

Projektbericht:

Identifizierung neuer Krankheitsgene für isolierte und syndromale Retinopathien

Prof. Dr. med. Hanno Jörn Bolz

EXPOSEE

Im Folgenden fasse ich die Ergebnisse aus unserem von der Stiftung Auge geförderten Projekt zusammen. Zur besseren Übersicht habe ich dies in abgeschlossene (I) und noch laufende (II) Projekte unterteilt. Aus den abgeschlossenen Projekten resultierten Artikel, die bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht wurden (British Journal of Ophthalmology, IF 2.976; eLife, IF 9.322) oder sich nach jeweils positiver Begutachtung im Revisionsverfahren und vermutlich kurz vor der Veröffentlichung befinden (Human Mutation, IF 5.34; Invest Ophthalmol Vis Sci, IF 3.404). Wir konnten jetzt mehrere neue Gene für retinale Krankheitsgene identifizieren und darüberhinaus neue Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge definieren. Beides erweitert die Möglichkeiten der Diagnostik, legt aber durch einen verbesserten Einblick in die Pathomechanismen (so stellte sich bei einigen Phänotypen heraus, dass es sich um retinale Ziliopathien handelt) hoffentlich auch die Grundlage für therapeutische Strategien. Beides geht z.B. im Falle unserer Arbeit zu einem neuen Syndrom, das auf PEX6-Mutationen beruht, „Hand in Hand“. Hier resultiert aus der Identifizierung der genetischen Ursache unmittelbar eine therapeutische Option (Phytansäure-arme Diät). In den noch laufenden Projekten wurden neue Genorte – und in einigen Fällen vermutlich neue Gene – für Netzhauterkrankungen identifiziert. Diese vorläufigen Ergebnisse werden gegenwärtig durch weitere (u.a. funktionelle) Untersuchungen ergänzt.

I ABGESCHLOSSENE PROJEKTE

1. *PEX6*-Mutation verursacht ein neues Syndrom mit Retinopathie, Hörstörung und Zahnschmelzdefekten (in Revision, *Human Mutation*)

Wir identifizierten eine konsanguine ägyptische Familie, in der zwei Geschwister Usher-Syndrom-typische Symptome (angeborene Taubheit, RP), aber auch darüberhinausgehende Auffälligkeiten (Mikrozephalie, Entwicklungsverzögerung etc.; [Abb. 1](#)), insbesondere massive Zahnschmelzdefekte, zeigen ([Abb. 2](#)). Durch die Kombination von genetischer Kopplungsuntersuchung und Exom-Sequenzierung identifizierten wir jetzt die ursächliche Mutation im *PEX6*-Gen. Das Manuskript wurde bei *Human Mutation* positiv begutachtet, wird in Kürze in revidierter Fassung wieder eingereicht und voraussichtlich noch 2015 publiziert.¹ Interessant sind vor allem zwei Ergebnisse dieser Studie:

- a) *PEX6*-Mutationen beeinträchtigen die Funktion wichtiger Zellorganellen, der Peroxisomen, und verursachen das früh-letale Zellweger-, aber auch das mit dem Überleben vereinbare Refsum-Syndrom (diese Erkrankungen werden als *peroxisome biogenesis disorders*, PBD, zusammengefasst). Das Refsum-Syndrom geht mit Netzhautdystrophie und Hörstörung einher und kann somit dem Usher-Syndrom ähneln. Die Zahnschmelzdefekte sind jedoch für keine der beiden Erkrankungen typisch. In der Literatur wurden einige Patienten mit Zahnschmelzdefekten, bei denen klinisch entweder ein Usher- oder ein Refsum-Syndrom diagnostiziert worden war, beschrieben. Molekulargenetisch geklärt waren diese Fälle jedoch nicht. Wir gehen davon aus, dass diesen Beschreibungen ebenfalls Mutationen in *PEX6* oder einem verwandten PEX-Gen zu Grunde liegen. Unsere Ergebnisse identifizieren eine wichtige Differentialdiagnose des Usher-Syndroms. Dies ist insbesondere von Bedeutung, weil der Erkrankung durch die Einhaltung einer Phytansäure-armen Diät entgegengewirkt werden kann.
- b) Die Gruppe von Prof. Uwe Wolfrum konnte in unserer Zusammenarbeit überraschend nachweisen, dass *PEX6* wie die Usher-Proteine im Zilium von Photorezeptoren exprimiert ist. Somit handelt es sich bei diesem neuen Syndrom, das ja in Anbetracht der ursächlichen *PEX6*-Mutation zu den PBDs zählt, ebenfalls um eine retinale Ziliopathie. Bisher gab es keine bekannten pathogenetischen Überschneidungen von Peroxisomen-Erkrankungen mit Ziliopathien.

