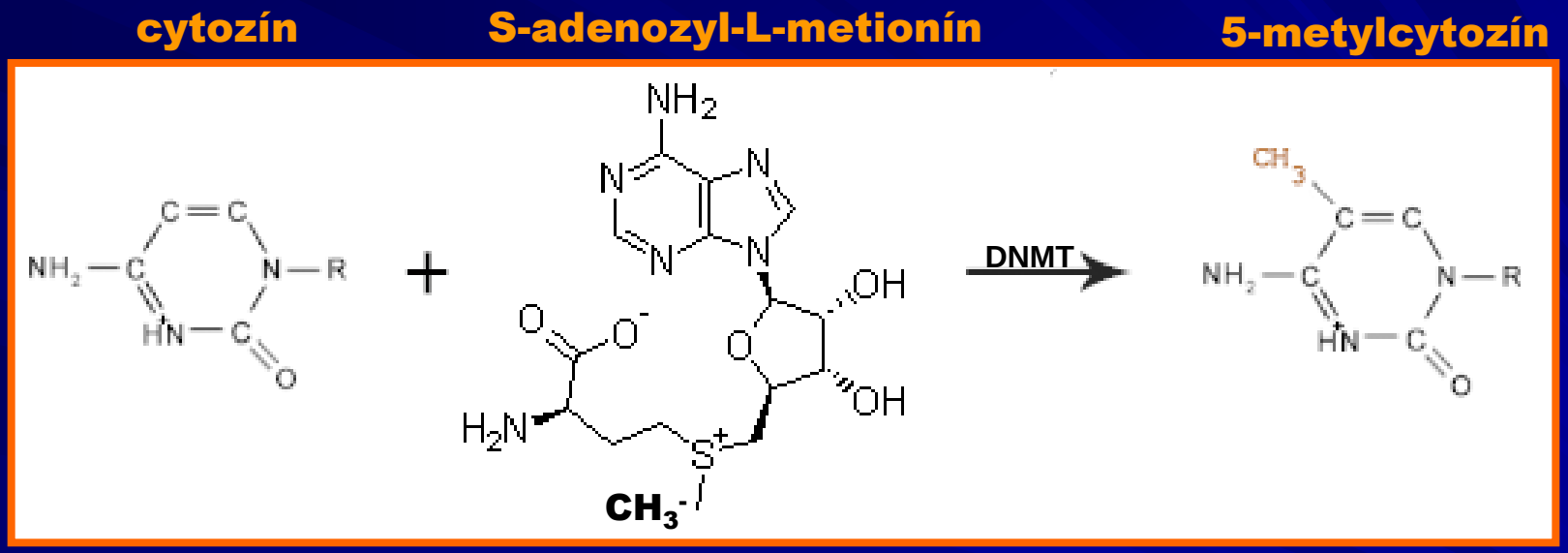
Praderov-Williho a Angelmanov syndróm: príklady poruchy genómového imprintingu

Lívia Lukáčková

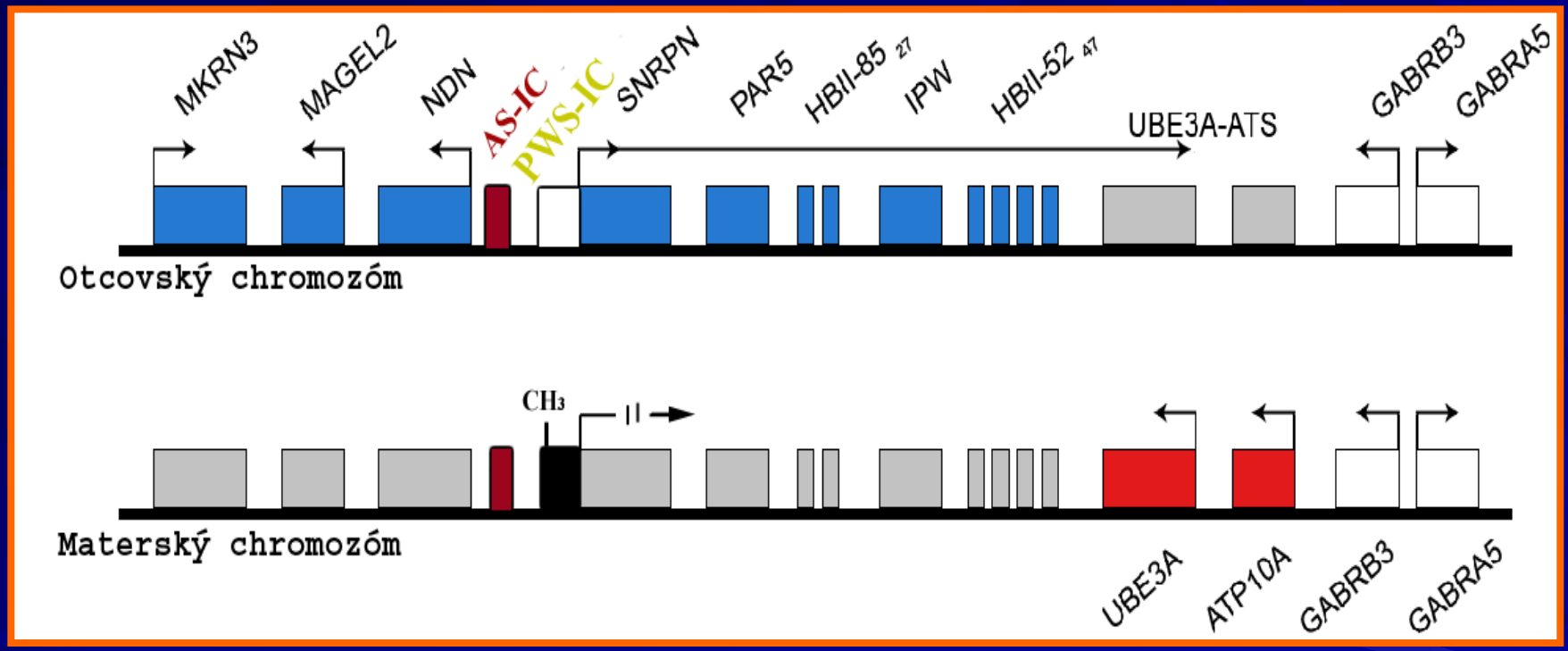
Vedúci diplomovej práce: doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.

