

## Summary

The aim of this thesis was to gain more insight into CHARGE syndrome and Kallmann syndrome, with a special focus on the *CHD7* gene. For this purpose, we collected all the *CHD7* mutations reported in the literature or identified by the DNA diagnostic laboratories in Nijmegen and Copenhagen. In addition, olfaction and aspects of the reproductive system were studied in a mouse model for CHARGE syndrome. Smell and pubertal development and causes of death were studied in patients with CHARGE syndrome. Finally, the *CHD7* gene was analysed in patients with Kallmann syndrome.

### **Chapter 1: The background**

Detailed background information on *CHD7*, CHARGE syndrome and Kallmann syndrome can be found in chapter 1. In short, CHARGE syndrome is a complex and variable multi-system disorder with an incidence of approximately 1/10,000 newborns. CHARGE is an acronym for ocular coloboma (closure defect of the eye), hear defects, atresia of choanae (blockage of the nasal airway), retardation of growth and/or development, genital hypoplasia (micropenis in boys) and ear anomalies. Other anomalies can also occur, for example, a decreased sense of balance (due to anomalies of the semicircular canals), cranial nerve dysfunction (which can result in hearing loss, facial palsy or swallowing problems) and a smell deficit. In addition, the majority of patients have hypogonadotropic hypogonadism (HH), which manifests as a lack of pubertal maturation and infertility. CHARGE syndrome is caused by autosomal dominant mutations in the *CHD7* gene; these are mostly *de novo* mutations.

CHARGE syndrome has considerable clinical overlap with another rare heritable disorder, Kallmann syndrome. The main features of Kallmann syndrome are HH and a smell deficit. Additional features may also occur, for example, hearing loss, kidney anomalies and missing teeth. A mutation can be identified in only 25-35% of patients, in genes displaying different modes of inheritance: X-linked recessive (caused by mutations in *KAL1*), autosomal dominant (caused by mutations in *FGFR1*, *FGF8* and *CHD7*), and autosomal recessive (caused by mutations in *PROK2* and *PROKR2*). However, it has been postulated that many patients with Kallmann syndrome may have mutations in several different genes (oligogenic inheritance).

### **Chapter 2: The *CHD7* gene**

In **chapter 2.1**, a complete overview is given of all pathogenic *CHD7* mutations reported in the literature or identified by the DNA diagnostic laboratories in Nijmegen and Copenhagen (in total, 531 different mutations per June 15<sup>th</sup> 2011). The *CHD7* mutations were found to be equally distributed along the coding region of the *CHD7* gene. Most mutations were unique, but 96 recurrent mutations were identified (predominantly arginine to stop mutations). Nonsense and frameshift mutations were the main mutations found, with splice site mutations, missense mutations and deletions being present only in a minority of patients. We built a locus-specific database that contains all the *CHD7* mutations and relevant clinical data (available at [www.CHD7.org](http://www.CHD7.org)). This database is a valuable source of information for clinicians as well as researchers. In addition, we summarize the latest data on

expression studies, animal models and functional studies.

In **chapter 2.2**, we present a novel classification system that can help to predict whether a certain missense variant in the *CHD7* gene is either pathogenic (disease-causing) or benign (not associated with the disease). Correct classification of missense variants is essential for genetic counselling of patients and their families. Our classification system combines the outcome of three computational algorithms (SIFT, PolyPhen and align-GVGD) with information about the segregation of the variant of interest (*de novo* versus inherited). This combination of different variables is expected to lead to a more confident prediction of pathogenicity than was previously possible. We have used our system to classify 145 *CHD7* missense variants and have stored the data in the locus-specific database presented in chapter 2.1. Our classification of missense variants was confirmed by studies in a structural model of the CHD7 chromo- and helicase domains, which showed that the variants that we classified as ‘probably pathogenic’ were predicted to reduce the stability of the CHD7 protein and were frequently located in the protein core. Furthermore, the pathogenic missense mutations were mainly located in the middle of the *CHD7* gene, whereas the benign missense variants were predominantly clustered in the 5’ and 3’ regions. Finally, we showed that missense mutations are, in general, associated with a milder phenotype than mutations that lead to a truncated protein.