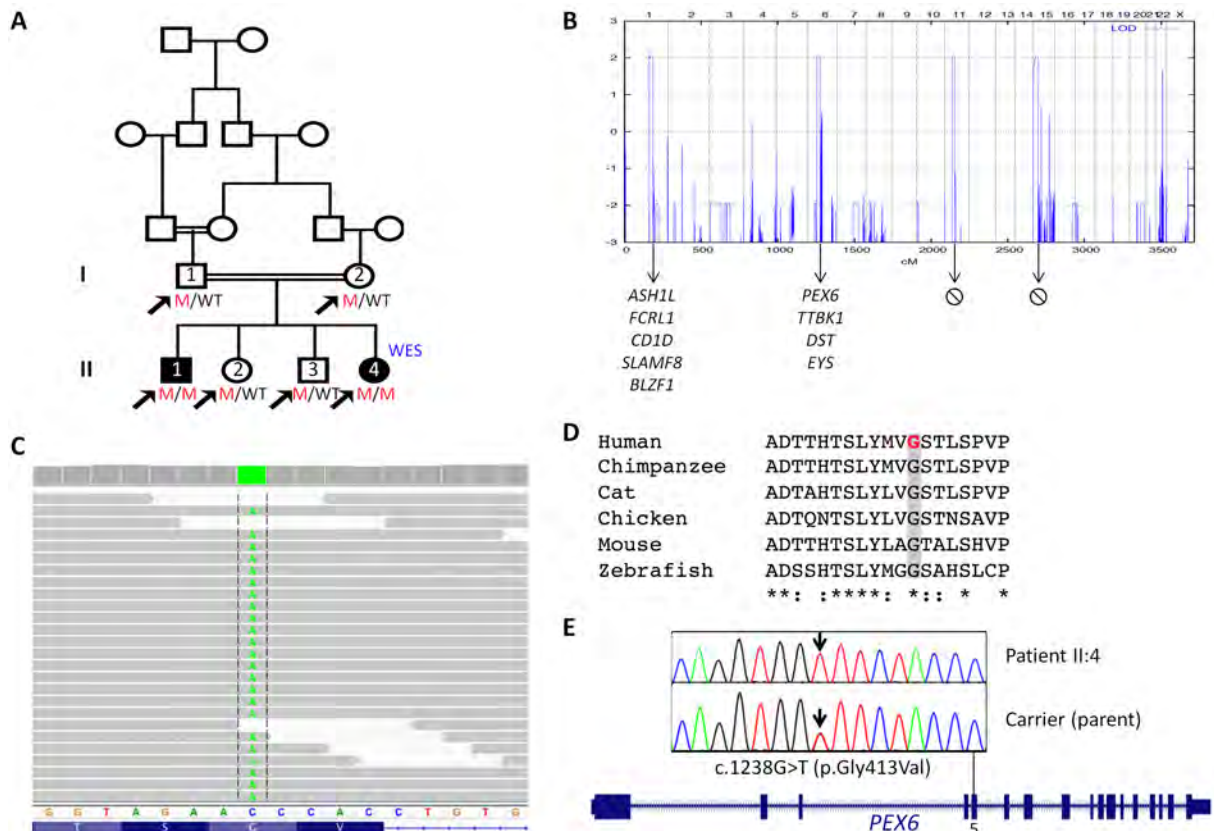


Abb. 1: Genetische Aufklärung einer Familie mit Usher-ähnlichem Syndrom und Zahnschmelzdefekten. **A** Untersuchte Familie. Kreise: weibliche Personen, Quadrate: männliche Personen. Ausgefüllte Symbole: Betroffene Individuen. Horizontale Doppellinie: Konsanguine Partnerschaft. M, Mutation. WT, Normalsequenz („Wildtyp“). Pfeile, Proben gingen in genetische Kopplungsuntersuchung ein. WES, Probe wurde durch Exom-Sequenzierung untersucht. **B** Kandidatenregionen auf den Chromosomen 1, 6, 11 und 15 aus der Kopplungsuntersuchung, sowie Gene dieser Regionen, die in der Exom-Sequenzierung Varianten aufwiesen. **C** Darstellung der ursächlichen *PEX6*-Mutation in der Exom-Sequenzierung. **D** Der Aminosäureaustausch betrifft eine evolutionär hoch konservierte Position. **E** Lokalisation der Mutation innerhalb des *PEX6*-Gens und ihre Darstellung in der konventionellen Sequenzierung.

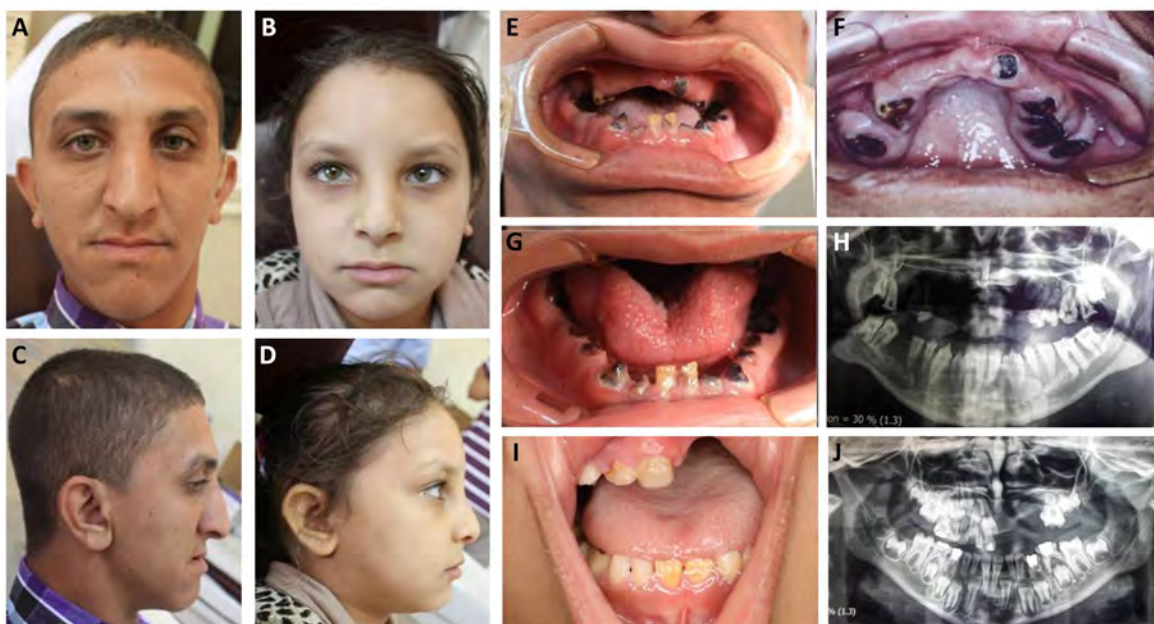


Abb. 2: Geschwister mit Usher-ähnlicher Erkrankung aufgrund einer *PEX6*-Mutation: Leichte faciale Dysmorphiezeichen, Mikrozephalie und Zahnschmelzdefekte.

2. KIAA0586: Neues Gen für das Joubert-Syndrom (akzeptiert; *eLife*)

Das Joubert-Syndrom (JBTS) ist eine überwiegend autosomal-rezessiv vererbte congenitale Erkrankung, der Mutationen in mittlerweile mehr als 20 bekannten Genen zu Grunde liegen. Da diese Gene sämtlich für ziliäre Proteine kodieren, handelt es sich um eine klassische *Ziliopathie*. Entsprechend der Bedeutung primärer Zilien für die embryonale Entwicklung sind die Auswirkung von Mutationen in Joubert-Genen vielfältig: Pathognomonisch ist eine Fehlbildung des Mittelhirns bzw. der Kleinhirnstiele, die im axialen MRT als „Backenzahnzeichen“ (*molar tooth sign*, MTS) imponiert, und eine Entwicklungsverzögerung bis hin zur schweren geistigen Behinderung. Darüberhinaus werden häufig Netzhautdegeneration und Nierenzysten beobachtet.