DNA metylácia

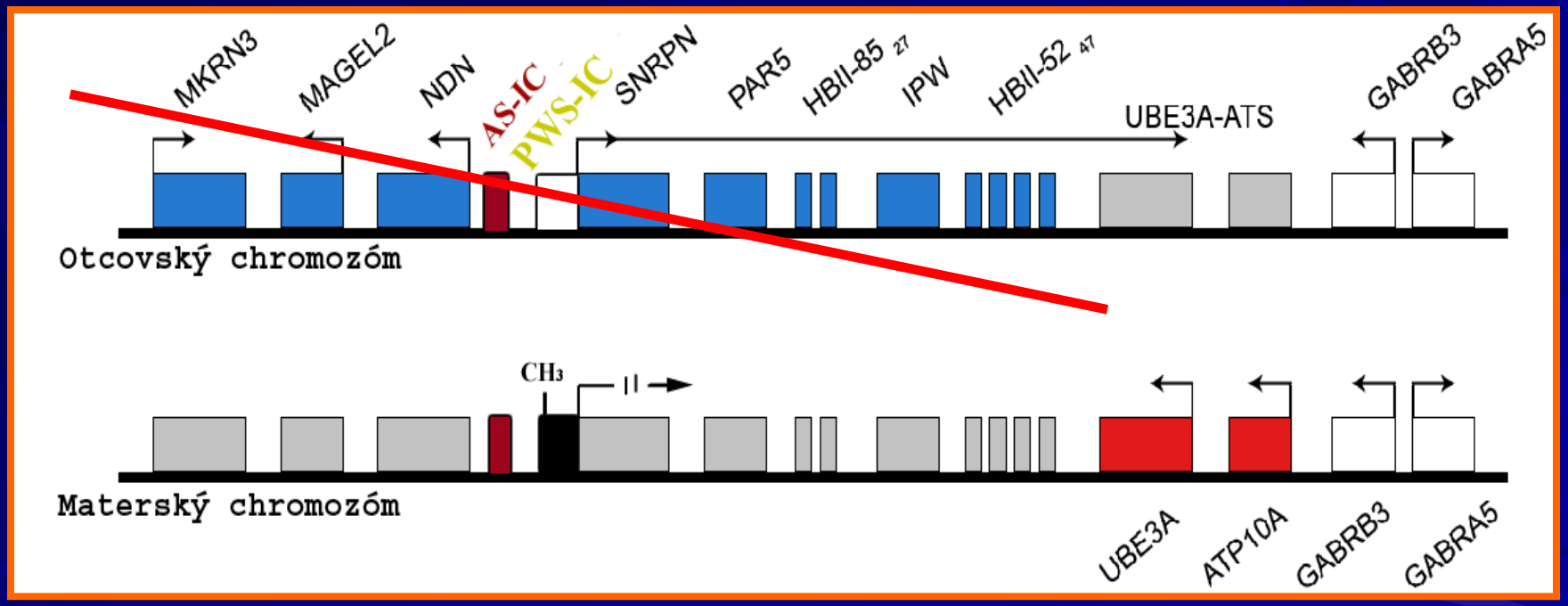


Obr. 1. Schéma DNA metylácie katalyzovanej DNA metyltransferázou DNMT

PWS/AS kritická oblasť na 15q11-q13



Obr. 2. Schéma alelovo- špecifickej expresie génov na PWS/AS regióne chromozómu 15q11-q13 (upravené podľa Lalandeho a Calciana, 2007)


