

University of Groningen

## Investigating the genetic complexity of glaucoma

Lo Faro, Valeria

DOI:  
[10.33612/diss.216689872](https://doi.org/10.33612/diss.216689872)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Lo Faro, V. (2022). *Investigating the genetic complexity of glaucoma*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.216689872>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*



CHAPTER 8

**Summary / Samenvatting**



## Summary

Glaucoma is an age-related chronic eye disease that damages the optic nerve, a cranial nerve that is pivotal for vision. Primary open-angle glaucoma (POAG) represents the most prevalent type of this disease and its prevalence varies between populations. It ranges from 1 to 4% in Europe and from 2 to 7% in African countries in adults aged 40 years and over. The condition is asymptomatic in its early stages, a peculiarity that explains why most of the cases are initially unaware of having this disease and are left undiagnosed. Many risk factors for POAG have been recognised. The most widely acknowledged include: advanced age, elevated intraocular pressure, having African descent, positive family history of glaucoma, and thin central corneal thickness. Genetic studies conducted in twins, families, and populations revealed that POAG is a heterogeneous complex disease with a large heritable component. So far, despite the vast and constantly increasing genetic investigation, the identified loci explain only 10% of POAG risk, predominately in European and Asian populations. For this reason, in individuals of African ancestry most of the variants already identified do not seem to play a role in the disease, which suggests a population-specific genetic architecture. Clearly, there is still a large portion of missing and hidden heritability to be found. The aim of the research presented here was to investigate different genetic risk factors contributing to glaucoma susceptibility that may explain part of the missing heritability. The sources of these risk factors included the analysis of ethnic risk, common variants, mutations, variations in copy number in the nuclear and analysis of mitochondrial genome.

In **Chapter 1**, I provided a general introduction to glaucoma, with major emphasis on the genetics, and descriptions of the aims of the studies described in the individual chapters.

In **Chapter 2**, we examined the difference in POAG presentation across Black, Coloured sub-Saharan, and Dutch populations. The results showed that Black sub-Saharan glaucoma patients present more severe symptoms, such as a lower visual acuity, and higher intraocular pressure at a younger age than Coloured sub-Saharan and Dutch participants. This clearly indicates a faster, and more destructive, course of glaucoma in Black Sub-Saharan Africans and shows the urgency of making strategic and effective plans of glaucoma prevention in African regions.

In **Chapter 3**, through a candidate gene sequencing approach, we investigated the genetic causes of the Axenfeld–Rieger syndrome (ARS), a secondary form of glaucoma. ARS is a disease that is inherited in an autosomal dominant manner; it leads to the development of glaucoma in approximately 50% of cases. In ARS patients of Caucasian descent, mutations as well as deletions and duplications in the *FOXC1* and *PITX2* genes have been identified. The purpose of this study was to identify causal mutations in patients affected by ARS from Pakistan and Mexico. We identified novel heterozygous mutations in the *PITX2* gene that segregated with the ARS phenotype within the families, a discovery that allows an extension of the spectrum of mutations in individuals with ARS, and enables an improved diagnosis of this syndrome in the studied population.

In **Chapter 4**, we analysed whether genomic rearrangement in the DNA, called copy number variations (CNVs), are implicated in biological mechanisms underlying POAG. CNVs are

distributed in the whole genome and represent an important source of genetic variation (around 12%). CNVs can encompass many genes or regulatory sequences and they exert their influence by modifying gene expression. In this study, the involvement of CNVs in POAG was approached with different analyses, such as burden analysis, CNV-genome-wide association analysis, gene set overrepresentation, and pathway analysis. Our results showed a greater burden of CNVs in POAG cases compared to controls, and identified associations with 11 genes (*APC*, *BRCA2*, *COL3A1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *MFSD8*, *NIPBL*, *SCN1A*, *SDHB*, and *ZDHHC11*). Functional annotation and pathway analysis suggested the role of cadherin, Wnt signalling, and p53 pathways. These findings clearly show that CNVs have a role in the susceptibility of POAG and that they can reveal further information on the biological mechanisms behind this disease.

In **Chapter 5**, we aimed to determine if there was an association between variants in the mitochondrial DNA (mtDNA) and POAG, contrary to the majority of the genetic studies that aim to identify the causes of the disease by focusing exclusively on the nuclear genome. Here, we postulated that at least a part of the POAG heritability can be found in variants in the mtDNA. We identified an association between POAG and polymorphisms in the mitochondrial genes *MT-ND4* and *MT-CYB*, and estimating mitochondrial haplogroups, we found the haplogroup **K** being significant in an association analysis. Mutations in both genes can destabilise the complex I activity bringing an increase of reactive oxygen species levels in the retinal ganglion cells, the ones that are typically damaged by glaucoma progression. Regarding the haplogroup analysis, we observed that individual carriers of haplogroup **K** showed greater visual loss. Our study provided evidence that mitochondrial genome variations are implicated in POAG aetiology.