Im Rahmen einer internationalen Kooperation haben wir durch genomweite Kopplungsuntersuchungen und Exom-Sequenzierungen Mutationen im Gen *KIAA0586* als neue Ursache des JBTS identifiziert (Abb. 3). Wir konnten zeigen, dass das Protein im *connecting cilium* von Photorezeptoren lokalisiert (Zusammenarbeit mit der AG Wolfrum). Die Inaktivierung beider Genkopien führt zu Defekten der Zentrosomen und konsekutiv der Zellpolarität – ein neuer Pathomechanismus für das JBTS. Das Manuskript zu dieser Studie wurde beim renommierten Journal *eLife* am 19.09.2015 akzeptiert und bereits online publiziert (<http://elifesciences.org/content/early/2015/09/19/eLife.08077>).²

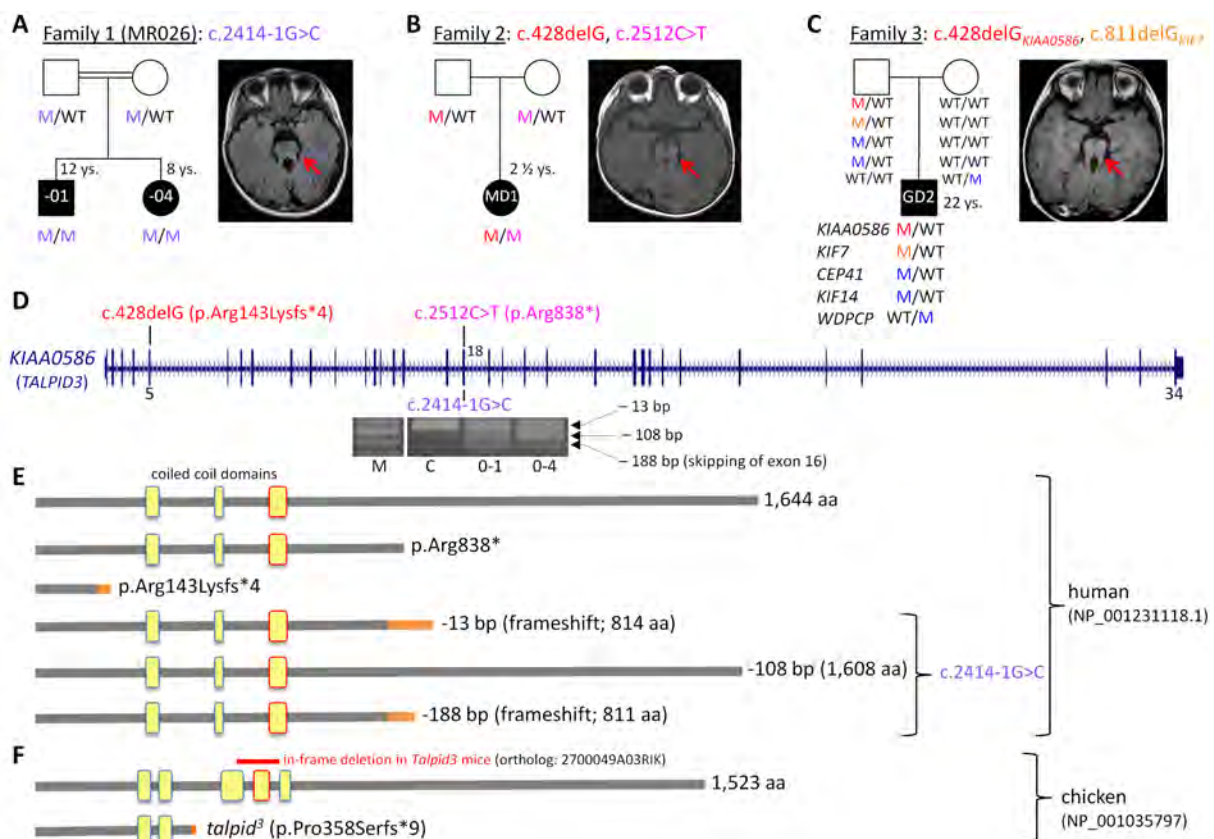


Abb. 3: Mutationen in *KIAA0586* verursachen Joubert-Syndrom. A – C JBTS-Familien mit *KIAA0586*-Mutationen. Bei dem in C gezeigten Patienten liegen in *KIAA0586*, aber auch in anderen JBTS-Genen, die Mutationen nur heterozygot vor, was auf eine oligogene Vererbungsform zurückzuführen sein könnte. D *KIAA0586*-Genstruktur und Lokalisation der Mutationen. Das Agarosegel zeigt die aus der Splicemutation c.2414-1G>C resultierenden aberranten Transkripte (Amplifikation von cDNA). E *KIAA0586*-Proteinschema und Konsequenzen der identifizierten Mutationen auf Proteinebene. F *KIAA0586*-Protein des Huhns, der entsprechenden Mutante (*talpid3*) und Lokalisation der Mutation des Mausmodells.

3. *C21orf2*: Ein neues Gen für isolierte und syndromale retinale Ziliopathien (publiziert im *British J Ophthalmol*)