MKRN3
MAGEL2
NDN
AS-IC
PWS-IC
SNRPN
PAR5
HBII-85
IPW
HBII-52
UBE3A-ATS
GABRB3
GABRA5
Otcovský chromozóm
CH3
Materský chromozóm
UBE3A
ATP10A
GABRB3
GABRA5

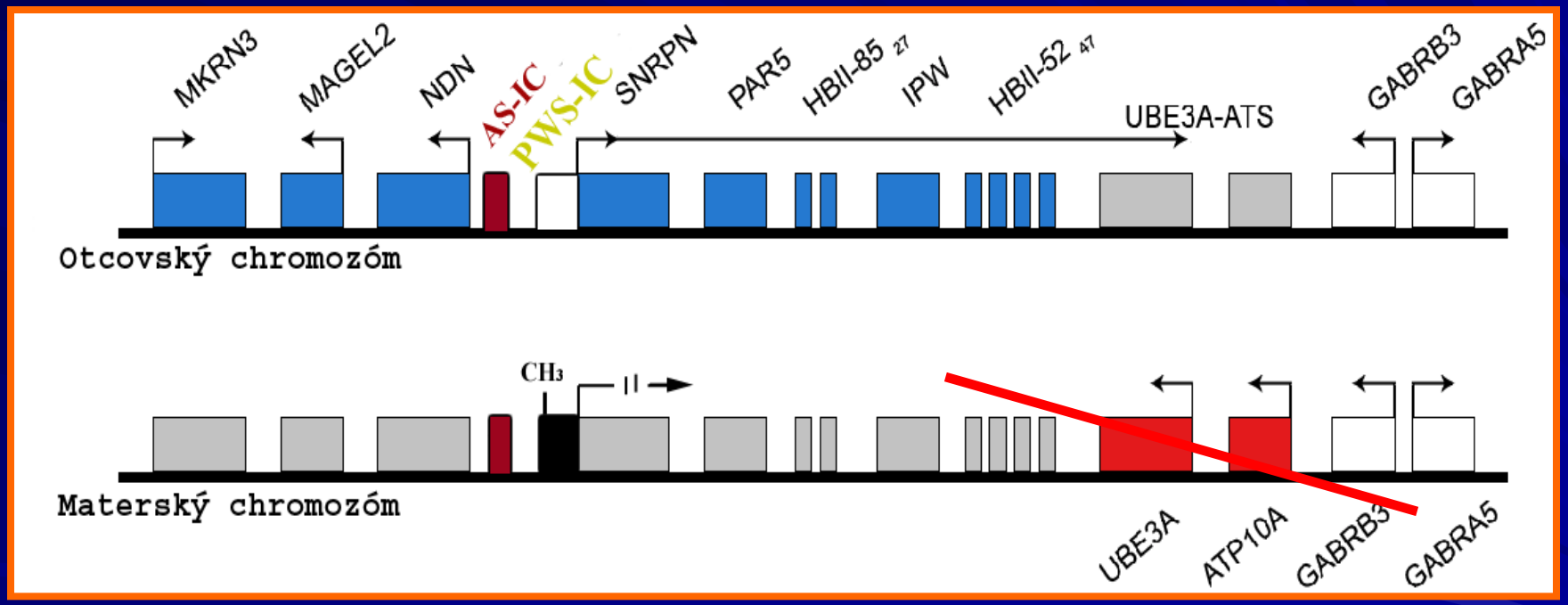
PRADEROV-WILLIHO SYNDRÓM

Incidencia
1:10 000- 1:15 000 živo narodených detí

Obr. 3. Pacienti s centrálnou obezitou a hypogonádizmom (Cassidy a Driscoll, 2009).

