hearing Loss Overview

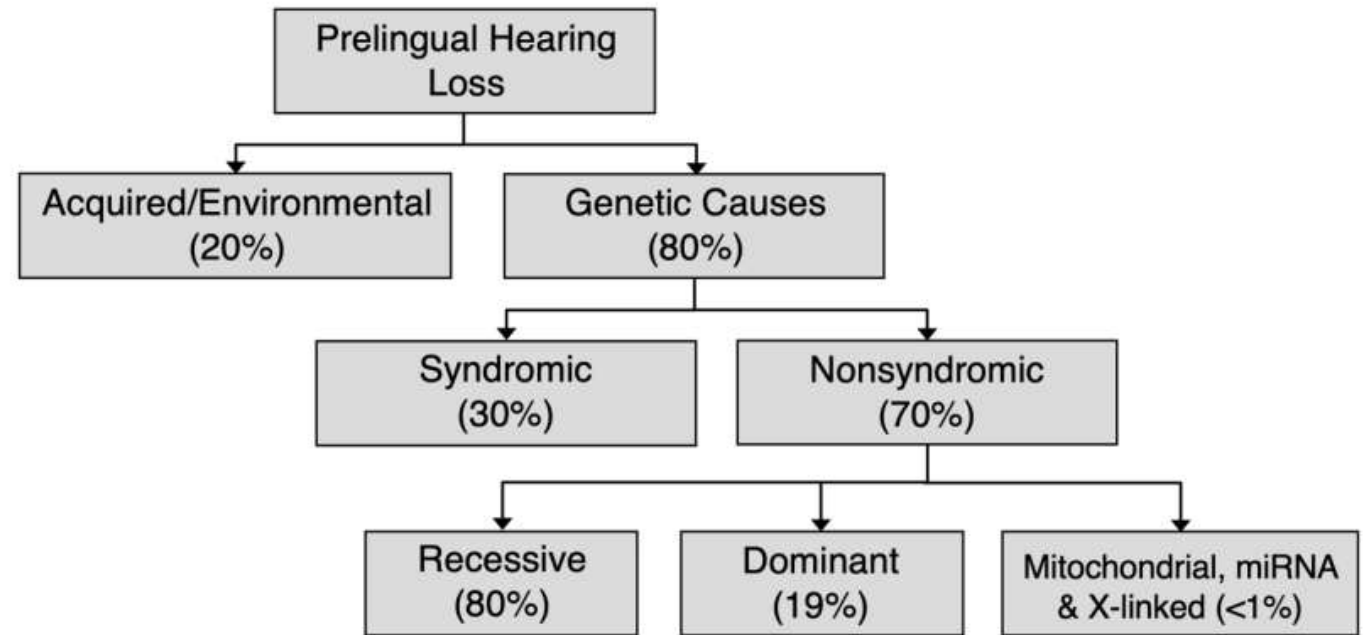


Figure 1. Causes of prelingual hearing loss in developed countries [Morton & Nance 2006, Sheffield & Smith 2019]

Sordità Sindromica Recessiva Autosomica

La Sindrome di Usher di tipo II:

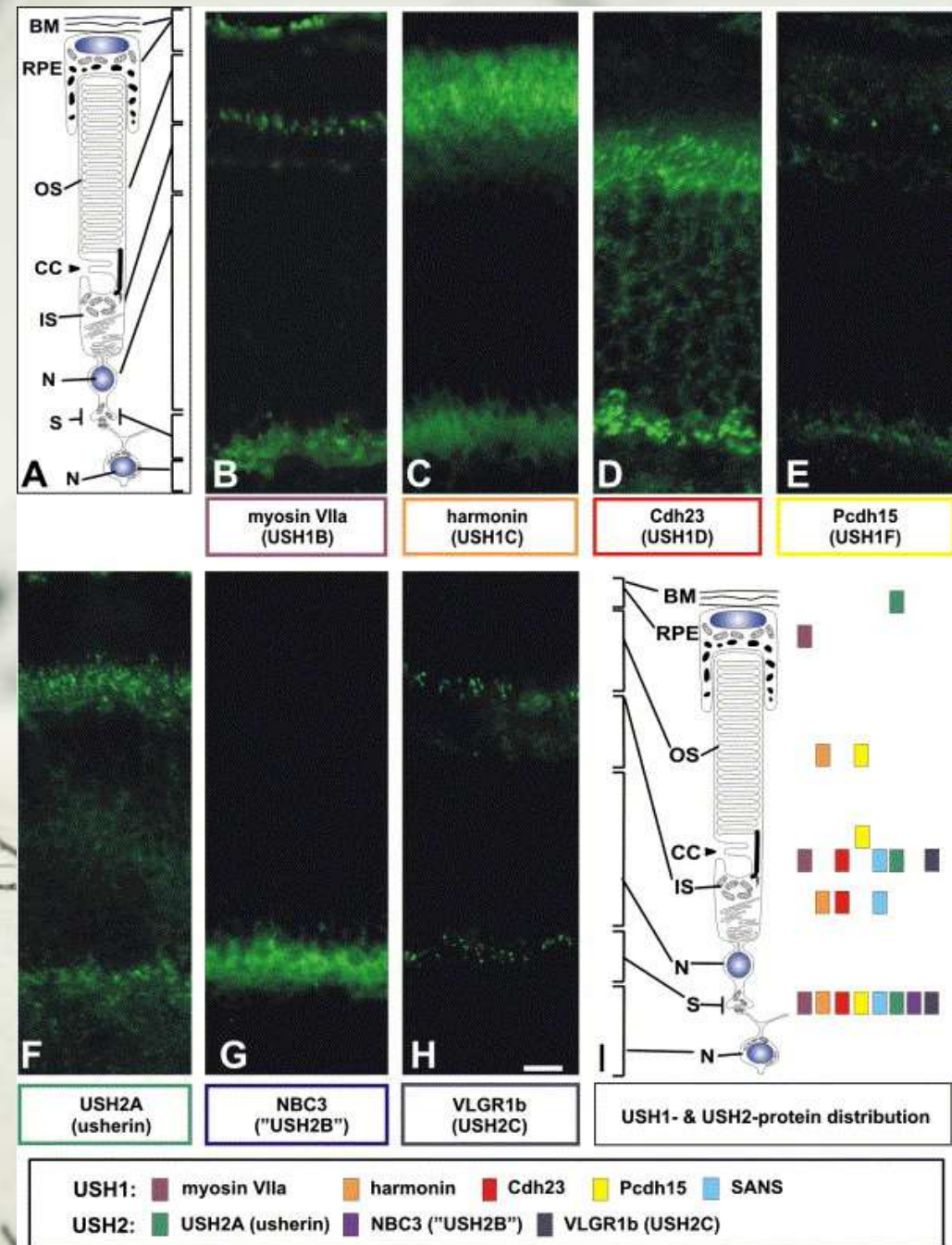
- Congenita, bilaterale, neurosensoriale, penetranza completa,
- Severità media-moderata alle basse frequenze, da severa a profonda alle alte,
- Retinite Pigmentosa per degenerazione di coni e bastoncelli, progressiva, simmetrica,
- 3 volte più comune del tipo I, principale causa di sordità associata alla cecità.

Geni coinvolti:

- USH2A codifica per l'Usherina
- ADGRV1 codifica per un recettore transmembrana,
- WHRN codifica per la Whirlina

Sindrome di Usher di tipo I e III?

- In basso: Visione tipo di un paziente affetto da retinite pigmentosa
- A destra: Localizzazione delle proteine nei bastoncelli, immagini di immunofluorescenza



Sordità Sindromica Dominante Autosomica

Lo Spettro dei Disordini Branchio-Oto-Renali

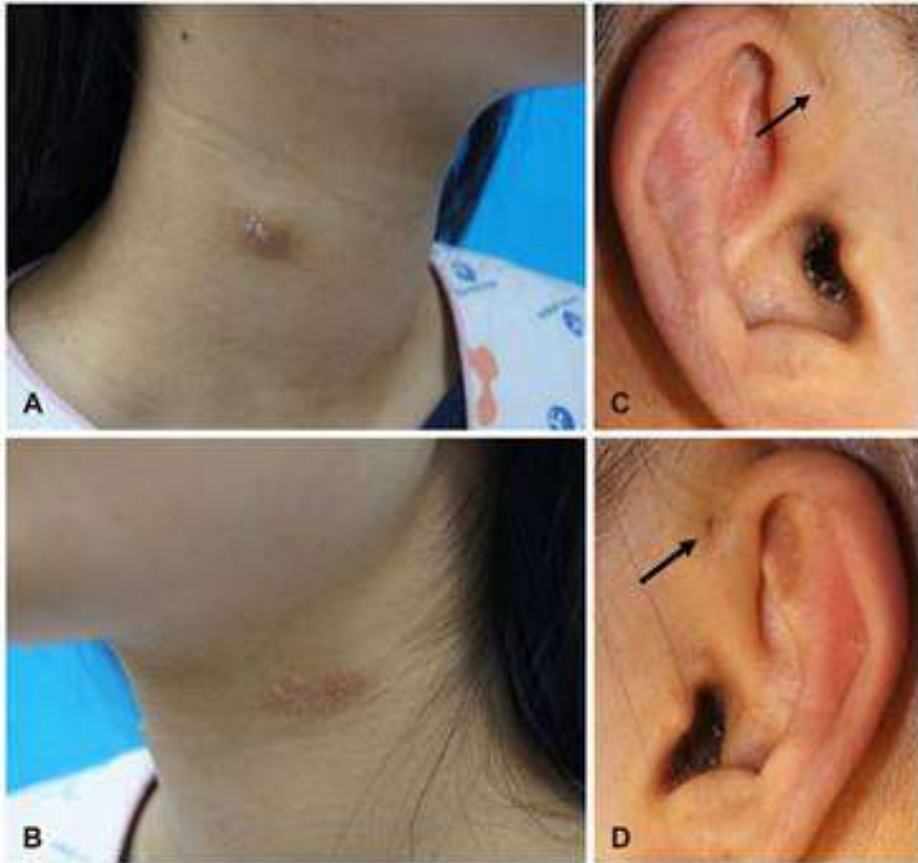


Table 2. Molecular Genetic Testing Used in Branchiootorenal Spectrum Disorder (BORSD)