In einer kürzlichen Exom-Sequenzierungsstudie wurden bei Patienten mit retinalen Dystrophien Mutationen im *C21orf2*-Gen nachgewiesen und das Gen somit als Kandidat für retinale Dystrophien diskutiert.³ Es handelte sich um ein nicht näher charakterisiertes Gen (C21 = auf Chromosom 21 lokalisiert; orf = *open reading frame*, proteinkodierendes Transkript unbekannter Funktion). Wir identifizierten drei saudische Familien, in denen Patienten mit früher Netzhautdegeneration *C21orf2*-Mutationen aufwiesen (Abb. 4). Besonders interessant war der spezifische Phänotyp aller drei Patienten: Alle wiesen eine pathologische makuläre Vorwölbung im Sinne eines Staphyloms auf (Abb. 5) – eine Veränderung, die normalerweise nur als Folge ausgeprägter Myopie auftritt. Keiner der genannten Patienten ist jedoch myop. Einer der Patienten war zusätzlich kleinwüchsig und übergewichtig – Symptome, die in zusammen mit Retinopathien gehäuft bei bestimmten Ziliopathien, insbesondere dem Jeune-Syndrom oder dem Bardet-Biedl-Syndrom, beobachtet werden. Weil zudem eine zellbasierte knockdown-Studie zahlreicher putativer Zilienproteine weitere Indizien für eine ziliäre Lokalisation des orthologen Maus-Proteins (mC21orf2) ergab, wurde die retinale Lokalisation untersucht (AG Wolfrum, Mainz). Dabei bestätigte sich, dass *C21orf2* im Verbindungszilium der Photorezeptoren lokalisiert. Unser Verdacht, dass *C21orf2*-Mutationen nicht nur zu isolierter Retinadystrophie, sondern auch zu syndromalen Formen führen können, wurde durch eine zeitgleich erschienene Arbeit bestätigt: Hier wurden *C21orf2*-Mutationen bei Patienten mit Jeune-Syndrom, die neben ihrer Skelettdysplasie eine Retinopathie hatten, nachgewiesen.⁴ Unsere Arbeit wurde jetzt im *British Journal of Ophthalmology* publiziert.⁵