Klinické aspekty

- novorodenecká a dojčenská hypotónia
- centrálna obezita
- mandľové oči, strabizmus
- hypoplázia mieška, kryptorchizmus, malý penis a testes u mužov
- absencia alebo ťažká hypoplázia labia minora a klitorisu u žien
- hyperfágia
- tvárové tiky
- skolióza, kyfóza
- výbušnosť, násilnícke a agresívne vzplanutia


MKRN3
MAGEL2
NDN
AS-IC
PWS-IC
SNRPN
PAR5
HBII-85
IPW
HBII-52
UBE3A-ATS
GABRB3
GABRA5
Otcovský chromozóm
CH3
Materský chromozóm
UBE3A
ATP10A
GABRB3
GABRA5

ANGELMANOV SYNDRÓM

Incidencia

1:15 000 živo narodených detí

Klinické aspekty

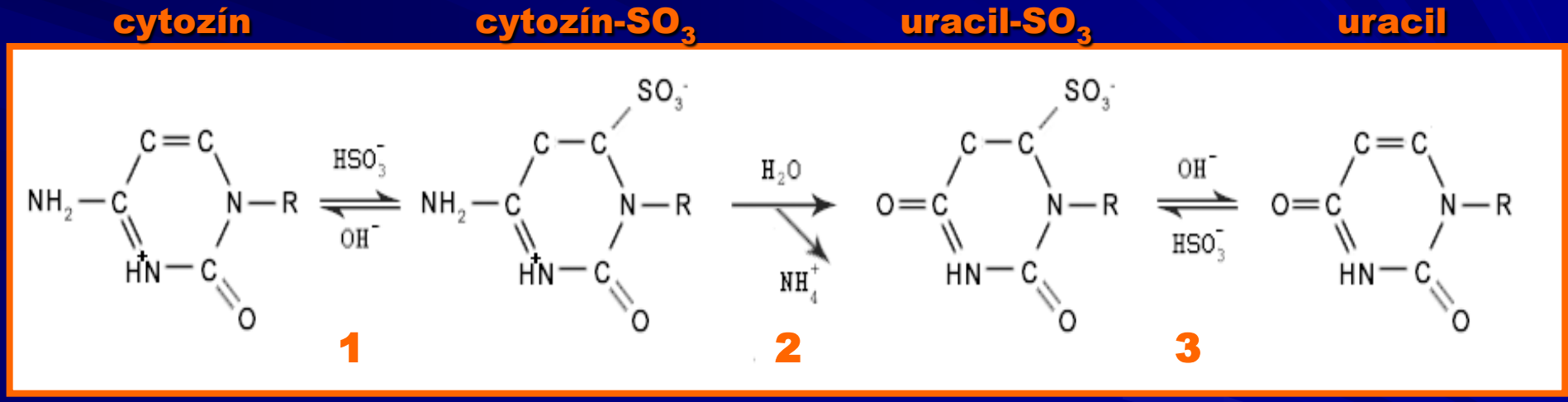
- bez defektov v prenatálnom a novorodeneckom období
- závažné funkčné oneskorenie vývoja
- porucha držania tela spojená s chybnou koordináciou pohybov (ataxia)
- rýchle trhnutia v končatinách spôsobené svalovými zášklbmi
- poškodenie reči
- epileptické záchvaty
- široké ústa so širokými medzerami medzi zubami
- kombinácia častého smiechu a usmievania

Obrázok č. 4: Typická tvár AS pacienta Široké ústa so širokými zubami, hypopigmenácia (www.psychnet-uk.com).

CIELE

- Zaviesť komplexnú diagnostiku pacientov s Praderovým-Williho a Angelmanovým syndrómom.
- Optimalizovať vhodné molekulárno- genetické metódy pre absolútne vylúčenie falošne pozitívnych/negatívnych výsledkov.
- Zdokonaliť rutinnú molekulárno-genetickú diagnostiku zavedením vhodnej a spoľahlivej metódy na detekciu kauzálnej príčiny vzniku oboch syndrómov.
- Aplikovať výsledky na genetické poradenstvo.