In **chapter 2.3**, we describe our investigations into how often partial deletions of the *CHD7* gene are present in patients with features of CHARGE syndrome. Partial deletions cannot be detected by routine DNA analysis of the *CHD7* gene (sequence analysis), but can be identified with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). We therefore performed MLPA in 54 patients with features of CHARGE syndrome, who did not show a *CHD7* mutation upon sequence analysis. Only one partial deletion of the *CHD7* gene was identified in a patient with a clinical diagnosis of CHARGE syndrome. We concluded that partial deletions of the *CHD7* gene are rarely found in patients with features of CHARGE syndrome.

### **Chapter 3: CHARGE syndrome**

In **chapter 3.1**, we present the results of our studies in a mouse model for CHARGE syndrome, the *Whirligig* mouse, which harbours a nonsense mutation in the *Chd7* gene. We set out to investigate whether these mice have a smell deficit and genital anomalies, in analogy to patients with CHARGE syndrome. We designed a smell test and showed that the *Whirligig* mice performed less well than the wild-type mice. Their poor performance could be the result of a smell deficit, but could also be due to a severe balance disturbance. Next, we studied the area of the brain that is involved in olfaction and found that some mice had abnormal olfactory bulbs. We also identified abnormalities of the reproductive organs in some of the mice (testes hypoplasia in males and uterine abnormalities in females). The fertility of the *Whirligig* mice was also mildly decreased. It was remarkable that the *Whirligig* mice showed a very variable phenotype, with genital anomalies, heart defects, cleft palate

and choanal anomalies being present in only some of the mice, even though they were genetically identical. This may indicate that slight local modulations in the reduced *CHD7* level, rather than variants in modifier genes, underlie the wide variations in the phenotypes seen between individuals.

In **chapter 3.2**, smell and pubertal development were studied in 35 adolescent patients with CHARGE syndrome. Anosmia (completely absent sense of smell) was present in 81% of patients and HH was seen in 67% of girls and 89% of boys with CHARGE syndrome. In our cohort, anosmia was always correlated with HH, whereas patients with a normal sense of smell always had a normal pubertal development. We therefore proposed using a smell test to predict the occurrence of HH in patients with CHARGE syndrome. This provides the opportunity to start with hormone replacement therapy at an early age in affected patients, leading to age-appropriate puberty. This will in turn reduce socio-emotional problems and also lower the risk of osteoporosis and cardiovascular disease, which are related to low sex hormone levels.

In **chapter 3.3**, the clinical data are presented of seven patients with CHARGE syndrome who died unexpectedly after the neonatal period. Respiratory aspiration (food or stomach acid entering the lungs) probably contributed to death in five patients, one patient choked while eating, and another died of post-operative airway complications. Unfortunately, no autopsies were performed on these patients. Based on our findings and a literature review, we suggested that gastro-oesophageal reflux disease, poor coordination of swallowing and breathing, respiratory aspiration, and post-operative airway events are important contributors to early death in CHARGE syndrome. We proposed cranial nerve dysfunction as the underlying mechanism and advised examining patients with CHARGE syndrome at a multidisciplinary specialist clinic. Assessment of swallowing and cranial nerve function is important and timely treatment of swallowing problems and gastro-oesophageal reflux disease is required. In order to prevent post-operative airway events, we advised combining surgical procedures whenever possible and monitoring patients with CHARGE syndrome for a longer period after surgery.

#### **Chapter 4: Kallmann syndrome**

In **chapter 4.1**, we studied the overlap between CHARGE and Kallmann syndromes by performing *CHD7* analysis in 36 patients with Kallmann syndrome and 20 patients with solely HH and a normal sense of smell. The patients were from Japan and North America. Three *CHD7* mutations were identified in the patients with Kallmann syndrome, whereas none of the patients with solely HH had a *CHD7* mutation. Thorough re-evaluation of the *CHD7*-positive patients with Kallmann syndrome revealed that they all had additional features of CHARGE syndrome. We concluded that patients with Kallmann syndrome should be carefully screened for features of CHARGE syndrome and recommended performing *CHD7* analysis in patients who have any additional CHARGE features.

