

Paper of the month, January 2015

CRIM1 haploinsufficiency causes defects in eye development in human and mouse.

Beleggia F, Li Y, Fan J, Elcioğlu NH, Toker E, Wieland T, Maumenee IH, Akarsu NA, Meitinger T, Strom TM, Lang R, Wollnik B.

Hum Mol Genet. 2015 Jan 5. [Epub ahead of print]

Die technologischen Fortschritte der Hochdurchsatz-Sequenzierung haben in den letzten Jahren die Identifikation seltener Erkrankungen revolutioniert. Inzwischen ist die Ganz-Exom-Sequenzierung die Standard-Methode zur Klärung unklarer genetischer Defekte. Eine besondere Stärke dieser Methode ist die Identifikation von Einzelnukleotid-Varianten. Insertionen und Deletionen (sog. Indels) sind deutlich schwieriger zu detektieren. Dies gilt besonders für Indels, deren Länge über der verwendeten Read-Länge liegen. Zu dieser Gruppe gehören in der Regel auch Kopienzahlvariationen (Copy number variants, CNVs), also Deletionen oder Duplikationen von ≥ 1 kb. Diese können mit ganz unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert sein, beispielsweise mit Schizophrenie oder – im Falle von somatischen CNVs – Malignomen. Traditionell werden CNVs mit Array-basierten Verfahren wie dem aCGH oder SNP Microarrays diagnostiziert. Zunehmend setzt sich jedoch auch hier Ganz-Exom- oder sogar Ganz-Genom-Sequenzierung durch. Dabei werden verschiedene analytische Ansätze verwandt: Endpaar-Sequenzierung (paired-end mapping), die Analyse der Bruchpunkte der CNVs (split-read analysis), der Sequenz-Assemblierung (sequence assembly) oder die Sequenziefen-Analyse (read-depth analysis).

Die Anwendung einer dieser Strategien wird beispielhaft von der Gruppe um Bernd Wollnik vom FACE-Net demonstriert. In einer aktuellen Arbeit klären sie auf diese Weise die genetische Grundlage einer neuen kraniofazialen Entwicklungsstörung. Ausgangspunkt ist eine große Familie mit einem seltenen Dysmorphie-Syndrom, der sg. kolomatösen Makrophthalmie mit Mikrokornea-Syndrom (MACOM). Im den Daten der Ganz-Exom-Sequenzierung fanden sich keine Einzelnukleotid-Varianten oder kleinen Indels, welche mit dem Phänotyp segregierten. In der anschließend durchgeführten Sequenziefen-Analyse hingegen fand sich eine perfekt segregierende, heterozygote 22kb-Deletion in *CRIM1*. Dieses Gen spielt sowohl eine Rolle als Wachstumsfaktor als auch bei der Zelladhäsion. Der Defekt wurde durch eine fehlende Expression des Gens sowie Analyse der Bruchpunkte weiter charakterisiert. Die Kausalität konnte schließlich in einem anderen Modell bestätigt werden: *Crim1* Knockout-Mäuse weisen einen sehr ähnlicher Phänotyp auf.

Es ist anzunehmen, dass CNVs eine deutlich größere Rolle bei der Pathogenese sowohl seltener als auch häufiger Erkrankungen spielen, als bislang vermutet. Die entsprechende Analyse großer Patienten-Kollektive sollte in den kommenden Jahren neben der Identifikation neuer Erkrankungen auch zu wichtigen Erkenntnissen in den Grundlagen-Wissenschaften führen, beispielsweise hinsichtlich der Rolle von CNVs in unserer Evolution.

The technological advances in high throughput sequencing have revolutionized the identification of rare diseases. Nowadays, whole-exome sequencing is the standard method to clarify uncertain genetic defects. A particular strength of this method is the identification of single nucleotide variants. Insertions and deletions (so-called indels) are significantly more difficult to detect. This is especially true for indels whose length exceeds the usual sequencing read-length. Importantly, it also applies for copy number variants (CNVs), i.e. deletions or duplications of ≥ 1 kb. These can be associated with many different diseases, such as schizophrenia or - in the case of somatic CNVs - malignancies. Traditionally, CNVs are diagnosed using array-based methods such as aCGH or SNP microarrays. However, nowadays whole exome or even whole-genome sequencing is gaining ground. Various analytical approaches are used: paired-end mapping, split-read analysis, sequence assembly and read-depth analysis.

The group around Bernd Wollnik from FACE-Net nicely shows the application of one of these strategies in a recent paper in which they identify the genetic basis of a new craniofacial developmental disorder. The starting point was a large family with a rare dysmorphic syndrome, colobomatous macrophthalmia with microcornea syndrome (MACOM). In the whole-exome sequencing data set, there were no single nucleotide variants or small indel that segregated with the phenotype. Subsequently, they performed read-depth analysis and identified a perfectly segregating heterozygous 22kb deletion in *CRIM1*. This gene plays a role in cell adhesion and can function as a growth factor. The deleterious nature of the mutation was confirmed by split-read analysis, moreover the patient lack expression of *CRIM1*. Finally, causality was proven in a different model: *Crim1* knockout mice exhibit a very similar phenotype.

It can be assumed that CNVs play a much larger role in the pathogenesis of both rare and common diseases than previously suspected. The corresponding analysis of large patient collectives in the coming years should lead to the identification of several new diseases. Moreover, it should also lead to important insights into more basic processes such as the role of CNVs in human evolution.

Comment by

Dr. Tilmann Schober, Dr. von Hauner Children's Hospital, Ludwig Maximilians University Munich
tilmann.schober@med.uni-muenchen.de