Modifikácia nemetylovaných cytozínov hydrogénsiričitanovou reakciou

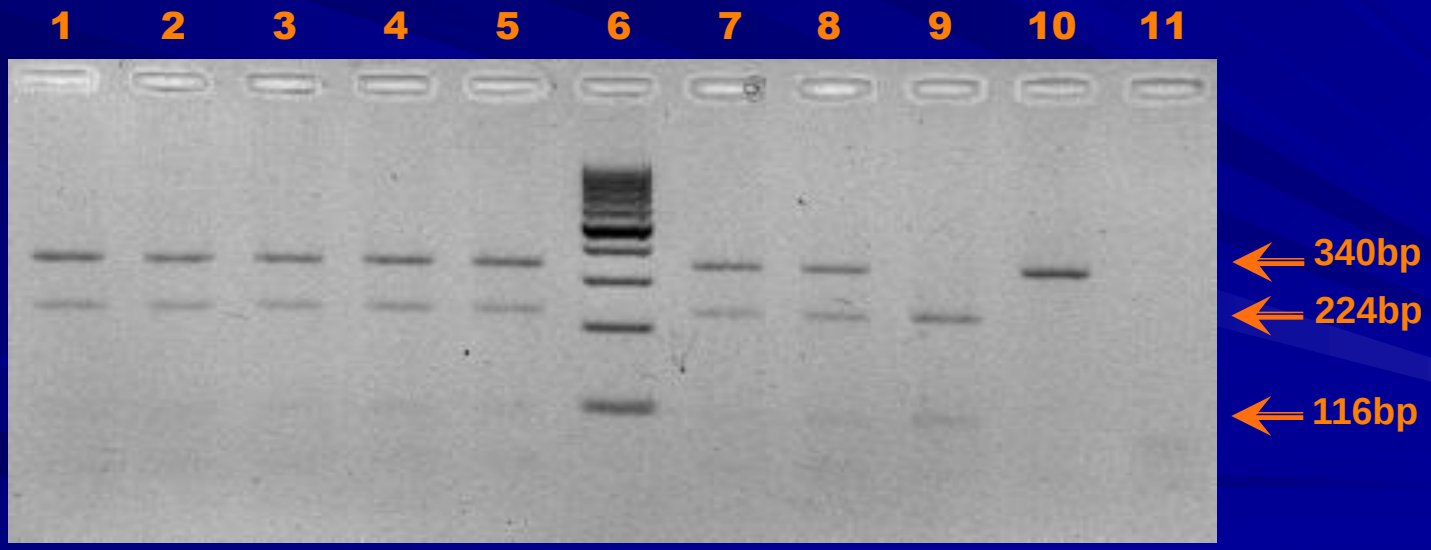


Obr. 5. Schematické znázornenie hydrogénsiričitanovej reakcie. Krok 1. znázorňuje sulfonáciu, krok 2. hydrolytickú deamináciu a krok 3. alkalickú desulfonáciu.

Štiepenie pomocou *HhaI*

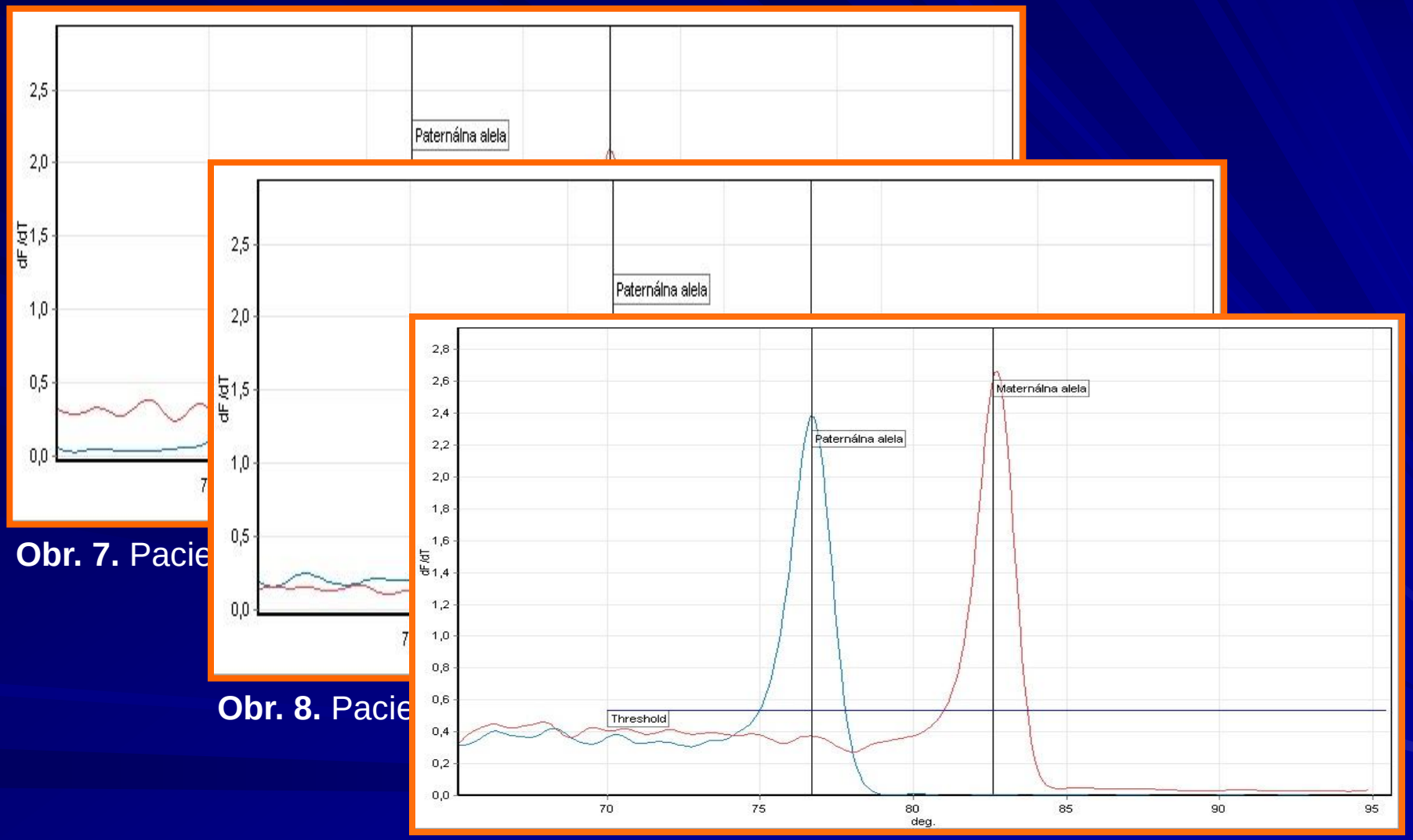
1) Amplifikácia sekvencie DNA z 5´regiónu *SNRPN* génu s dĺžkou 408bp.
2) Nested PCR - amplifikácia kratšieho úseku *SNRPN* génu s dĺžkou 340bp.
3) Štiepenie PCR produktu z nested PCR o dĺžke 340bp restrikčnou endonukleázou *HhaI*, ktorá štiepi sekvenciu: 5'- GCG▼C -3'