Gene ^{1, 2}	Proportion of BORSD Attributed to Pathogenic Variants in Gene	Proportion of Pathogenic Variants ³ Detectable by Method	
		Sequence analysis ⁴	Gene-targeted deletion/duplication analysis ⁵
<i>EYA1</i>	40% ⁶	80% ⁶	20% ⁶
<i>SIX1</i>	2% ⁷	100% ⁷	Unknown ⁸
<i>SIX5</i>	2.5% ⁹	100% ⁹	Unknown ⁸
Unknown ¹⁰	>50%	NA	

1. Genes are listed in alphabetic order.

2. See Table A. Genes and Databases for chromosome locus and protein.

3. See Molecular Genetics for information on allelic variants detected in this gene.

4. Sequence analysis detects variants that are benign, likely benign, of uncertain significance, likely pathogenic, or pathogenic. Variants may include small intragenic deletions/insertions and missense, nonsense, and splice site variants; typically, exon or whole-gene deletions/duplications are not detected. For issues to consider in interpretation of sequence analysis results, click [here](#).

5. Gene-targeted deletion/duplication analysis detects intragenic deletions or duplications. Methods used may include quantitative PCR, long-range PCR, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), and a gene-targeted microarray designed to detect single-exon deletions or duplications.

6. Chang et al [2004], Krug et al [2011]

7. Heterozygous pathogenic variants were identified in 10 (4.0%) of 247 unrelated individuals with BORSD syndrome in whom an *EYA1* or *SIX5* pathogenic variant was not identified [Kochhar et al 2008]. This prevalence implies that *SIX1* pathogenic variants account for approximately 2% of cases of BORSD.

8. No data on detection rate of gene-targeted deletion/duplication analysis are available.

9. Heterozygous pathogenic variants were identified in 5 (5.2%) of 95 unrelated individuals with BORSD in whom an *EYA1* or *SIX1* pathogenic variant was not identified [Hoskins et al 2007]; these data imply a *SIX5* mutation rate of fewer than 2.5% of persons with BORSD syndrome.

10. Brophy et al [2013], Morisada et al [2014]

Structureⁱ

Model Confidence:

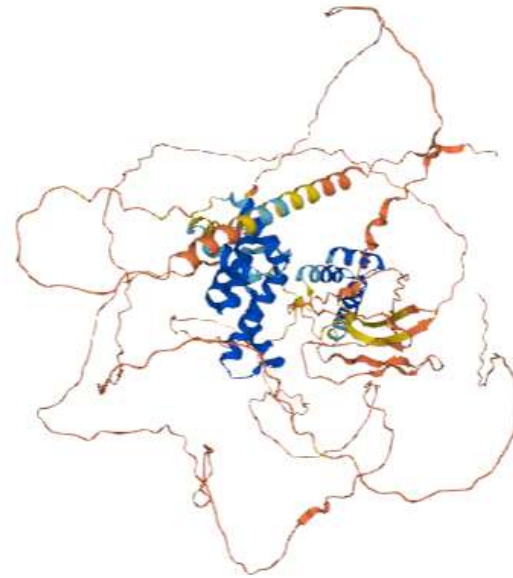
Very high (pLDDT > 90)

Confident (90 > pLDDT > 70)

Low (70 > pLDDT > 50)

Very low (pLDDT < 50)

AlphaFold produces a per-residue confidence score (pLDDT) between 0 and 100. Some regions with low pLDDT may be unstructured in isolation.



- A sinistra: struttura 3d della proteina EYA₁
- A destra: struttura 3d della proteina SIX₅
- In basso: struttura della proteina SIX₁

Structureⁱ



Lo Spettro dei Disordini Branchio-Oto-Renali:

- Perdita di udito neurosensoriale (29%), conduttivo (33%) o misto (52%), insorgenza e gravità variabili, penetranza completa, espressività variabile,
- Seconda sindrome autosomica dominante più comune,
- Fistole e cisti branchiali ed ipoplasia renale (19%) media oppure agenesia (29%) renale bilaterale.

Structureⁱ

Model Confidence:

- Very high (pLDDT > 90)
- Confident (90 > pLDDT > 70)
- Low (70 > pLDDT > 50)
- Very low (pLDDT < 50)

AlphaFold produces a per-residue confidence score (pLDDT) between 0 and 100. Some regions with low pLDDT may be unstructured in isolation.