In **chapter 4.2**, we describe the results of *CHD7* analysis in a cohort of Dutch Kallmann patients. We conducted this study because another group presented data that conflicted with the previous study (chapter 4.1). The other group had identified *CHD7* mutations in patients with HH or Kallmann syndrome who did not have additional features of CHARGE syndrome. We therefore decided to repeat our study in an independent cohort of clinically well characterised patients with Kallmann syndrome. We have identified three *CHD7* mutations in 36 Dutch patients. Upon re-evaluation, the *CHD7*-positive patients all had additional CHARGE features, which is in agreement with findings in our previous study. We conclude that the yield of *CHD7* analysis in patients with isolated Kallmann syndrome seems very low, but increases when additional CHARGE features are present. Our current advice is to evaluate all patients with Kallmann syndrome and to perform *CHD7* analysis if two or more additional CHARGE features, or semicircular canal anomalies, are present. Identification of a *CHD7* mutation has important clinical implications regarding the surveillance and genetic counselling of the patient.

### **Chapter 5: Implications and general discussion**

In **chapter 5.1**, the expanding phenotypic spectrum of CHARGE syndrome is described and we show that some molecularly diagnosed patients have very few features of CHARGE syndrome. We present the clinical features of 280 *CHD7*-positive patients and show that four features are almost universally present: external ear anomalies, cranial nerve dysfunction, semicircular canal hypoplasia, and delayed motor development. CHARGE syndrome is primarily a clinical diagnosis, but *CHD7* analysis can help to establish the diagnosis in patients who do not fulfil the clinical criteria. We propose a guideline for conducting *CHD7* analysis, which also indicates when imaging of the semicircular canals is helpful in the diagnostic process. Finally, we present updated recommendations for the clinical surveillance of patients with a *CHD7* mutation.

In **chapter 5.2**, the results of the work presented in this thesis are discussed in relation to the literature and we highlight the clinical implications of our research. In addition, we present plans for future research. For example, our group will perform exome sequencing in a group of patients with some features of CHARGE syndrome who do not have a mutation or deletion in the *CHD7* gene.

The major accomplishments of the research presented in this thesis are as follows:

- We built a locus-specific database that contains all the *CHD7* mutations ([www.CHD7.org](http://www.CHD7.org))
- We created a classification system that leads to more confident prediction of the pathogenicity of *CHD7* missense variants
- We gained more insight into the pathogenesis of anosmia and hypogonadotropic hypogonadism in CHARGE syndrome
- We presented recommendations to improve the clinical surveillance on pubertal development and to prevent sudden death in patients with CHARGE syndrome

- We compiled a guideline for *CHD7* analysis in patients with features of CHARGE or Kallmann syndrome.

## **Nederlandse samenvatting**

Dit promotieonderzoek was erop gericht meer inzicht te verkrijgen in CHARGE syndroom en Kallmann syndroom met een focus op het *CHD7* gen. Hiertoe hebben we alle *CHD7* mutaties verzameld die eerder in de literatuur waren beschreven of die geïdentificeerd waren in de moleculair genetische laboratoria van Nijmegen en Kopenhagen. Daarnaast hebben we het reukvermogen en aspecten van het voortplantingssysteem in een muismodel voor CHARGE syndroom bestudeerd. Vervolgens hebben we bij patiënten met CHARGE syndroom het reukvermogen, de puberteitsontwikkeling en mogelijke oorzaken van overlijden onderzocht. Ten slotte is het *CHD7* gen geanalyseerd in patiënten met Kallmann syndroom.