3'- C▲GCG -5' na pôvodne metylovanej, hydrogénsiričitanou reakciou nemodifikovanej, alele.



Obr. 6. Odlíšenie materskej a otcovskej alely restrikčnou analýzou génu *SNRPN.*

Real-time PCR



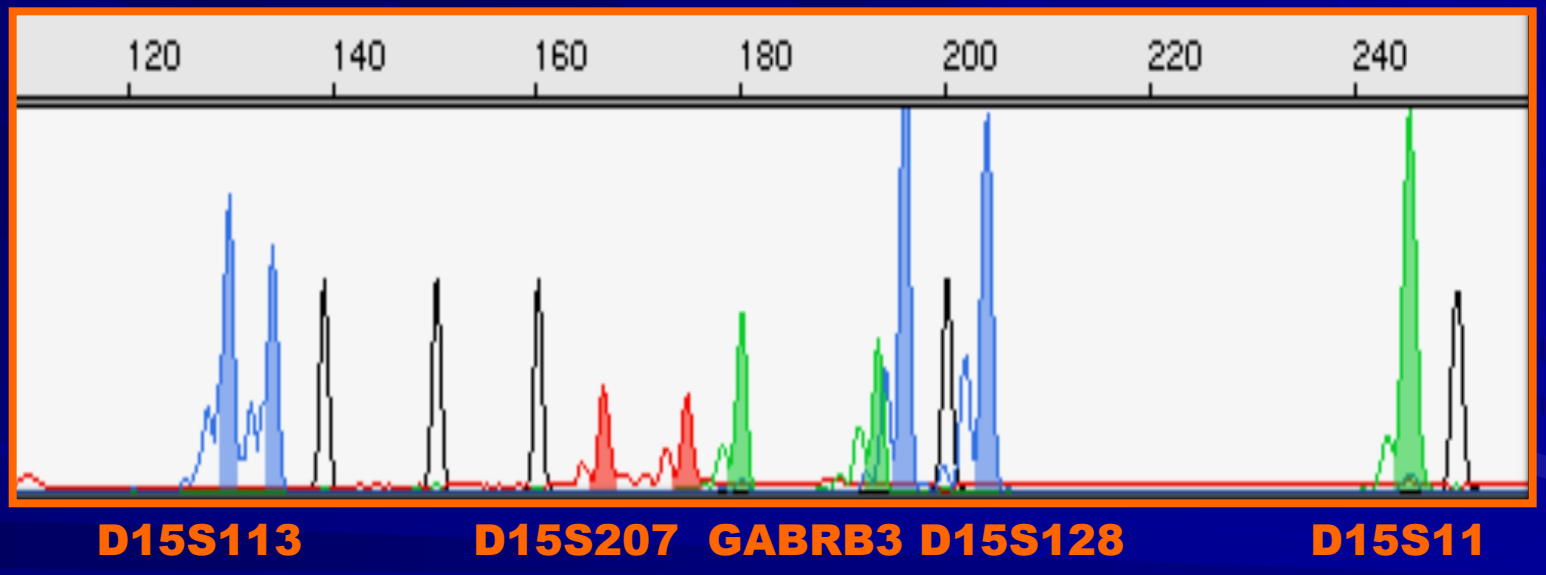
Obr. 7. Pacie

Obr. 8. Pacie

Obr. 9. Pacient negatívny na oba syndrómy

