

Molekulargenetische Diagnostik Holoprosenzephalie

Version 21.4.2016



1. NGS-Panel Holoprosenzephalie*,**

Methode: Ggf. DNA-Präparation (entfällt bei Zusendung präparierter genomischer DNA)

PCR-basierte Anreicherung mittels Nextera Enrichment (Illumina®), Massive Parallele Sequenzierung mit Illumina MiSeq™

Holoprosenzephalie-Panel V2.0: Core-Panel (100% Coverage 5kb kodierende Sequenz): SHH, SIX3, ZIC2, TGIF + weitere 13 Gene (31 kb kodierende Sequenz), optional zusätzlich weitere 15 Gene assoziiert mit syndromalen Formen der Holoprosenzephalie (35 kb kodierende Sequenz); jeweils kodierende Sequenzen, 3' und 5'UTR und flankierende Exon-Intron-Übergänge

Auswertung: erfolgt mit einem Labor-internen Workflow, inklusive Mapping der Reads auf das humane Referenzgenom (hg19) und Annotation aller Varianten (SNPs, SNVs, Deletionen und Duplikationen bis max. 10-15 bp), sowie Datenbankabgleich (NCBI dbSNP, HGMD, Pubmed, OMIM) und *in silico* Prädiktion möglicher funktioneller Auswirkungen (SIFT, Alamut, PolyPhen2, Flybase), bioinformatischer Algorithmus zur Suche nach Gendosisveränderungen (CNV: Deletionen, Duplikationen).

Für die klinische Fragestellung Ihres Patienten relevante oder potentiell relevante Sequenzveränderungen werden mit Sanger-Sequenzierung bestätigt und in einem individuellen humangenetischen Gutachten unter Berücksichtigung der mitgeteilten klinischen Befunde bewertet.

Zum Ausschluss von Dosisveränderungen bieten wir optional ergänzend eine MLPA-Untersuchung an bzw. empfehlen alternativ eine Array-CGH mit ausreichend hoher Auflösung für die HPE-Loci.

*Wir bieten die Panel-Diagnostik derzeit nur nach schriftlicher Kostenübernahmebestätigung durch die Krankenversicherung oder auf GOÄ-Rechnung an und senden Ihnen vorab gern einen Kostenvoranschlag zu.

**Die NGS-Panel-Sequenzierung incl. aller Arbeitsschritte ist in unserem Labor seit November 2013 nach DIN EN ISO 15189 akkreditiert (beinhaltet auch DIN EN ISO 9001).

2. Alternativ aktuell noch im EBM konventionelle Sanger-Sequenzierung gesamte kodierende Region incl. 20bp intronisch der Gene SHH, SIX3, ZIC2, TGIF, GLI2, PTCH1, NODAL und

3. MLPA zum Nachweis von Exon-Deletionen/Duplikationen,

4. Mitbeurteilung cMRT

Gern können Sie uns vorab das zerebrale MRT Ihrer Patienten gemeinsam mit klinischen Befunden und Angaben zur Familie zur Mitbeurteilung und Abstimmung einer individuellen Strategie der molekulargenetischen Abklärung zusenden. Bitte legen Sie in diesem Fall für gesetzlich versicherte Patienten einen gelben Überweisungsschein Muster 6 für die Humangenetik zur Mit-/Weiterbehandlung bei. Für stationäre und/oder privat versicherte Patienten berechnen wir für die humangenetische Mitbeurteilung einmal die Ziffer 85 nach GOÄ 2,3.

Klinik der Holoprosenzephalie (HPE)

Der Begriff Holoprosenzephalie wird in 2 verschiedenen Bedeutungen verwendet: *im engeren Sinne* bezeichnet er eine spezifische Hirnfehlbildung, welche um den Zeitpunkt der Gastrulation im frühen Embryo durch variable Verschmelzung von Strukturen des Prosenzephalon entsteht. In abnehmender Schwere werden unterschieden: alobäre > semilobäre > lobäre Holoprosenzephalie, als atypische Varianten zusätzlich die mittelinterhemisphärische Fusionsvariante (MIFV) oder "dorsale" Holoprosenzephalie. In der klinischen Genetik umfasst die Holoprosenzephalie-Sequenz *im weiteren Sinne* ein sehr breites Spektrum von spezifischen Dysmorphien des Mittelgesichts mit oder ohne assoziierte Hirnfehlbildung und Fehlbildungen in weiteren Organsystemen. Der typische craniofaziale Aspekt der Holoprosenzephalie-Sequenz ist gekennzeichnet durch eine unvollständig erscheinende Teilung des Mittelgesichtes, welche wie eine partielle Fusion in der Mittellinie erscheint mit stark variabler Ausprägung eines oder mehrerer der **folgenden Merkmale**:

okulärer Hypotelorismus, Kolobome, Mikrozephalie, bitemporale Verengung, singulärer mittlerer oberer Schneidezahn (SMMCI), hypoplastische Nase, Choanalstenose und mittlere Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalte (s.a. Hehr et al., 2004). Einen besonderen und abweichenden craniofazialen Aspekt bieten Patienten mit ursächlicher *ZIC2*-Mutation, sie weisen eine nach außen oben abweichende Lidachse auf, kurze antevertierte Nasenlöcher, bitemporale Verengung, relativ große Ohren, ein breites tiefes Philtrum und nur in ca. 10% Gesichtsspalten (Solomon et al., 2010).

Die **Hirnfehlbildung Holoprosenzephalie** wird zumindest als semilobäre oder alobäre HPE heute zunehmend bereits pränatal im Ultraschall erkannt, postpartal erfolgt die Diagnose üblicherweise dann mittels cerebraler Magnetresonanztomographie (cMRT). Wird in der cerebralen Bildgebung (Ultraschall, cMRT) eine alobäre, semilobäre oder lobäre Holoprosenzephalie nachgewiesen, dann ist diese praktisch immer mit einer psychomotorischen Entwicklungsverzögerung verbunden. Ca. 50% der Patienten entwickeln ein Anfallsleiden (Epilepsie), welches häufig therapierefraktär ist. Weitere neurologische Symptome in variabler Ausprägung sind Spastik, muskuläre Hypotonie oder Dystonie sowie cognitive Einschränkungen als mentale Retardierung oder bei milderer Formen als Lernprobleme. Bei etwa 3/4 der Patienten mit semilobärer oder alobärer HPE tritt eine so schwere Schluckstörung auf, dass eine permanente Ernährung über eine PEG-Sonde notwendig wird. Die erhöhte Sterblichkeit bei schwerer klinischer Manifestation ist insbesondere auch durch ein erhöhtes

Risiko für zentrale Regulationsstörungen u.a. von Atmung, Herzrhythmus und Temperaturregulation bedingt. Bei mehr als 70% der Patienten entwickeln sich hypophysär bedingte Hormonstörungen, welche regelmäßig einen Diabetes insipidus und variabel weitere Hormonachsen betreffen z.B. als Wachstumshormonmangel mit reduzierter Körperendgröße, Nebennierenrindeninsuffizienz oder Schilddrüsenunterfunktion.

Die **Ursachen der Holoprosenzephalie** sind sehr vielfältig und können bisher nur für einen Teil der Patienten aufgeklärt werden. Als häufige exogene Ursache ist eine Assoziation zu einem präexistenten mütterlichen Diabetes mellitus oder Teratogenen um den Zeitraum der Gastrulation belegt. Daneben sind heute verschiedene chromosomale, syndromale und monogene Formen der Holoprosenzephalie bekannt:

Ca. 30-50% der Patienten weisen eine mikroskopisch erkennbare unbalancierte und seltener auch balancierte **Chromosomenaberration** auf. Etwa 30% aller HPE-Fälle und insbesondere die heute pränatal diagnostizierten, gehen auf eine Trisomie 13 zurück. Bei dieser finden sich zusätzlich häufig als weitere charakteristische Merkmale strukturelle Herzfehler, Polydaktylie, Mikrophthalmie und Lippenspalten und/oder Kiefer- und Gaumenspalten. Typische weitere Chromosomenaberrationen, die mit einer Holoprosenzephalie einhergehen können, sind Trisomie 18 sowie strukturelle Aberrationen incl. der heute bekannten HPE-Loci 7q36 und 2p21 sowie mehr als 12 weitere chromosomale Regionen (Roessler

Molekulargenetische Diagnostik Holoprosenzephalie

Version 21.4.2016



und Muenke, 2010). Auch verschiedene genetisch-bedingte Syndrome sind mit einer Holoprosenzephalie assoziiert, darunter das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, die Pseudotrisomie 13 und das Pallister-Hall-Syndrom.

Für **ca. 30%** der Patienten mit normalen Chromosomen können heute **Gen-Mutationen** als Ursache einer monogenen Form der autosomal-dominant vererbten Holoprosenzephalie nachgewiesen werden bei bekannter reduzierter Penetranz und großer klinischer Variabilität auch innerhalb einer Familie. 60-70% der familiären, autosomal-dominant vererbten und 10-12% aller monogenen Formen

einer Holoprosenzephalie gehen auf Mutationen im Sonic Hedgehog-Gen SHH zurück. Bei ca. 8% der HPE-Patienten mit normalen Chromosomen finden sich Mutationen im ZIC2-Gen, bei ca. 4-5% SIX3-Mutationen und bei ca. 2% TGIF-Mutationen.