### **Hoofdstuk 1: Achtergrondinformatie**

Gedetailleerde achtergrondinformatie over het *CHD7* gen, over CHARGE syndroom en over Kallmann syndroom is te vinden in **hoofdstuk 1**. Kort samengevat is CHARGE syndroom een complexe en variabele multisysteem aandoening die voorkomt bij ongeveer 1 op de 10.000 pasgeborenen. CHARGE is een Engels acroniem, waarbij de zes letters staan voor zes kenmerken: colobomen (aangeboren oogafwijkingen), aangeboren hartafwijkingen, atresie van de choanen (blokkade van de opening tussen neus en mond), retardatie van groei en/of ontwikkeling, onderontwikkeling van de genitaliën (micropenis bij jongens) en oorafwijkingen. Daarnaast kunnen ook andere problemen optreden, zoals een verminderd evenwicht (ten gevolge van afwijkingen aan het evenwichtsorgaan), hersenzenuwdisfunctie (wat kan leiden tot gehoorverlies, aangezichtsverlamming of slikproblemen) en een afwezig reukvermogen. Verder heeft de meerderheid van de patiënten een hypogonadotroop hypogonadisme (HH), wat het uitblijven van de puberteit en onvruchtbaarheid tot gevolg heeft.

CHARGE syndroom wordt veroorzaakt door autosomaal dominante mutaties in het *CHD7* gen. Dat wil zeggen dat CHARGE syndroom even vaak voorkomt bij jongens als bij meisjes (autosomaal) en dat de kans dat iemand met CHARGE syndroom dit doorgeeft aan zijn of haar kind 50% is (dominant). Het kind met CHARGE syndroom is echter vaak de eerste in de familie, omdat de *CHD7* mutatie meestal nieuw (*de novo*) ontstaat.

CHARGE syndroom lijkt klinisch gezien op een andere zeldzame ziekte, Kallmann syndroom. Bij beide syndromen komen HH en een verminderd reukvermogen voor. Deze twee kenmerken zijn de hoofdkenmerken van Kallmann syndroom en zijn dus, per definitie, altijd aanwezig bij patiënten met Kallmann syndroom. Patiënten met Kallmann syndroom hebben soms ook nog andere verschijnselen, zoals gehoorverlies, nierafwijkingen en missende tanden. Slechts bij 25 tot 30% van de patiënten met Kallmann syndroom kan een mutatie worden aangetoond, in genen met verschillende overervingpatronen: X-gebonden recessief (veroorzaakt door mutaties in het *KAL1*-gen), autosomaal dominant (veroorzaakt door mutaties in het *FGFR1*-, *FGF8*- en *CHD7*-gen) en autosomaal recessief (veroorzaakt door mutaties in het *PROK2*- en *PROKR2*-gen). Het meest recente inzicht is echter dat in het merendeel van de patiënten met Kallmann syndroom meerdere genen gemuteerd zijn (oligogene overerving).



## Hoofdstuk 2: Het *CHD7* gen

In **hoofdstuk 2.1** wordt een volledig overzicht gegeven van alle pathogene *CHD7* mutaties die zijn beschreven in de literatuur of die zijn geïdentificeerd door de moleculair genetische laboratoria in Nijmegen en Kopenhagen (in totaal 531 verschillende mutaties op 15 juni 2011). De *CHD7* mutaties bleken gelijkmatig te zijn verdeeld over de coderende regio van het *CHD7* gen. De meeste mutaties waren uniek, maar 96 mutaties zijn meer dan eens gevonden (met name arginine naar stop mutaties). We hebben vooral nonsense en frameshift mutaties gevonden, terwijl splice site mutaties, missense mutaties en deleties slechts in een minderheid van de patiënten voorkwamen. We hebben een database gemaakt, die alle *CHD7* mutaties bevat met relevante klinische gegevens (beschikbaar op [www.CHD7.org](http://www.CHD7.org)). Deze database is een waardevolle informatiebron voor artsen en onderzoekers. Daarnaast hebben we in dit hoofdstuk een up-to-date overzicht gegeven van alle expressiestudies, diermodellen en functionele studies betreffende *CHD7*.