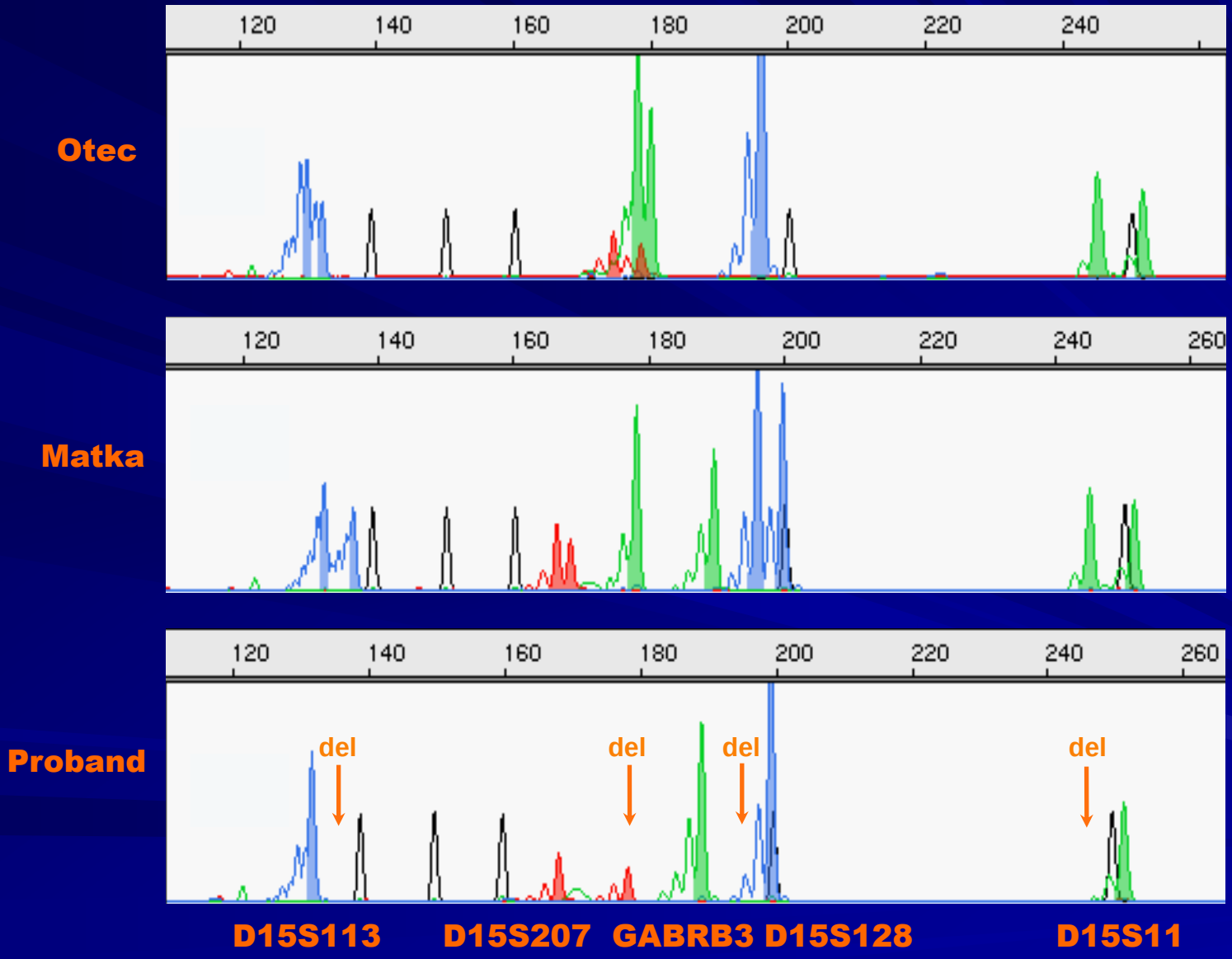
Fluorescenčná multiplex-PCR

- Metóda na určenie molekulovo-genetickej podstaty vzniku syndrómov, zameraná na polymorfizmus 2nt opakovaní na lokusoch D15S11,GABRB3, D15S113, D15S128 a kontrolnom lokuse D15S207 v rámci PWS/AS kritickej oblasti.

