

Leitlinien für die molekulare und cytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom

1. Klinischer Hintergrund

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) sind distinkte neurogenetische Erkrankungen, die durch den Funktionsverlust elternspezifischer geprägter Gene im Bereich 15q11-q13 hervorgerufen werden. Neugeborene mit PWS zeigen eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie und Trinkschwäche. Im Säuglingsalter bessert sich die Störung der Nahrungsaufnahme und geht im Kleinkindalter in eine Hyperphagie über, die zu Adipositas führt. Weitere Kennzeichen sind ein Hypogonadismus, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, eine meist moderate mentale Retardierung sowie Verhaltensprobleme. Patienten mit AS zeigen eine verzögerte Entwicklung, eine schwere mentale Retardierung, eine Ataxie und entwickeln in der Regel keine aktive Sprache. Weitere Symptome sind eine Mikrozephalie, spezifische EEG-Veränderungen, häufige Lachanfalle und ein ausgeprägt freundliches Verhalten.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

Ein ca. 2 Mbp großer Bereich in 15q11-q13 (Abb. 1) unterliegt einer elternspezifischen Prägung (*genomic imprinting*). Infolge der Prägung unterscheiden sich die väterliche und mütterliche Kopie dieses Bereichs in ihrer Chromatinstruktur, der DNA-Methylierung und der Genexpression. Die Prägung wird durch ein zweiteiliges *imprinting center* (IC) kontrolliert, das mit dem *SNRPN* Gen überlappt oder identisch ist. *SNRPN* und mehrere andere Gene werden nur vom väterlichen Chromosom 15 exprimiert. Der 5' Bereich dieser Gene ist auf dem väterlichen Chromosom unmethyliert und auf dem mütterlichen Chromosom methyliert. Eines oder mehrere dieser Gene codieren in ihren Introns kleine nukleoläre RNAs (*snoRNAs*). *UBE3A* wird in den meisten Zellen bi-allelisch, im Gehirn aber nur vom mütterlichen Chromosom exprimiert. An der Kontrolle der *UBE3A*-Expression scheint ein antisense Transkript beteiligt zu sein.

3. Ätiologie von PWS und AS

PWS wird durch den Funktionsverlust von Genen hervorgerufen, die nur auf dem väterlichen Chromosom 15 aktiv sind. Der Funktionsverlust ist in mehr

als 99% aller Patienten Folge einer 3-4 Mbp großen Deletion auf dem väterlichen Chromosom 15, einer maternalen uniparentalen Disomie (UPD 15) oder eines Imprintingfehlers (mütterliche Prägung des väterlichen Chromosoms). Ungefähr 10% der Imprintingfehler sind auf eine 8-200 kb große IC-Deletion zurückzuführen, die immer Exon 1 von *SNRPN* miteinschließt. Punktmutationen im IC wurden bislang nicht identifiziert. In äußerst seltenen Fällen wurde eine balancierte Translokation mit Bruchpunkt in 15q11-q13 beobachtet, wobei aber kein typisches PWS vorlag. Die Häufigkeit der verschiedenen Ursachen und das Wiederholungsrisiko sind in Tabelle 1 angegeben.

AS wird durch den Funktionsverlust von *UBE3A* hervorgerufen. Neben einer 3-4 Mbp Deletion auf dem mütterlichen Chromosom 15, einer paternalen UPD 15 und eines Imprintingfehlers (väterliche Prägung des mütterlichen Chromosoms) kann *UBE3A* auch durch eine Genmutation und andere, bislang nicht geklärte Mechanismen inaktiviert werden (Tabelle 2). In einem Fall wurde eine auf *UBE3A* begrenzte Deletion nachgewiesen. Ungefähr 10% der Imprintingfehler sind auf eine 5-80 kb große IC-Deletion stromaufwärts von *SNRPN* Exon 1 zurückzuführen; in einem Fall wurde eine 1,5 Mbp große paracentrische Inversion mit Bruchpunkt im IC nachgewiesen. Punktmutationen im IC wurden bislang nicht identifiziert.

Generell ist das Wiederholungsrisiko für PWS und AS gering. Die 3-4 Mbp große Deletion und die UPD treten fast immer sporadisch auf. Bestimmte Chromosomenaberrationen bei einem Elternteil (z.B. eine Translokation unter Beteiligung des Chromosoms 15) können aber das Wiederholungsrisiko für eine dieser Aberrationen erhöhen. Imprintingfehler ohne IC-Deletion oder Rearrangement scheinen sporadisch zu sein. IC- und *UBE3A*-Mutationen können sporadisch und familiär auftreten. Bei familiärem Auftreten besteht ein Wiederholungsrisiko von 50%. Es ist zu beachten, dass IC- und *UBE3A*-Mutationen durch Nichterkrankte vererbt werden und

auch bei entfernt verwandten Familienmitgliedern vorliegen können.