In **hoofdstuk 2.2** presenteren we een nieuw classificatiesysteem dat kan helpen bij de voorspelling of een bepaalde missense variant in het *CHD7* gen pathogeen (ziekteverwekkend) of benigne (geen verband houdend met de ziekte) is. Een correcte classificatie van missense varianten is essentieel voor de erfelijkheidsvoorlichting aan patiënten en hun families. Ons classificatiesysteem combineert de output van drie algoritmes (SIFT, PolyPhen en Align-GVGD) met informatie over de oorsprong van een bepaalde missense variant (*de novo* versus overgeërfd). De combinatie van deze verschillende variabelen zal waarschijnlijk leiden tot een meer betrouwbare voorspelling van pathogeniteit dan voorheen mogelijk was. Met ons systeem hebben we 145 *CHD7* missense varianten geclassificeerd en we hebben deze data opgeslagen in de database die we hebben gepresenteerd in hoofdstuk 2.1. Onze classificatie van de missense varianten kwam overeen met de voorspelling gebaseerd op een structuurmodel van de chromo- en helicasedomeinen van het *CHD7* eiwit. Dit model voorspelde dat de varianten die wij hebben geclassificeerd als 'waarschijnlijk pathogeen' de stabiliteit van het *CHD7* eiwit verminderen en veelal in de kern van het eiwit liggen. Op DNA niveau bleken de pathogene missense varianten voornamelijk in het midden van het *CHD7* gen te liggen, terwijl de benigne missense varianten vooral aan het begin of aan het einde van het gen gelegen waren. Tot slot hebben we laten zien dat patiënten met een missense mutatie in het algemeen minder ernstige verschijnselen hebben dan patiënten met een mutatie die leidt tot een getrunceerd (verkort) eiwit.

In **hoofdstuk 2.3** hebben we onderzocht hoe vaak deleties van een gedeelte van het *CHD7* gen aanwezig zijn in patiënten met kenmerken van CHARGE syndroom. Gedeeltelijke deleties kunnen niet worden gedetecteerd met standaard DNA onderzoek van het *CHD7* gen (sequentieanalyse), maar kunnen wel worden gevonden met 'multiplex ligation-dependent probe amplification' (MLPA). Daarom hebben we MLPA analyse verricht in 54 patiënten met kenmerken van CHARGE syndroom, bij wie geen *CHD7* mutatie was gevonden met sequentieanalyse. Hierbij hebben we slechts één gedeeltelijke deletie van het *CHD7* gen gevonden in een patiënt met de klinische diagnose CHARGE

syndroom. Hieruit hebben we geconcludeerd dat gedeeltelijke deleties van het *CHD7* gen slechts zelden voorkomen bij patiënten met kenmerken van CHARGE syndroom.

### Hoofdstuk 3: CHARGE syndroom

In **hoofdstuk 3.1** beschrijven we de resultaten van ons onderzoek in een muismodel voor CHARGE syndroom, de *Whirligig* muis, die een nonsense mutatie in het *CHD7* gen heeft. Ons doel was om te onderzoeken of deze muizen een reukstoornis en afwijkende genitaliën hebben, net als patiënten met CHARGE syndroom. De *Whirligig* muizen presteerden slechter bij de reuktest dan wildtype muizen. De slechte prestatie zou kunnen worden veroorzaakt door een reukstoornis, maar zou ook het gevolg kunnen zijn van ernstige evenwichtsstoornissen. Nader onderzoek wees uit dat enkele muizen afwijkende reukhersenen hadden. Sommige muizen hadden ook afwijkende geslachtsorganen (onderontwikkelde zaadballen bij mannetjes en baarmoederafwijkingen bij vrouwtjes). *Whirligig* muizen waren ook enigszins verminderd vruchtbaar. Erg opvallend was het sterk variabele fenotype van *Whirligig* muizen die genetisch identiek zijn. Deze grote variatie in fenotype wordt mogelijk veroorzaakt wordt door kleine lokale veranderingen in het door de mutatie toch al verminderde *CHD7* niveau, en niet door variaties in modifierende genen.