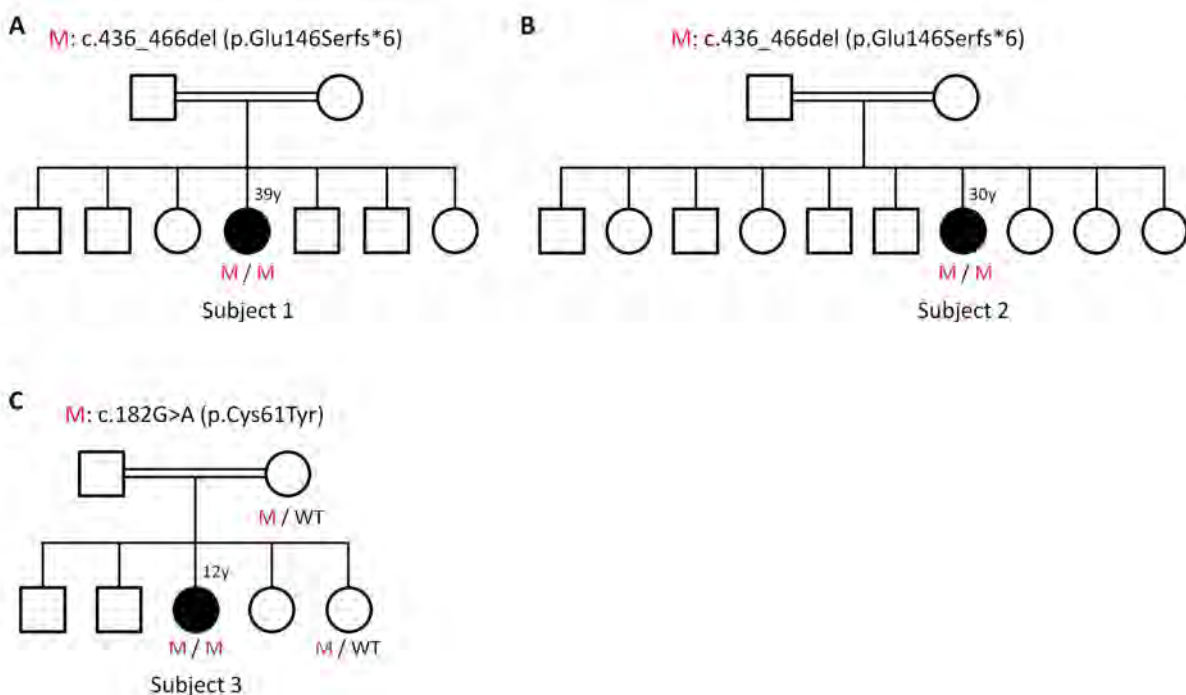


Abb 4. Saudische Familien mit Mutationen im *C21orf2*-Gen. Das betroffene Mädchen in **C** weist zusätzlich zur Retinopathie weitere Auffälligkeiten im Sinne eines Jeune-Syndroms auf.