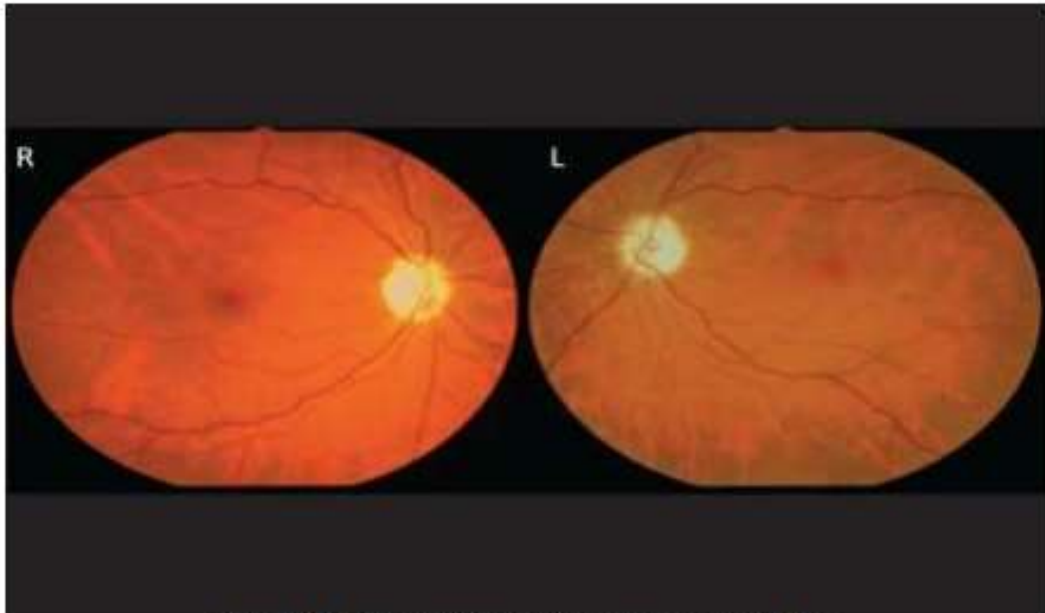
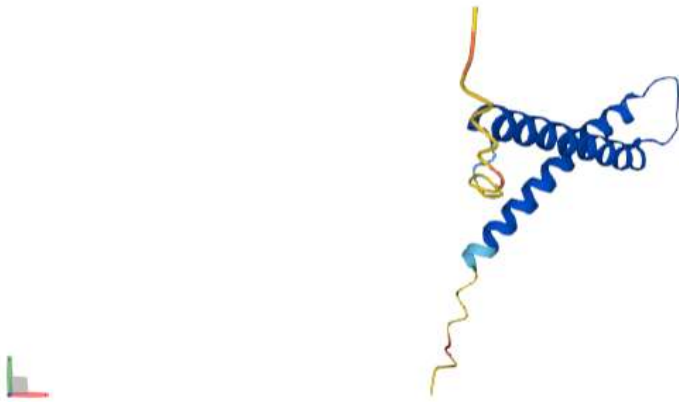


Figure 3: Bilateral Optic Discs show gross pallor.

Sordità Sindromica legata al Cromosoma X

La Sindrome di Mohr-Tranebjærg:

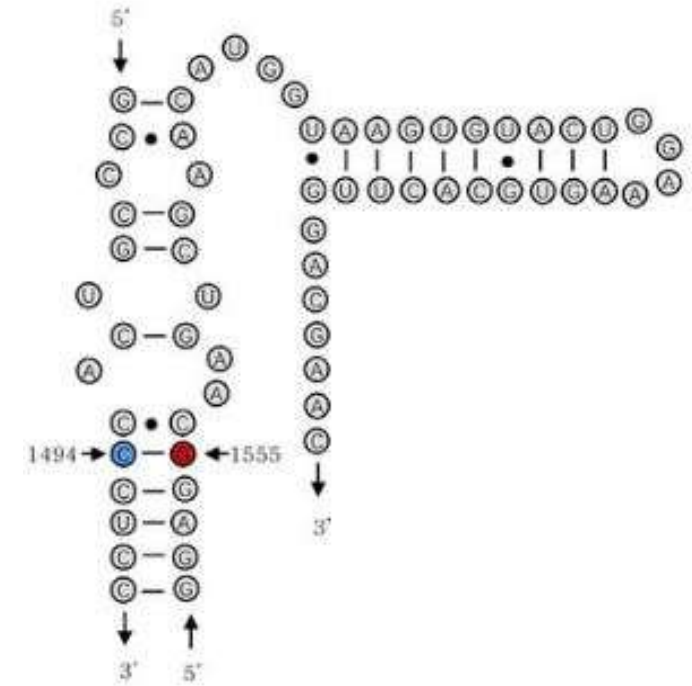
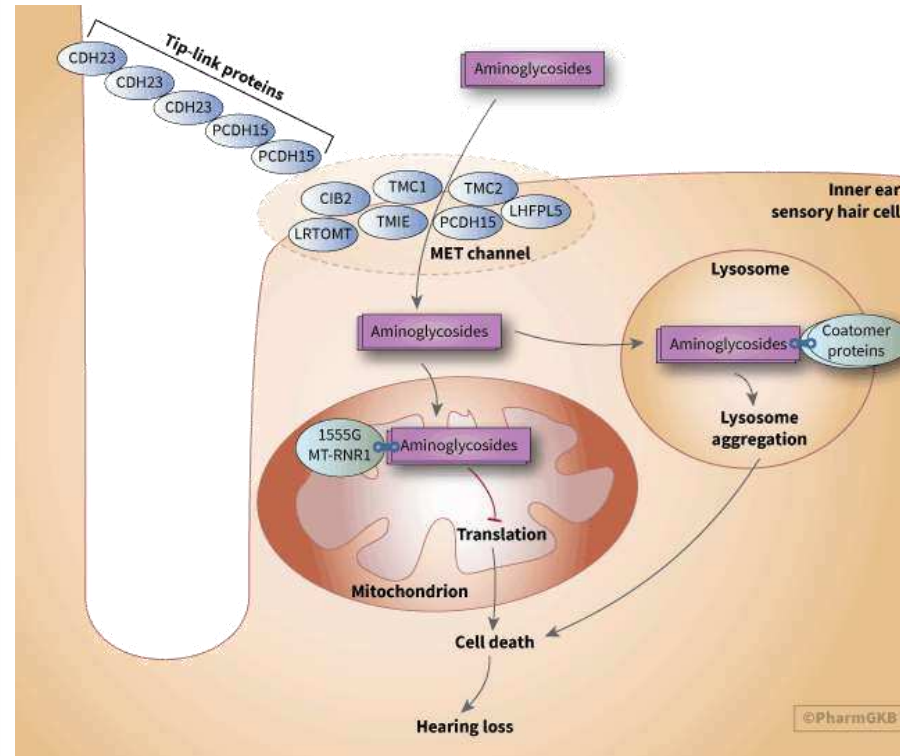
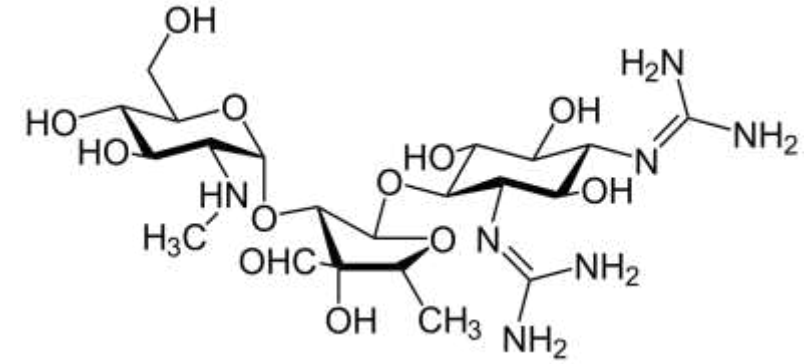
- Non sindromica mimica, insorgenza pre o post-linguale, neurosensoriale, differenze tra uomini e donne,
- Distonia e atassia progressive nell'adolescenza, atrofia ottica, comunicazione compromessa, paranoia, disturbi psichici, cambiamenti della personalità, demenza,
- Gene TIMM8A codifica per la subunità di una traslocasi della membrana mitocondriale interna TIMM₁₃.

Sordità Non Sindromica Recessiva legata al mtDNA

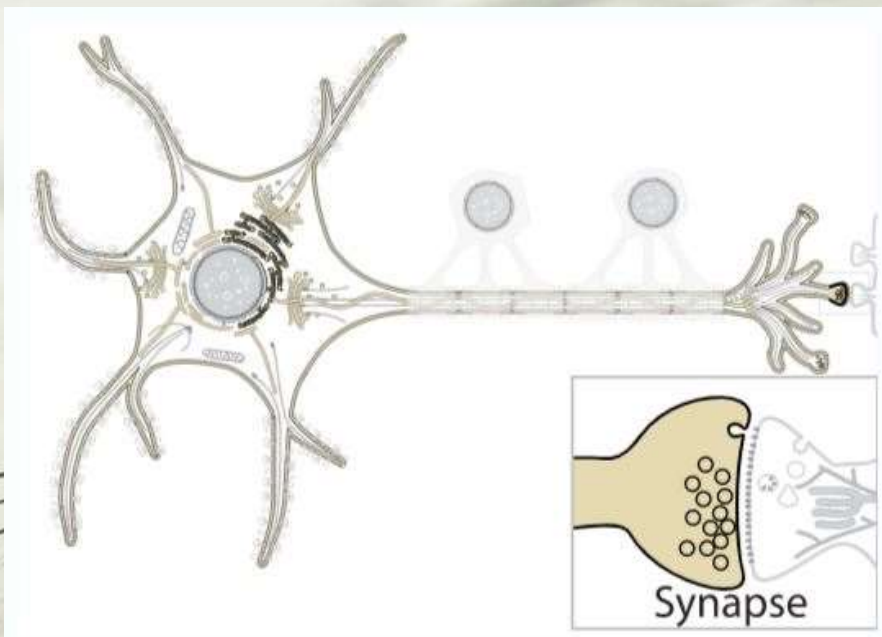
MT-RNR1 (rRNA 12S):

- Neurosensoriale, insorgenza e severità variabili,
- Mutazioni riconosciute nel 71% dei casi,
- Può essere o non essere causata dall'esposizione all'aminoglicoside.