Daneben wurden inzwischen weitere Gene und auch genetisch bedingte Syndrome wie das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom mit einer Holoprosenzephalie assoziiert. 3-15% der Patienten mit monogen bedingter HPE infolge einer Mutation in den 4 Hauptgenen SHH, SIX3, ZIC2 oder TGIF weisen Fehlbildungen in 3 und mehr weiteren Organsystemen auf incl. Herz, Nieren, Skelettsystem, Lunge, Gastrointestinaltrakt und Genitale, welche den Eindruck eines genetischen Syndroms vermitteln können.

Genetische Abklärung der Holoprosenzephalie

Die genetische Abklärung sollte immer individuell unter Berücksichtigung der Gesamtsituation incl. assoziierter Fehlbildungen und Familienanamnese erfolgen und auch eine gezielte klinische Untersuchung beider Eltern oder ggf. weiterer naher Angehöriger auf Vorliegen von Minorsymptomen beinhalten (okulärer Hypotelorismus, Kolobome, Mikrozephalie, bitemporale Verengung, singulärer mittlerer oberer Schneidezahn (SMMCI), Choanalstenose, Lernprobleme, Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalte).

Bei assoziierten extracranialen Fehlbildungen und/oder consanguinen Eltern befundabhängig gezielte Syndromsuche.

Prä- und postnatal zuerst Chromosomenanalyse und/oder Array-CGH ausreichend hoher Auflösung. Mit der Array-CGH können auch submikroskopische Dosisveränderungen (CNVs) erkannt werden, nicht jedoch wiederholt beschriebene balancierte Chromosomenaberrationen insbesondere mit Bruchpunkten in einer der HPE-assoziierten Loci.

Für Patienten ohne Hinweis auf Chromosomenaberrationen oder syndromale Grunderkrankung nachgeordnet molekulargenetische Diagnostik, welche mindestens die vollständige Sequenzanalyse und Suche nach submikroskopischen Dosisveränderungen der 4 Hauptgene SHH, SIX3, ZIC2 und TGIF einschließen sollte. Insbesondere bei Hinweisen auf einen Panhypopituitarismus Mutationsanalyse GLI2-Gen, bei schwerer Hirnfehlbildung mit relativ normalem Gesicht und/oder Herzfehler zuerst ZIC2-Gen und/oder bei Lateralitätsstörungen als Situs inversus NODAL-Gen.

Mutationsdetektionsrate eigenes Labor bis Frühjahr 2013 noch ohne Panel-Diagnostik Mutationsnachweis bei 21,7% von 220 unabhängigen Patienten mit extern überwiegend bereits ausgeschlossener Chromosomenanalyse und teilweise auch von Mutationen in SHH.

Kontakt

Haben Sie noch Fragen zur genetischen Diagnostik bei Holoprosenzephalie? Gern erreichen Sie uns hierfür per email oder direkt im Labor unter 0941-58613311.

Publikationen unserer Gruppe in Kooperation mit weiteren Arbeitsgruppen zu HPE

Herbst SM, Schuierer G, Hehr U [Strukturelle Hirnfehlbildungen bei Mikrozephalie](#) Medizinische Genetik 04/2015; 27(4): 377--387

Chaoui R, Hehr U [Pränataldiagnostik bei fetaler Mikrozephalie](#) Medizinische Genetik 04/2015; 27(4): 351-361

Uyanik G, Hehr U [Angeborene Hirnfehlbildungen und geistige Behinderung](#) Medizinische Genetik 04/2012; 21(2):217-223

Solomon BD, Bear KA, Wyllie A, Keaton AA, Dubourg C, David V, Mercier S, Odent S, Hehr U, Paulussen A, Clegg NJ, Delgado MR, Bale SJ, Lacbawan F, Ardinger HH, Aylsworth AS, Bhengu NL, Braddock S, Brookhyser K, Burton B, Gaspar H, Grix A, Horovitz D, Kanetzke E, Kayserili H, Lev D, Nikkel SM, Norton M, Roberts R, Saal H, Schaefer GB, Schneider A, Smith EK, Sowry E, Spence MA, Shalev SA, Steiner CE, Thompson EM, Winder TL, Balog JZ, Hadley DW, Zhou N, Pineda-Alvarez DE, Roessler E, Muenke M. [Genotypic and phenotypic analysis of 396 individuals with mutations in Sonic Hedgehog](#). J Med Genet. 2012 Jul;49(7):473-9.

Hehr U, Schuierer G. [Genetic assessment of cortical malformations](#). Neuropediatrics. 2011 Feb;42(2):43-50.