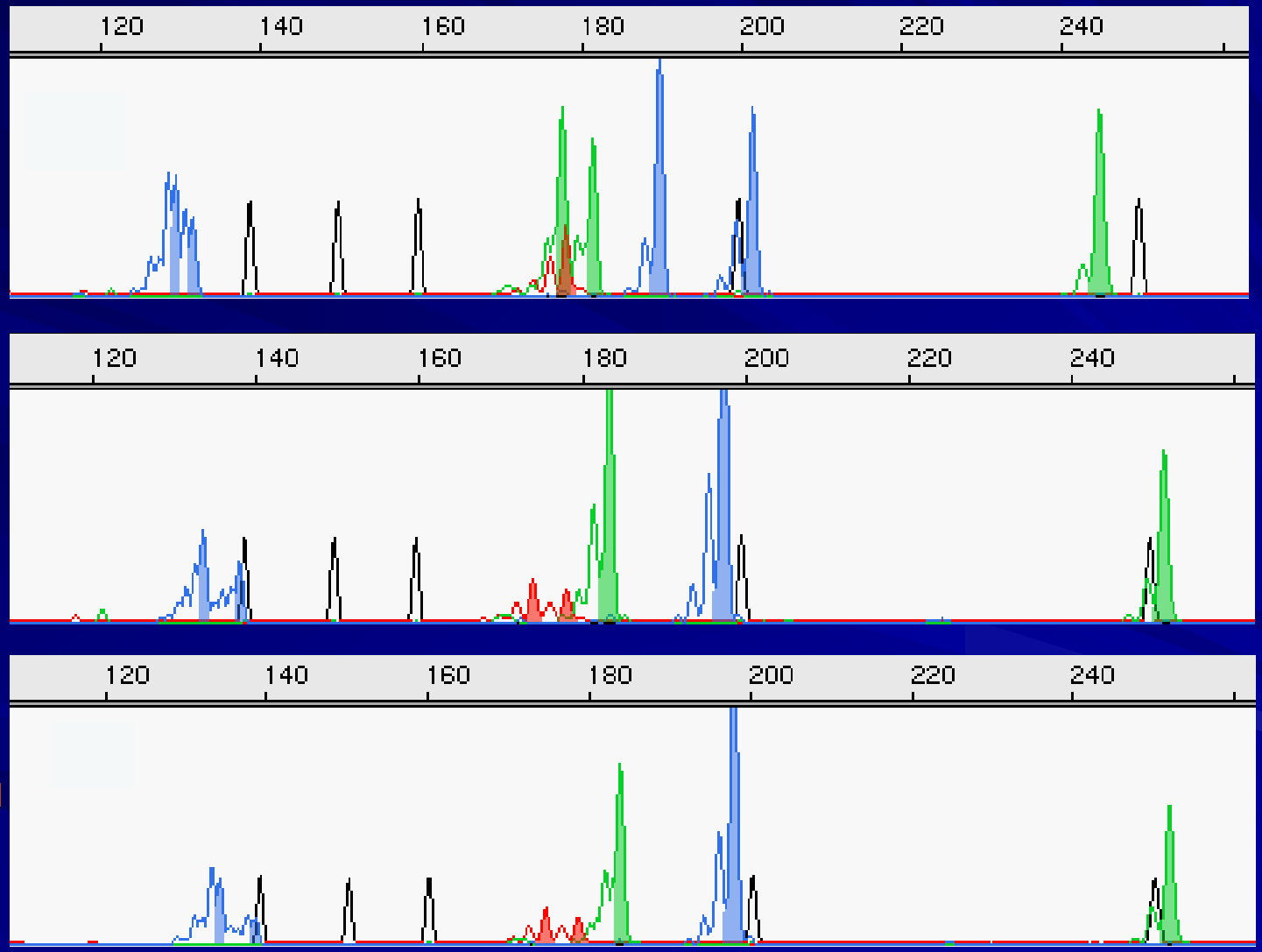


Obr. 10. Výsledok fragmentačnej analýzy, rozmiestnenie lokusov

Rodina s deléciou (del)



Rodina s uniparentálnou dizómiou (UPD)



Závery

- Použitie dvoch navzájom nezávislých metód umožňuje minimalizovať riziko nesprávnych interpretácií výsledkov.
- Pre potreby rutinnej diagnostiky sme zaviedli dve metódy. Prvou je PCR amplifikácia parentálnych aliel *SNRPN* génu pozostávajúca z dvoch na seba nadväzujúcich PCR a zo štiepenia restrikčnou endonukleázou *HhaI.*
- Ako verifikačnú metódu sme použili real-time PCR s alelovo-špecifickými primermi.
- Zaviedli sme metódu na určenie molekulovo-genetického pozadia vzniku oboch syndrómov.
- Dovedna sme za dva a pol roka vyšetrili vyše osemdesiat pacientov s podozrením na Praderov-Williho (PWS) a Angelmanov syndróm (AS). Z tohto súboru sme diagnostikovali u jedného pacienta AS a u ôsmych PWS.
- U štyroch pacientov s PWS sa nám podarilo získať vzorky DNA od oboch rodičov. U dvoch z nich sme ako príčinu vzniku syndrómu určili deléciu a u ďalších dvoch uniparentálnu dizómiu.
- V súčasnosti sme na Slovensku jediné pracovisko, ktoré sa zaoberá takouto diagnostikou pomocou molekulovo-genetických metód.