- In alto: Struttura della Streptomicina
- A sinistra: Azione dell'aminoglicoside



1555 A>G mutant
Human mitochondrial 12S rRNA



Model Confidence:

- Very high (pLDDT > 90)
- Confident (90 > pLDDT > 70)
- Low (70 > pLDDT > 50)
- Very low (pLDDT < 50)

AlphaFold produces a per-residue confidence score (pLDDT) between 0 and 100. Some regions with low pLDDT may be unstructured in isolation.

- A sinistra:
Distribuzione
cellulare della
proteina
- A destra:
Struttura 3d
dell'Otoferlina

SOURCE

IDENTIFIER

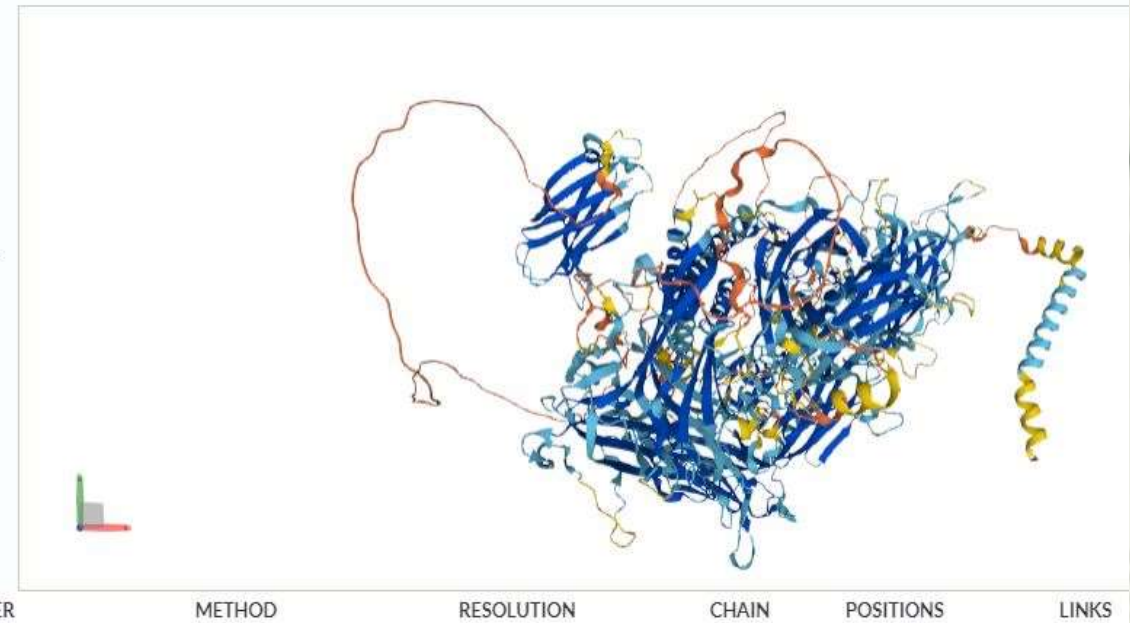
METHOD

RESOLUTION

CHAIN

POSITIONS

LINKS



Sordità Non Sindromica Recessiva Autosomica

Il gene OTOF:

- Congenita, gravità severa o profonda, neurosensoriale,
- Il 10-15% dei soggetti presenta fenotipi anomali come una severità media, andamento progressivo, perdita di udito legata alla temperatura corporea,
- Nel mondo la mutazione causa tra l'1 e l'8% dei casi di sordità non sindromica,
- Codifica per l'otoferlina, proteina legante ioni calcio nelle cellule dell'orecchio medio e interno, Questa si lega a SNAP25 e Sintassina1 andando a mediare l'esocitosi del neurotrasmettitore glutammato.