In **Chapter 6**, we aimed to determine the genetic mechanisms underlying POAG by meta-analysing GWAS data of 15 biobanks (n = 1,487,447), spanning four continents and six ancestries. We found 18 genome-wide significantly associated novel loci, three of which are ancestry-specific. We also identified five sex-specific novel loci, four of which are African-specific and one European-specific. To explore biological implications, we performed enrichment, prioritisation, and transcriptome-wide association studies and found genes related to vascular-related function and cancer in POAG. Interestingly, a fifth of prioritised genes were primary ciliary related genes. Our findings suggest that some POAG risk variants may be ancestry-specific and sex-specific. These results further support the contribution of vascular and cell proliferation genes in POAG and suggest potential involvement of primary cilia in its pathogenesis.

In **Chapter 7**, the main findings reported in the chapters of this thesis are presented together with the challenges that researchers are facing. In addition, I proposed future direction on glaucoma research.

## Samenvatting

Glaucoom is een leeftijdsgebonden chronische oogziekte die de oogzenuw beschadigt. De oogzenuw is een hersenzenuw die cruciaal is voor het gezichtsvermogen. Er zijn meerdere vormen van glaucoom. Primair open kamerhoek glaucoom (POAG) is het meest voorkomende type en daarover gaat het in dit proefschrift. De prevalentie van POAG varieert van 1 tot 4% in Europa en van 2 tot 7% in Afrikaanse landen bij volwassenen van 40 jaar en ouder. De aandoening is in een vroeg stadium asymptomatisch, wat verklaart dat de meeste patiënten zich aanvankelijk niet bewust zijn van het hebben van deze ziekte en niet gediagnosticeerd worden. Er zijn een aantal risicofactoren voor POAG bekend. De meest algemeen erkende zijn hoge leeftijd, verhoogde intraoculaire druk, Afrikaanse afkomst, positieve familie-anamnese voor glaucoom en een dun hoornvlies. Genetische studies uitgevoerd bij tweelingen, families en in populaties toonden aan dat POAG een complexe ziekte is, waarbij erfelijkheid een grote rol speelt. Tot dusver verklaren de geïdentificeerde genetische loci, ondanks uitgebreid en intensief onderzoek in met name Europese en Aziatische populaties, slechts 10% van het risico op POAG, in deze populaties. De meeste van de reeds geïdentificeerde varianten in voornoemde populaties spelen bij individuen van Afrikaanse afkomst geen rol bij de ziekte. Dit wijst op een populatie-specifieke genetische architectuur van POAG. Het is inmiddels duidelijk dat er nog een groot deel van de erfelijkheid van POAG onbekend is. Het doel van het hier gepresenteerde onderzoek was om verschillende genetische risicofactoren te onderzoeken die bijdragen aan glaucoom, en die het nog niet bekende deel van de erfelijkheid (deels) zouden kunnen verklaren. Hiertoe verrichten wij POAG relevante analyses van het etnisch risico, van veel voorkomende varianten, van mutaties, van variaties in het aantal kopieën in het nucleair genoom en van het mitochondriaal genoom.

In **Hoofdstuk 1** geef ik een algemene inleiding over glaucoom, met grote nadruk op de genetica, en beschrijvingen van de doelstellingen van de onderzoeken die in de afzonderlijke hoofdstukken worden beschreven.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we het verschil in POAG-presentatie tussen zwarte en gemixte sub-Sahara populaties en een Nederlandse populatie. De resultaten toonden aan dat zwarte sub-Sahara glaucoompatiënten op jongere leeftijd ernstiger symptomen vertonen, zoals een lagere gezichtsscherpte en een hogere intraoculaire druk, dan gemixte sub-Sahara en Nederlandse glaucoompatiënten. Dit wijst duidelijk op een sneller en destructiever verloop van glaucoom bij zwarte sub-Sahara Afrikanen. Het toont de urgentie aan van het maken van strategische en effectieve plannen voor de preventie van glaucoom in specifieke Afrikaanse regio's.

