

Paper of the month, June 2015

Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia.

Kohl S, Zobor D, Chiang WC, Weisschuh N, Staller J, Menendez IG, Chang S, Beck SC, Garcia Garrido M, Sothilingam V, Seeliger MW, Stanzial F, Benedicenti F, Inzana F, Héon E, Vincent A, Beis J, Strom TM, Rudolph G, Roosing S, Hollander AI, Cremers FP, Lopez I, Ren H, Moore AT, Webster AR, Michaelides M, Koenekoop RK, Zrenner E, Kaufman RJ, Tsang SH, Wissinger B, Lin JH.

Nat Genet. 2015 Jul;47(7):757-65. Epub 2015 Jun 1

Nach aktuellen Schätzungen gibt es etwa 7000 seltene Erkrankungen, bei weit über der Hälfte davon ist die genetische Grundlage inzwischen bekannt. Grund genug inne zu halten und darüber nachzudenken, wie es dazu kam und wie die Entwicklung in Zukunft weiter gehen könnte. Eine wichtige Rolle spielen zwangsläufig die jeweils verfügbaren Technologien. Seit den 1980er Jahren wurden neue Gene meist durch ein ähnliches Vorgehen identifiziert: Identifikation informativer Familien, Kopplungsanalysen zur Lokalisation des Zielgens, ggf. positionales Klonieren sowie anschließend Sanger-Sequenzierung. Besonders die Lokalisierung wurde in der Folge verbessert, u.a. durch SNP-Array basiertes Homozygotitäts-Mapping. Letzteres ist vor allem bei rezessiven Erkrankungen in konsanguinen Familien hilfreich. Es kann jedoch auch bei nicht-konsanguinen Familien helfen, bei denen es im Rahmen von Identität durch Abstammung (identity by descent) zu kausalen homozygoten Varianten kommt. Der Entwurf des humanen Genoms von 2001 und die Etablierung von genomweiten Referenzsequenzen war die Grundlage für die folgende Entwicklung der Hochdurchsatzsequenzierungen. 2009 wurde die erste monogenetische Erkrankung durch Ganz-Exom-Sequenzierungen entschlüsselt, seitdem folgen beinahe täglich weitere. Ganz-Exom-Sequenzierungen sind inzwischen Standard in der Identifikation neuer genetischen Erkrankungen. Der nächste Schritt ist die Ganz-Genom-Sequenzierung, um auch Mutationen in den nicht-kodierenden Abschnitten zu entschlüsseln. Die Analyse und Validierung der Varianten ist hier nochmals komplexer, sinnvoll erscheint daher die gemeinsame Analyse mit weiteren „Omics“-Daten, beispielweise des Transkriptoms.

Eine sehr sorgfältige, aktuelle Arbeit von Kohl und Kollegen aus dem HOPE-Net zeigt beispielhaft das Vorgehen bei der Identifikation neuer seltener Erkrankungen. Da das Projekt vor vielen Jahren begonnen wurde, bildet es auch durchaus die geschilderte geschichtliche Entwicklung ab. Ausgangspunkt ist eine Familie mit einer unklaren seltenen Augenerkrankung, Achromatopsie. Bekannte Achromatopsie-Gene wurden per Sanger-Sequenzierung ausgeschlossen. Eine Kopplungsanalyse ergab mehrere potentielle Regionen. Diese wurden durch Homozygotitäts-Mapping weiter eingegrenzt. Die Gruppe führte nun beim Indexpatienten eine Ganz-Exom-Sequenzierung durch, Fokus der Analyse lag auf dem zuvor eingegrenzten Areal. Die Kandidatengene wurden per Sanger-Sequenzierung bestätigt und die Segregation in der Familie überprüft. Mutationen in einem Gen namens *ATF6* konnten in insgesamt 18 Patienten aus 10 Familien festgestellt werden. Diese wurden gründlich ophthalmologisch phänotypisiert. Zum Beweis der Kausalität wurden funktionelle Tests des Gens in primären Patientenzellen durchgeführt. Der Defekt

wurde in einer modifizierten humanen Tumorzelllinie bestätigt. Den abschließenden Beweis erbrachte die Gruppe in *ATF6*-defizienten Mäusen.

Die Arbeit zeigt auch, dass die Validierung kausaler Mutationen inzwischen deutlich aufwändiger ist als deren Identifikation und dies wird sich auch in den nächsten Jahren aller Voraussicht nach nicht ändern.

According to current estimates, there are about 7,000 rare diseases; the genetic basis is known in over half of them. This is reason enough to pause and reflect upon how this was achieved and how the development could go on in the future. Inevitably, the available technologies play an important role in such a reflection. Since the 1980s, new genes were identified through a similar approach: identification of informative families, linkage analysis for localization of the target gene, possibly positional cloning and finally Sanger sequencing. In the following years, especially means of localization have been improved, this includes SNP array-based homozygosity mapping. This is particularly useful for recessive diseases in consanguineous families. However, it can also help with non-consanguineous families in which causative homozygote variants can occur in the context of identity by descent. The draft of the human genome in 2001 and the establishment of genome-wide reference sequences was the basis for the subsequent development of high-throughput sequencing. In 2009, the first monogenic disease was identified using whole-exome sequencing. Since then, new diseases are published nearly every day. Nowadays, whole-exome sequencing is the standard in the identification of new genetic diseases. The next step is the whole-genome sequencing which has the potential to detect mutations in the noncoding part of our genome. The analysis and validation of the identified variants is very complex, one reasonable approach is the joint analysis with other omics-data, such as transcriptomics.

A recent, very careful work from Kohl and colleagues from the HOPE-Net shows the procedure for identification of new rare diseases nicely. Since the project was started many years ago, it also covers some of the described development. The starting point is a family with an unexplained rare eye disease, so called achromatopsia. Known achromatopsia genes were excluded by Sanger sequencing. Linkage analysis revealed several potential regions of interest. These were narrowed down by homozygosity mapping. Next, the group performed whole-exome sequencing with a focus on the previously localized area. Segregation of candidate genes in the family was confirmed by Sanger sequencing. One gene, *ATF6*, could also be identified in other patients, in total 18 patients from 10 families. These were thoroughly phenotyped. For proof of causality functional tests of the gene were performed in primary patient cells. The observed functional defect was confirmed in a modified human tumor cell line. Final evidence was provided by the generation and ophthalmological characterization of *ATF6*-deficient mice.

The work also shows that the validation of causal mutations has become more complicated than their identification. And most certainly, this will not change in the years to come.

Comment by

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