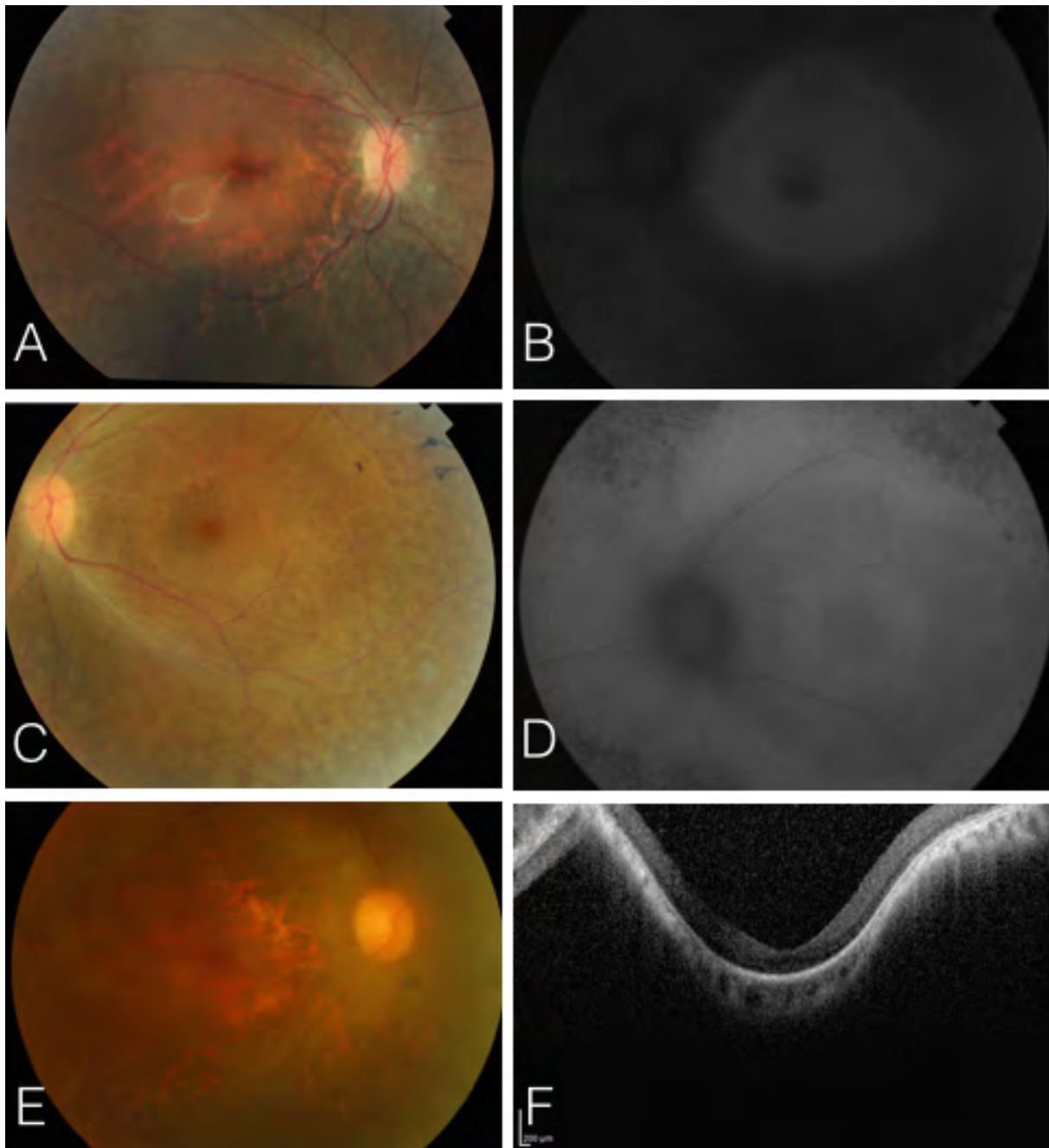


Abb. 5. Klinische/ophthalmologische Präsentation der beschriebenen Patienten mit *C21orf2*-Mutationen (Details s. diesem Bericht angehängter Sonderdruck aus dem *British Journal of Ophthalmology*).

II NOCH LAUFENDE PROJEKTE

Exom-Sequenzierungen und genomweite Kopplungsanalysen

Bei zahlreichen Proben von Patienten mit isolierten oder syndromalen Retinopathien, in denen keine Mutationen in den für den jeweiligen Phänotyp bekannten Genen nachgewiesen wurden, wurde eine Sequenzierung der Exons aller bekannten menschlichen Gene (Exom-Sequenzierung) veranlaßt. Wo Proben weiterer Familienmitglieder vorhanden waren, wurden parallel genomweite Kopplungsanalysen initiiert, deren Ergebnisse noch ausstehen. Aktuell können die schon vorliegenden Ergebnisse wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) In den Exomdaten mehrerer Indexpatienten aus konsanguinen Familien liegen homozygote trunkierende Mutationen in bisher noch nicht mit Retinopathien in Zusammenhang stehenden Genen vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Gene die gesuchten neuen Krankheitsgene darstellen, ist hoch; die Ergebnisse der Kopplungsuntersuchungen zu den jeweiligen Familien werden in Kürze vorliegen und dann zusammen mit funktionellen Analysen eine abschließende Einschätzung erlauben.
- b) Bei einem Patienten fand sich eine homozygote Mutation im *DRAM2*-Gen, das zeitgleich als neues Gen für eine Retinopathie mit makulärer Beteiligung publiziert wurde.⁶ Die genetischen Daten fanden zusammen mit der ausführlichen klinischen Charakterisierung durch das Team von Prof. Issa (Universitätsaugenklinik Bonn) Eingang in eine follow-up-Studie, deren Manuskript sich aktuell in Revision bei *IOVS* befindet.⁷