4. Diagnostische Strategie

Da erfahrungsgemäß bei den meisten Proben kein PWS oder AS vorliegt, beginnt die Diagnostik in der Regel mit der Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens. Dieser Test ist auffällig bei maternalen und paternalen Deletionen, maternalen und paternalen Disomien sowie allen Imprintingfehlern, unterscheidet aber nicht zwischen den drei Ursachen. Der Test identifiziert praktisch alle Patienten mit PWS und die meisten Patienten mit AS. Bei einem normalen Testergebnis ist deshalb ein PWS mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Dies trifft für AS nicht zu, da *UBE3A*-Mutationen und andere Mechanismen das Methylierungsmuster nicht verändern. Wird nach einem Normalbefund des Methylierungstests der klinische Verdacht auf AS aufrecht erhalten, sollte eine *UBE3A*-Mutationsanalyse in einem Speziallabor erfolgen. Wird bei dem Probanden eine *UBE3A*-Mutation nachgewiesen, wird auch der Mutter und gegebenenfalls weiteren Familienangehörigen die Untersuchung angeboten.

Ist der Methylierungstest auffällig und soll das Wiederholungsrisiko abgeschätzt werden, muss zwischen einer Deletion, einer UPD und einem Imprintingfehler unterschieden werden. Hierfür bietet sich die Mikrosatellitenanalyse an. Da eine Deletion mit 70% die häufigste Ursache für PWS und AS ist, kann an dieser Stelle auch eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH-Analyse) durchgeführt werden. Wird durch Mikrosatelliten- oder FISH-Analyse eine Deletion nachgewiesen, sollte bei PWS der Vater und bei AS die Mutter mittels FISH untersucht werden, um eine kryptische Translokation auszuschließen. Bei einem normalen FISH-Befund des Patienten muss mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse zwischen uniparentalen und biparentalen Chromosomen unterschieden werden.

Ein abnormaler Methylierungsbefund bei biparentalen Chromosomen ohne typische Deletion deutet auf einen Imprintingfehler hin. In diesem Fall sollte in einem Speziallabor eine IC-Dele-

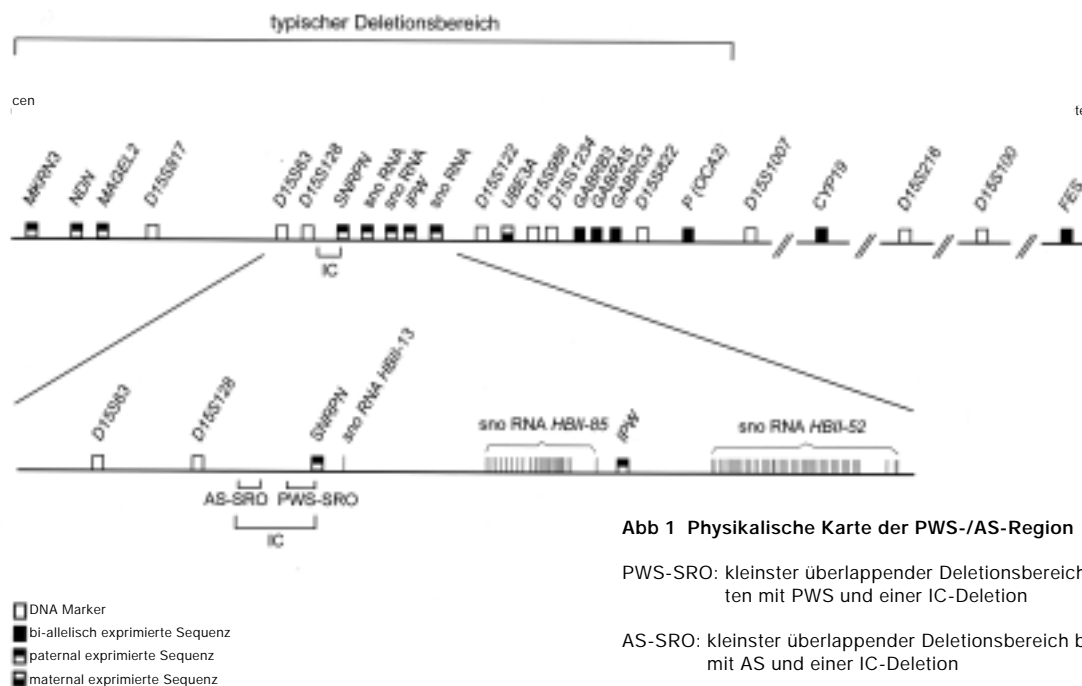


Abb 1 Physikalische Karte der PWS-/AS-Region

PWS-SRO: kleinster überlappender Deletionsbereich bei Patienten mit PWS und einer IC-Deletion