In **hoofdstuk 3.2** staan de resultaten van ons onderzoek naar reukvermogen en puberteitsontwikkeling bij 35 adolescenten met CHARGE syndroom beschreven. Anosmie (volledig afwezig reukvermogen) was aanwezig bij 81% van de patiënten en HH (uitblijvende puberteit) werd gezien bij 67% van de meisjes en 89% van de jongens met CHARGE syndroom. Anosmie kwam altijd samen met HH voor, terwijl patiënten met een normaal reukvermogen ook altijd een normale puberteitsontwikkeling hadden doorgemaakt. We hebben daarom voorgesteld om een reuktest te gebruiken om te kunnen voorspellen bij welke patiënten met CHARGE syndroom de puberteitsontwikkeling niet spontaan op gang komt. Een hormoonbehandeling kan er vervolgens voor zorgen dat zij wel op de juiste leeftijd in de puberteit komen. Hierdoor zullen minder socio-emotionele problemen voorkomen en ook het risico op botontkalking en hart- en vaatziekten zal afnemen, omdat deze gerelateerd zijn aan lage hormoonspiegels.

In **hoofdstuk 3.3** worden de medische gegevens gepresenteerd van zeven patiënten met CHARGE syndroom die plotseling zijn overleden na de neonatale periode. Bij vijf patiënten heeft respiratoire aspiratie (voedsel of maagzuur dat in de longen terecht komt) waarschijnlijk bijgedragen aan het overlijden, één patiënt is gestikt tijdens het eten en een andere patiënt is overleden aan postoperatieve luchtwegproblemen. Helaas was bij geen van deze patiënten obductie verricht. Gebaseerd op onze bevindingen en een literatuuronderzoek, denken wij dat gastro-oesophageale reflux, verstoorde coördinatie van slikken en ademen, respiratoire aspiratie en postoperatieve luchtwegproblemen een belangrijke rol spelen bij vroegtijdig overlijden van patiënten met CHARGE syndroom. Hersenzenuwdisfunctie zou aan deze problemen ten grondslag kunnen liggen. Gezien

bovengenoemde risicofactoren adviseren we om patiënten met CHARGE syndroom te controleren op een multidisciplinaire polikliniek. Daarbij is controle van de slikfunctie en hersenzenuwfunctie belangrijk en snelle behandeling van slikproblemen en gastro-oesophageale reflux is raadzaam. Postoperatieve luchtwegproblemen zijn deels te voorkomen door operaties waarvoor narcose noodzakelijk is, indien mogelijk, te combineren en door patiënten met CHARGE syndroom na een operatie langer dan normaal op de uitslaapkamer te laten blijven.

#### **Hoofdstuk 4: Kallmann syndroom**

In **hoofdstuk 4.1** onderzoeken we de overlap tussen CHARGE syndroom en Kallmann syndroom door het *CHD7* gen te analyseren bij 36 patiënten met Kallmann syndroom en 20 patiënten met HH (uitblijvende puberteit en onvruchtbaarheid) en een normaal reukvermogen. Deze patiënten waren afkomstig uit Japan en Noord Amerika. We vonden drie *CHD7* mutaties bij patiënten met Kallmann syndroom, terwijl geen van de patiënten met alleen HH een *CHD7* mutatie had. De drie patiënten bij wie we een *CHD7* mutatie hadden gevonden, bleken bij herbeoordeling alledrie additionele CHARGE kenmerken te hebben. We concluderen dat patiënten met Kallmann syndroom goed moeten worden onderzocht op kenmerken van CHARGE syndroom en adviseren *CHD7* analyse als additionele CHARGE kenmerken aanwezig zijn.