REFERENZEN

1. Zaki MS, Heller R, Thoenes M, Nürnberg G, Stern-Schneider G, Nürnberg P, Karnati S, Swan D, Fateen E, Nagel-Wolfrum K, Mostafa MI, Thiele H, Wolfrum U, Baumgart-Vogt E, Bolz HJ. PEX6 is expressed in photoreceptor cilia and mutated in deafblindness with enamel dysplasia and microcephaly. *Hum Mutat* 2015 (in revision).
2. Stephen LA, Tawamie H, Davis GM, Tebbe L, Nurnberg P, Nurnberg G, Thiele H, Thoenes M, Boltshauser E, Uebe S, Rompel O, Reis A, Ekici AB, McTeir L, Fraser AM, Hall EA, Mill P, Daudet N, Cross C, Wolfrum U, Jamra RA, Davey MG, Bolz HJ. TALPID3 controls centrosome and cell polarity and the human ortholog is mutated in Joubert syndrome (). *Elife* 2015;4.
3. Abu-Safieh L, Alrashed M, Anazi S, Alkuraya H, Khan AO, Al-Owain M, Al-Zahrani J, Al-Abdi L, Hashem M, Al-Tarimi S, Sebai MA, Shamia A, Ray-Zack MD, Nassan M, Al-Hassnan ZN, Rahbeeni Z, Waheeb S, Alkharashi A, Abboud E, Al-Hazzaa SA, Alkuraya FS. Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenetic mutations and novel candidate disease genes. *Genome Res* 2013;23(2):236-47.
4. Wheway G, Schmidts M, Mans DA, Szymanska K, Nguyen TM, Racher H, Phelps IG, Toedt G, Kennedy J, Wunderlich KA, Sorusch N, Abdelhamed ZA, Natarajan S, Herridge W, van Reeuwijk J, Horn N, Boldt K, Parry DA, Letteboer SJ, Roosing S, Adams M, Bell SM, Bond J, Higgins J, Morrison EE, Tomlinson DC, Slaats GG, van Dam TJ, Huang L, Kessler K, Giessl A, Logan CV, Boyle EA, Shendure J, Anazi S, Aldahmesh M, Al Hazzaa S, Hegele RA, Ober C, Frosk P, Mhanni AA, Chodirker BN, Chudley AE, Lamont R, Bernier FP, Beaulieu CL, Gordon P, Pon RT, Donahue C, Barkovich AJ, Wolf L, Toomes C, Thiel CT, Boycott KM, McKibbin M, Inglehearn CF, Consortium UK, University of Washington Center for Mendelian G, Stewart F, Omran H, Huynen MA, Sergouniotis PI, Alkuraya FS, Parboosingh JS, Innes AM, Willoughby CE, Giles RH, Webster AR, Ueffing M, Blacque O, Gleeson JG, Wolfrum U, Beales PL, Gibson T, Doherty D, Mitchison HM, Roepman R, Johnson CA. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat Cell Biol* 2015;17(8):1074-87.
5. Khan AO, Eisenberger T, Nagel-Wolfrum K, Wolfrum U, Bolz HJ. C21orf2 is mutated in recessive early-onset retinal dystrophy with macular staphyloma and encodes a protein that localises to the photoreceptor primary cilium. *Br J Ophthalmol* 2015.
6. El-Asrag ME, Sergouniotis PI, McKibbin M, Plagnol V, Sheridan E, Waseem N, Abdelhamed Z, McKeefry D, Van Schil K, Poulter JA, Consortium UKIRD, Johnson CA, Carr IM, Leroy BP, De Baere E, Inglehearn CF, Webster AR, Toomes C, Ali M. Biallelic mutations in the autophagy regulator DRAM2 cause retinal dystrophy with early macular involvement. *Am J Hum Genet* 2015;96(6):948-54.
7. Sergouniotis PI, McKibbin M, Robson AG, Bolz HJ, De Baere E, Müller PL, El-Asrag M, Van Schil K, Ali M, Plagnol V, Toomes C, Consortium UIRDGP, Holder GE, Charbel Issa P, Leroy BP, Inglehearn CF, Webster AR. Disease expression in autosomal recessive retinal dystrophy associated with mutations in the DRAM2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015 (in revision).