AS-SRO: kleinster überlappender Deletionsbereich bei Patienten mit AS und einer IC-Deletion

tionsanalyse durchgeführt werden. Ein erster Hinweis auf das Vorliegen einer IC-Deletion bei PWS ist ein abnormales Methylierungsmuster beim Vater des Patienten. Bei AS ist eine Methylierungsanalyse bei der Mutter nicht richtungweisend, weil eine AS IC-Deletion nie das Exon 1 von *SNRPB* miteinschließt. Wird bei dem Probanden eine IC-Deletion nachgewiesen, wird auch den Eltern (bei PWS dem Vater, bei AS der Mutter) und ggf. weiteren Familienangehörigen die Untersuchung angeboten.

Eine Chromosomenanalyse hat heutzutage keinen Stellenwert mehr für die primäre Diagnostik bei PWS und AS, ist aber als zusätzliche Untersuchungsmethode im Rahmen differentialdiagnostischer Überlegungen indiziert. Bei einer Deletion oder UPD wird zur Abklärung einer Chromosomenaberration mit erhöhtem Wiederholungsrisiko die cytogenetische Untersuchung des Patienten und beider Eltern empfohlen.

5. Testverfahren

5.1. Methylierungstest

Bei der Analyse wird die differentielle Methylierung am 5' Ende von *SNRPB* untersucht. Hierfür eignet sich DNA aus EDTA-Blut, Chorionzotten und Amnionzellen des Probanden. *D15S63* (PW71) sollte nicht mehr verwendet werden, da es ein Nullallel gibt und der Locus in Chorionzotten und Amnionzellen untermethyliert sein kann. Für die Untersuchung wird eine methylyspezifische PCR an bisulfit-be-

handelter DNA nach Kubota et al. (1997) oder Zeschnick et al. (1997) oder eine Southernblot-Analyse mit methylierungssensitiven Enzymen empfohlen. Bei der Bisulfitbehandlung ist darauf zu achten, dass die Lösungen arbeitstäglich frisch angesetzt werden. Die PCR muss so optimiert sein, dass die beiden Banden bei Normalkontrollen gleich stark sind. Bei der Verwendung methylierungssensitiver Enzyme muss durch Zumischung einer Test-DNA zum Verdauungsansatz die Vollständigkeit der Verdauung kontrolliert werden. In jeder Testreihe müssen eine Normalkontrolle, eine PWS-Kontrolle und eine AS-Kontrolle mitgeführt werden. Bei einer Deletion, einer UPD oder einem Imprintingfehler fehlt die mütterliche Bande (AS) oder die väterliche Bande (PWS).

5.2. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Für die Präparation von Metaphase-Chromosomen wird Heparin-Blut benötigt. Als Sonden für die FISH-Analyse werden *SNRPB* und *UBE3A* empfohlen. Für den distalen Bereich von 15q11-q13 stehen auch andere Sonden zur Verfügung (z.B. *D15S10* und *GABRB3*), mit denen aber eine auf *UBE3A* begrenzte Deletion übersehen würde. Zur Identifizierung des Chromosoms 15 wird eine Sonde für einen distal gelegenen Locus, z.B. *PML* verwendet. Ist ein Chromosom 15 negativ für *SNRPB* und *UBE3A*, liegt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine typische 3-4 Mbp Deletion vor. Ist nur *SNRPB* deletiert, kann es sich um eine größere PWS IC-Deletion handeln.

5.3. Mikrosatellitenanalyse

Für die Mikrosatellitenanalyse wird DNA des Probanden und der Eltern benötigt. Es werden Loci innerhalb des typischen Deletionsbereichs („interne Marker“) und Loci außerhalb des typischen Deletionsbereichs („externe Marker“) untersucht. Als interne Marker werden *D15S817*, *D15S128*, *D15S122*, *D15S986*, *D15S1234* und *D15S822* empfohlen. Als externe Marker werden *D15S1007*, *CYP19*, *D15S216*, *D15S100* und *FES* empfohlen. Wegen möglicher Nullallele und anderer Probleme sollten *D15S542* und *D15S113* nicht benutzt werden. Bei Nachweis eines abnormalen Methylierungsmusters sollte mindestens ein interner Marker und ein externer Marker informativ sein. Fehlt bei internen Markern ein elterliches Allel, während bei externen Markern Allele beider Eltern nachweisbar sind, handelt es sich um eine Deletion. Fehlt bei internen und bei externen Markern ein elterliches Allel, handelt es sich um eine UPD. Bei einer UPD können isodisome und heterodisome Bereiche vorkommen. Sind bei internen und externen Markern Allele beider Eltern nachweisbar, handelt es sich bei Vorliegen eines abnormalen Methylierungsmusters um einen Imprintingfehler.