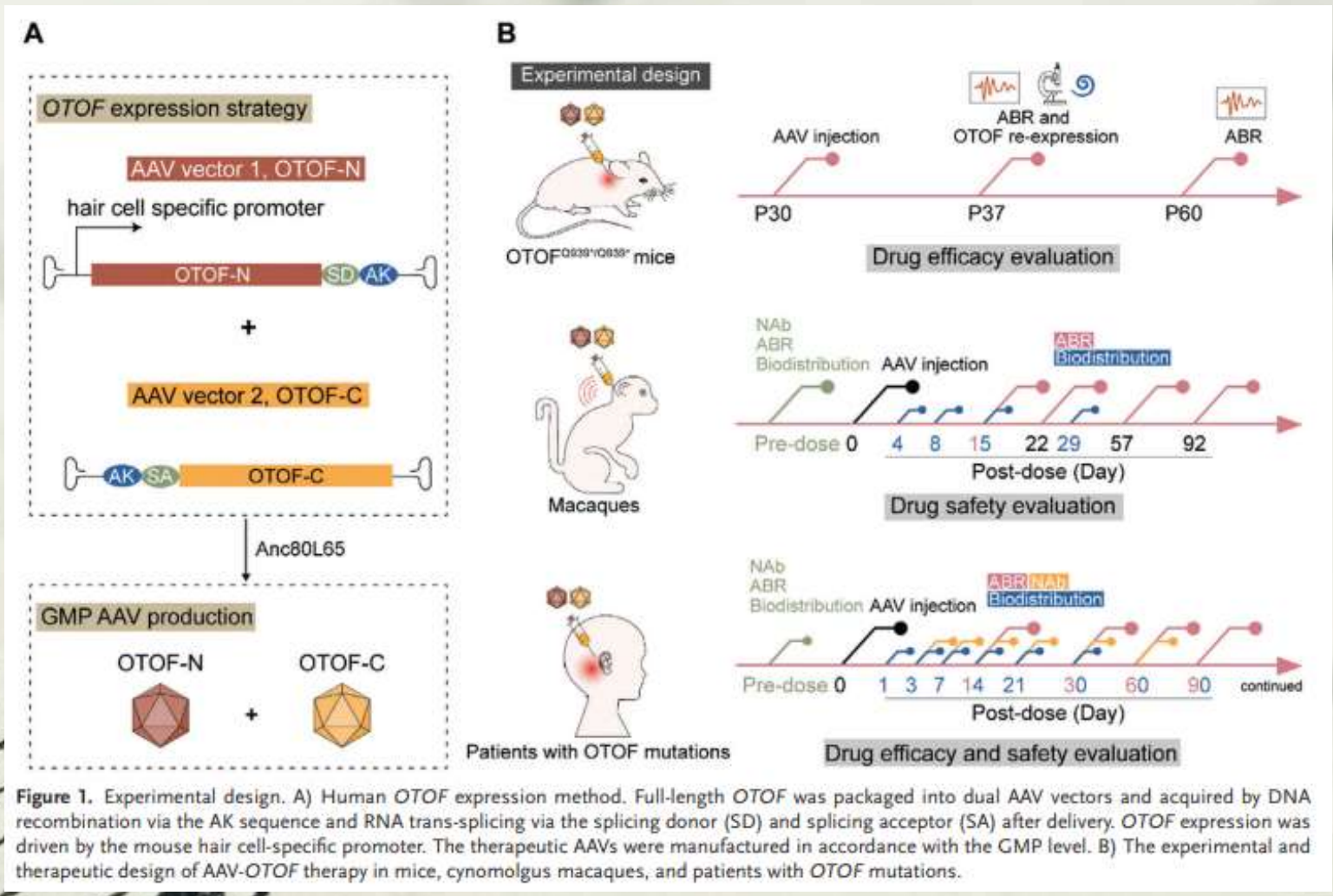
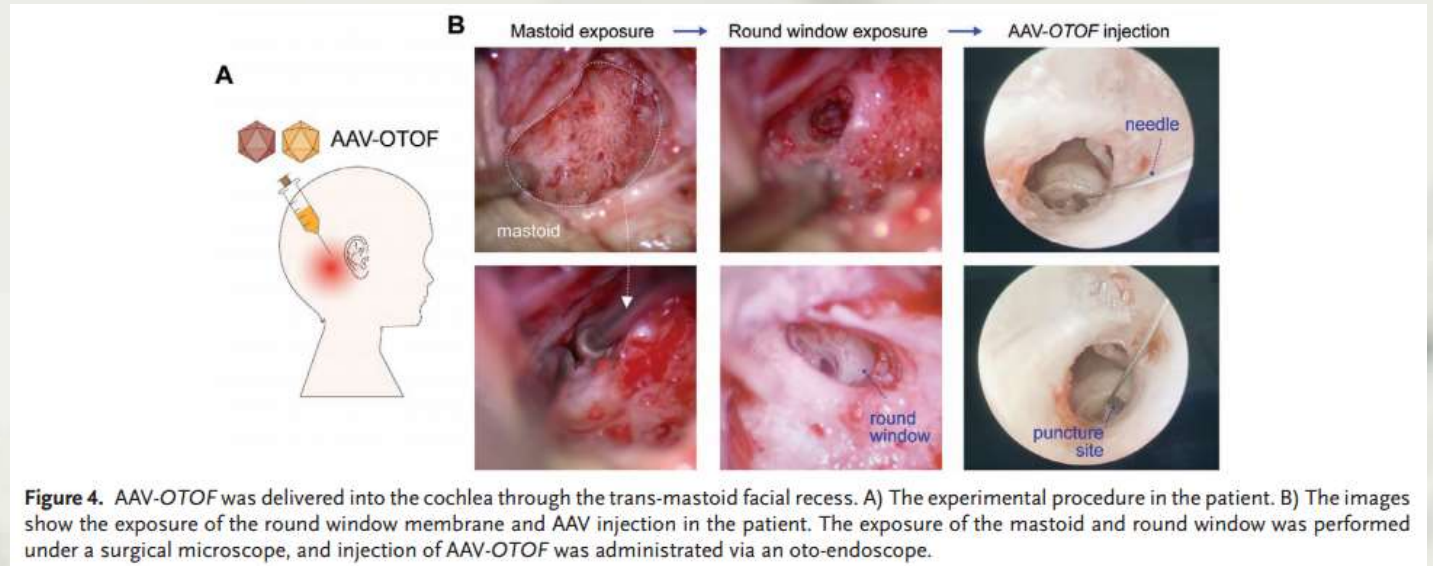