Hehr U, Pineda-Alvarez DE, Uyanik G, Hu P, Zhou N, Hehr A, Schell-Apacik C, Altus C, Daumer-Haas C, Meiner A, Steuernagel P, Roessler E, Winkler J, Muenke M. [Heterozygous mutations in SIX3 and SHH are associated with schizencephaly and further expand the clinical spectrum of holoprosencephaly](#). Hum Genet. 2010 Mar;127(5):555-61.

Solomon BD, Lacbawan F, Mercier S, Clegg NJ, Delgado MR, Rosenbaum K, Dubourg C, David V, Olney AH, Wehner LE, Hehr U, Bale S, Paulussen A, Smeets HJ, Hardisty E, Tylki-Szymanska A, Pronicka E, Clemens M, McPherson E, Hennekam RC, Hahn J, Stashinko E, Levey E, Wieczorek D, Roeder E, Schell-Apacik CC, Booth CW, Thomas RL, Kenwick S, Cummings DA, Bous SM, Keaton A, Balog JZ, Hadley D, Zhou N, Long R, Vélez JI, Pineda-Alvarez DE, Odent S, Roessler E, Muenke M. [Mutations in ZIC2 in human holoprosencephaly: description of a novel ZIC2 specific phenotype and comprehensive analysis of 157 individuals](#). J Med Genet. 2010 Aug;47(8):513-24.

Uyanik G, Hehr U [Congenital brain malformations and mental retardation](#) Medizinische Genetik - Med Genet. 01/2009; 21(2):217-223.

Roessler E, El-Jaick KB, Dubourg C, Vélez JI, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Lacbawan F, Zhou N, Ouspenskaia M, Paulussen A, Smeets HJ, Hehr U, Bendavid C, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. [The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the SHH gene in humans predicts loss of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis](#). Hum Mutat. 2009 Oct;30(10):E921-35.

Schell-Apacik CC, Ertl-Wagner B, Panzel A, Klausener K, Rausch G, Muenke M, von Voss H, Hehr U. [Maternally inherited heterozygous sequence change in the sonic hedgehog gene in a male patient with bilateral closed-lip schizencephaly and partial absence of the corpus callosum](#). Am J Med Genet A. 2009 Jul;149A(7):1592-4.

Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domené S, Vélez JI, Zhou N, Hadley D, Balog JZ, Long R, Fryer A, Smith W, Omar S, McLean SD, Clarkson K, Lichty A, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, Stashinko E, Potocki L, Vanallen MI, Clayton-Smith J, Donnai D, Bianchi DW, Juliusson PB, Njølstad PR, Brunner HG, Carey JC, Hehr U, Müsebeck J, Wieacker PF, Postra A, Hennekam RC, van den Boogaard MJ, van Haeringen A, Paulussen A, Herbergs J, Schrandt-Stumpel CT, Janecke AR, Chitayat D, Hahn J, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Dobyns WB, Muenke M. [Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function](#). J Med Genet. 2009 Jun;46(6):389-98.

Roessler E, Lacbawan F, Dubourg C, Paulussen A, Herbergs J, Hehr U, Bendavid C, Zhou N, Ouspenskaia M, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. [The full spectrum of holoprosencephaly-associated mutations within the ZIC2 gene in humans predicts loss-of-function as the predominant disease mechanism](#). Hum Mutat. 2009 Apr;30(4):E541-54.

Praxis und Labor für
Humangenetik

Prof. Dr. Ute Hehr
FÄ für Humangenetik

Im Universitätsklinikum, D3
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

Telefon: (0941) 944-54 10
Telefax: (0941) 944-54 02
www.humangenetik-regensburg.de
info@humangenetik-regensburg.de

Molekulargenetische Diagnostik Holoprosenzephalie

Version 21.4.2016



Hehr U, Gross C, Diebold U, Wahl D, Beudt U, Heidemann P, Hehr A, Mueller D. [Wide phenotypic variability in families with holoprosencephaly and a sonic hedgehog mutation](#). Eur J Pediatr. 2004 Jul;163(7):347-52.

Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, Gillessen-Kaesbach G, Zackai EH, Rommens J, Muenke M. [Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly](#). Nat Genet. 1999 Jun;22(2):196-8.

Schell U, Wienberg J, Köhler A, Bray-Ward P, Ward DE, Wilson WG, Allen WP, Lebel RR, Sawyer JR, Campbell PL, Aughton DJ, Punnett HH, Lammer EJ, Kao FT, Ward DC, Muenke M. [Molecular characterization of breakpoints in patients with holoprosencephaly and definition of the HPE2 critical region 2p21](#). Hum Mol Genet. 1996 Feb;5(2):223-9