In **hoofdstuk 4.2** beschrijven we de resultaten van *CHD7* analyse in een cohort Nederlandse patiënten met Kallmann syndroom. We hebben dit onderzoek verricht, omdat een andere onderzoeksgroep data had gepubliceerd die in strijd was met onze eerdere studie (hoofdstuk 4.1). Deze onderzoeksgroep had *CHD7* mutaties gevonden bij patiënten met HH of Kallmann syndroom die géén andere kenmerken van CHARGE syndroom hadden. Wij hebben daarom besloten om onze studie te herhalen in een onafhankelijk cohort van patiënten met Kallmann syndroom die klinisch goed onderzocht waren. We vonden drie *CHD7* mutaties bij 36 Nederlandse patiënten. Ook nu bleek dat alledrie patiënten additionele CHARGE kenmerken hadden, hetgeen in overeenstemming is met de resultaten van onze eerdere studie (hoofdstuk 4.1). We concluderen dat de opbrengst van *CHD7* analyse bij patiënten met Kallmann syndroom zonder andere CHARGE kenmerken erg laag is, maar dat deze analyse wel zinvol is bij patiënten met additionele CHARGE kenmerken. Ons huidige advies is om alle patiënten met Kallmann syndroom te evalueren en om *CHD7* analyse te verrichten als twee of meer additionele CHARGE kenmerken, of afwijkingen aan het evenwichtsorgaan, aanwezig zijn. Identificatie van een *CHD7* mutatie heeft belangrijke klinische consequenties voor de verdere controle van de patiënt en de erfelijkheidsvoorlichting aan de patiënt en zijn/haar familie.

#### **Hoofdstuk 5: Implicaties en discussie**

In **hoofdstuk 5.1** laten we zien dat sommige patiënten met een *CHD7* mutatie erg weinig kenmerken van CHARGE syndroom hebben, terwijl andere patiënten juist veel of ernstige afwijkingen hebben. We presenteren de klinische kenmerken van 280 patiënten met een *CHD7* mutatie en laten zien

dat vier kenmerken bijna altijd aanwezig zijn: een afwijkende oorschelp, hersenzenuwdisfunctie, een afwijkend evenwichtsorgaan en een vertraagde motorische ontwikkeling. CHARGE syndroom is voornamelijk een klinische diagnose, maar *CHD7* analyse kan helpen bij het stellen van de diagnose bij patiënten die niet aan de klinische criteria voldoen. We hebben een richtlijn opgesteld die, al dan niet na het verrichten van een scan van het evenwichtsorgaan, aangeeft bij welke patiënten *CHD7* analyse zinvol is. Tot slot presenteren we nieuwe adviezen voor de verdere controle van patiënten met een *CHD7* mutatie.

In **hoofdstuk 5.2** bediscussiëren we de resultaten van ons onderzoek in relatie tot de literatuur en we geven aan wat de klinische implicaties van ons onderzoek zijn. Daarnaast presenteren we onze plannen voor toekomstig onderzoek. Onze groep zal bijvoorbeeld exome sequencing (sequentieanalyse van het gehele coderende genoom) gaan verrichten in een groep patiënten met enkele kenmerken van CHARGE syndroom, bij wie geen mutatie of deletie van het *CHD7* gen is gevonden.

De belangrijkste resultaten van ons onderzoek zijn als volgt:

- We hebben een database gecreëerd die 531 *CHD7* mutaties bevatte op 15 juni 2011 ([www.CHD7.org](http://www.CHD7.org))
- We hebben een classificatiesysteem gemaakt waarmee de pathogeniteit van *CHD7* missense variaties beter kan worden voorspeld
- We hebben meer inzicht gekregen in de onderliggende mechanismen van anosmie en hypogonadotroop hypogonadisme in CHARGE syndroom
- We hebben adviezen gegeven voor de verdere controle van patiënten met CHARGE syndroom, met name gericht op puberteitsontwikkeling en op het voorkomen van plotse dood
- We hebben een richtlijn opgesteld die aangeeft wanneer *CHD7* analyse zinvol is bij patiënten met kenmerken van CHARGE syndroom of Kallmann syndroom.