Figure 1. Experimental design. A) Human *OTOF* expression method. Full-length *OTOF* was packaged into dual AAV vectors and acquired by DNA recombination via the AK sequence and RNA trans-splicing via the splicing donor (SD) and splicing acceptor (SA) after delivery. *OTOF* expression was driven by the mouse hair cell-specific promoter. The therapeutic AAVs were manufactured in accordance with the GMP level. B) The experimental and therapeutic design of AAV-*OTOF* therapy in mice, cynomolgus macaques, and patients with *OTOF* mutations.

La grandezza dell'inserto supera quella massima trasportabile dall'adenovirus, pertanto è necessario sfruttare due vettori per somministrare la terapia completa. L'esperimento è stato condotto innanzitutto su cavie, poi su macachi ed infine su due pazienti di 5 e 8 anni.

Osservazioni successive all'intervento:

- Valutazione delle risposte immunitarie in vari distretti dell'organismo,
- Dopo 2 settimane dall'intervento il bambino presenta scarsi risultati col test di DPOAE (Distortion Product OtoAcoustic Emission). Il test genera con frequenza falsi negativi,
- Microfonazioni cocleari,
- Valutazione click Auditory Brain Response,



- Nel mese successivo il bambino è in grado di rispondere alle domande senza l'ausilio dell'impianto cocleare,
- A tre mesi dall'iniezione la capacità uditiva è migliorata a tutte le frequenze,
- Nella seconda paziente di 8 anni, nello stesso arco di tempo, l'udito è migliorato ma in modo asimmetrico.

A sinistra : Opal, una delle pazienti curate dalla terapia genica



Conclusioni

- I diversi tipi di sindrome di Usher sono le patologie sindromiche autosomiche recessive più diffuse, ed oltre a causare perdita dell'udito minacciano la vista,
- EYA, SIX₁ e SIX₅ sono coinvolti nello sviluppo dell'embrione e variazioni dei loro prodotti compromettono lo sviluppo degli archi branchiali, dell'orecchio interno e medio, nonché la nefrogenesi.
- La sindrome di Mohr-Tranebjærg, la più famosa malattia uditiva legata al cromosoma X, oltre a danneggiare l'udito altera una traslocasi particolarmente espressa nelle cellule di Purkinje provocando disturbi psichici progressivi,
- L'esposizione a certi antibiotici può danneggiare l'udito di individui suscettibili a mutazioni di MT-RNR₁,
- La terapia genica AAV-OTOF ha mostrato buoni risultati nei pazienti trattati, che sono tornati a produrre Otoferlina funzionante senza particolari effetti collaterali,
- Sono necessarie ancora valutazioni sulla tossicità nel lungo periodo, e la durata dell'effetto.

Riassunto

La sordità è una disabilità che affligge circa un nato ogni 500. L'80% dei neonati in età prelinguistica la sviluppa per cause genetiche. Sebbene la maggior parte delle malattie legate all'udito siano non sindromiche, non si possono dimenticare le altre che compromettono altri organi dell'individuo come gli occhi, i reni ed il cervelletto. Le mutazioni colpiscono sia gli autosomi che il cromosoma X, e pure il genoma mitocondriale. Ad oggi l'impianto cocleare è l'alternativa più sfruttata per il trattamento dei malati, ma si stanno studiando terapie geniche alternative tra cui l'AAV-OTOF la quale sembra non avere effetti collaterali.

Bibliografia

- [Genetic Hearing Loss Overview - GeneReviews® - NCBI Bookshelf](#)
- [Usher Syndrome Type II - GeneReviews® - NCBI Bookshelf](#)
- [Branchiootorenal Spectrum Disorder - GeneReviews® - NCBI Bookshelf](#)
- [Deafness-Dystonia-Optic Neuropathy Syndrome - GeneReviews® - NCBI Bookshelf](#)
- [Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial - GeneReviews® - NCBI Bookshelf](#)
- [The natural history, clinical outcomes, and genotype–phenotype relationship of otoferlin-related hearing loss: a systematic, quantitative literature review | Human Genetics](#)
- [AAV-Mediated Gene Therapy Restores Hearing in Patients with DFNB9 Deafness](#)
- [Deafness Dystonia Optic Neuropathy Syndrome – A Case Report](#)
- [Mitochondrial DNA mutations associated with aminoglycoside induced ototoxicity](#)
- [Molecular basis of human Usher syndrome: Deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease - ScienceDirect](#)
- [Retinite pigmentosa \(RP\)](#)
- [Amminoglicosidi - Wikipedia](#)
- [Sindrome Branchio Oto Renale bor](#)
- [Aminoglycoside Ototoxicity Pathway, Adverse Drug Reaction](#)
- [Pioneering gene therapy restores UK girl's hearing](#)
- [UniProt](#)