In **Hoofdstuk 3** hebben we, door middel van een kandidaat-gen-sequencing benadering, de genetische oorzaken van het Axenfeld-Rieger syndroom (ARS), een secundaire vorm van glaucoom, onderzocht. ARS is een ziekte die autosomaal dominant wordt overgeërfd; het leidt in ongeveer 50% van de gevallen tot de ontwikkeling van glaucoom. Bij ARS-patiënten van blanke afkomst zijn zowel mutaties als deleties en duplicaties in de *FOXC1*- en *PITX2*-genen geïdentificeerd. Het doel van deze studie was om causale mutaties te identificeren bij patiënten met ARS uit Pakistan en Mexico. We identificeerden nieuwe heterozygote mutaties in het *PITX2*-

gen die segregeerden met het ARS-fenotype binnen de families. Deze ontdekking breidt het spectrum van mutaties bij individuen met ARS uit. Dit geeft meer inzicht in de etiologie van ARS, en leidt tot een verbeterde diagnose en genetische counselling van dit syndroom.

In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of genetische herschikkingen in het DNA, genaamd ‘copy number variations’ (CNV's), betrokken zijn bij biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan POAG. CNV's komen verspreid voor over het hele genoom en vormen een belangrijke bron van genetische variatie (ongeveer 12%). CNV's kunnen veel genen of regulerende sequenties bevatten en ze oefenen hun invloed uit door genexpressie te wijzigen. In dit hoofdstuk werd de betrokkenheid van CNV's bij POAG bekeken met verschillende analyses, zoals impact-analyse, CNV-genoombrede associatie analyse, oververtegenwoordiging van genen sets en biochemische route analyses. Onze resultaten toonden een grotere impact van CNV's in POAG-patiënten in vergelijking met controles. Wij identificeerden associaties met 11 genen (*APC*, *BRCA2*, *COL3A1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *MFSB8*, *NIPBL*, *SCN1A*, *SDHB* en *ZDHC11*). Functionele annotatie en biochemische route analyses suggereerden dat cadherine, Wnt-signalering en p53-routes een rol spelen bij POAG. Deze bevindingen laten duidelijk zien dat CNV's een rol spelen bij POAG en dat ze informatie kunnen blootleggen met betrekking tot de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan deze ziekte.

In **Hoofdstuk 5** wilden we bepalen of er een verband was tussen varianten in het mitochondriaal DNA (mtDNA) en POAG, als aanvulling op de meerderheid van de genetische studies die gericht zijn op het identificeren van de oorzaken van de ziekte door uitsluitend te focussen op het nucleaire genoom. Onze hypothese was dat in ieder geval een deel van de POAG-erfelijkheid veroorzaakt wordt door varianten in het mtDNA. We identificeerden een associatie tussen POAG en polymorfismen in de mitochondriale genen *MT-ND4* en *MT-CYB*. Bij het bestuderen van mitochondriale haplogroepen vonden we dat de haplogroep K significant geassocieerd was met POAG. Mutaties in beide genen kunnen de activiteit van het mitochondriale Complex I destabiliseren, wat leidt tot een toename van de niveaus van vrije zuurstofradicalen in de retinale ganglioncellen; de cellen die beschadigd worden bij glaucoom. Met betrekking tot de haplogroepanalyse hebben we gevonden dat individuele dragers van de mitochondriale haplogroep K een ernstiger visueel verlies hadden. Onze studie leverde bewijs dat mitochondriale genoomvariaties betrokken zijn bij POAG.

In **Hoofdstuk 6** wilden we de genetische mechanismen bepalen die ten grondslag liggen aan POAG door een meta-analyse uit te voeren van GWAS-gegevens van 15 biobanken (n = 1.487.447) verspreid over vier continenten en zes etnische groepen. We vonden 18 genoombreed-significant geassocieerde nieuwe SNPs, waarvan er drie etnisch-specifiek zijn. We identificeerden ook vijf geslachtsspecifieke nieuwe loci, waarvan vier Afrikaans-specifiek en één Europees-specifiek. Om biologische implicaties te onderzoeken, hebben we verrijking, prioritering en transcriptoom-brede associatiestudies uitgevoerd en genen gevonden die verband houden met vasculaire functie en kanker in POAG. Interessant is dat een vijfde van de geprioriteerde genen primaire ciliair-gerelateerde genen waren. Onze bevindingen suggereren dat sommige POAG-risicovarianten etnisch- en/of geslachtsspecifiek kunnen zijn. Deze resultaten

ondersteunen verder de bijdrage van vasculaire en celproliferatiegenen in POAG en suggereren mogelijke betrokkenheid van primaire trilharen bij de pathogenese ervan.

In **Hoofdstuk 7** worden de belangrijkste bevindingen samengevat die in de hoofdstukken van dit proefschrift gepresenteerd zijn, samen met de uitdagingen waarmee onderzoekers worden geconfronteerd. Daarnaast heb ik toekomstige richtingen voor genetisch glaucoomonderzoek voorgesteld.