5.4. Imprinting-Center Analyse

Die Suche nach einer IC-Deletion ist keine Routineuntersuchung und erfordert spezielle Sonden und Methoden¹.

5.5. *UBE3A* Mutationsanalyse

Die Suche nach einer *UBE3A*-Mutation erfolgt nach Standardmethoden².

Tab 1 Molekulare Klassen bei PWS

Ätiologie	paternale Deletion	maternale UPD	IC Deletion	Imprintingfehler	keine IC Deletion	balancierte Translokation
Häufigkeit	≈70 %	≈29 %	≈0.1 %	≈0.8 %		(weltweit 5 Fälle)
WR*	< 1%	< 1%	< 50 %	< 1 %		< 1%

* Wiederholungsrisiko bei normalen elterlichen Chromosomen

Tab 2 Molekulare Klassen bei AS

Ätiologie	maternale Deletion	paternale UPD	IC Deletion/ Rearrangement	Imprintingfehler	keine IC Deletion	UBE3A Mutation	andere Mutation
Häufigkeit	≈70 %	≈1 %	≈0.5 %	≈3.5 %	≈5 %	≈20%	
WR*	< 1%	< 1%	< 50 %	< 1 %	< 50 %	?	

* Wiederholungsrisiko bei normalen elterlichen Chromosomen

6. Bericht

Der Bericht sollte kurz und präzise sein, muss aber neben den üblichen Angaben folgende Punkte umfassen:

· Methode

z.B. Methylierungstest, untersuchtes Gen, etc.

· Ergebnis

z.B. Fehlen der väterlichen/mütterlichen Bande im Methylierungstest.

· Bewertung

z.B. bei auffälligem Methylierungsmuster: „Dieser Befund bestätigt die Diagnose eines Prader-Willi-Syndroms (eines Angelman-Syndroms).“

z.B. bei normalem Methylierungsmuster (Indikation PWS): „Damit sind eine Deletion, eine uniparentale Disomie und ein Imprintingfehler ausgeschlossen und ein Prader-Willi-Syndrom ist sehr unwahrscheinlich.“

z.B. bei normalem Methylierungsmuster (Indikation AS): „Damit sind eine Deletion, eine uniparentale Disomie und ein Imprintingfehler ausgeschlossen. Dieser Befund schließt aber ein Angelman-Syndrom nicht definitiv aus. Sollte weiterhin ein Verdacht auf AS bestehen, empfehlen wir eine Mutationsanalyse des UBE3A-Gens.“

· Empfehlung einer humangenetischen Beratung bei pathologischem Befund

Gegebenenfalls müssen zusätzliche Punkte aufgenommen werden:

· Empfehlung weiterer Untersuchungen (z.B. Chromosomen-, IC- oder UBE3A-Analyse)

· Anforderung zusätzlicher Proben (z.B. Heparinblut des Probanden, Proben der Eltern)

· Hinweis auf die Möglichkeit einer vorgeburtlichen Untersuchung

· Kontaktadresse der PWS bzw. AS Selbsthilfegruppe

(siehe SHG-Liste auf der www.BVmedgen.de Webpage)

Anmerkungen

1) Diese Analyse wird z.Zt. nur am Institut für Humangenetik in Essen angeboten.

2) Diese Analyse wird z.Zt. nur am Institut für Humangenetik in Berlin angeboten.

Literatur

Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet*, 16:16-17

Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet*, 5:94-98

Verfasser

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Horsthemke, Institut für Humangenetik, Essen (Ringversuchsleiter Molekulare Diagnostik von PWS und AS) Hufelandstr. 55 45122 Essen Tel 0201-723 4556 Fax 0201-723 5900 b.horsthemke@uni-essen.de

PD Dr. med. Oliver Bartsch, Institut für Klinische Genetik, Dresden (Ringversuchsleiter Locus-spezifische FISH-Diagnostik)

Dr. med. Joachim Bürger, Institut für Humangenetik, Berlin Dr. rer. nat. Karin Buiting, Institut für Humangenetik, Essen PD Dr. med. Gabriele Gillissen-Kaesbach, Institut für Humangenetik, Essen Dr. rer. nat. Bart Janssen, Institut für Humangenetik, Heidelberg

Zitierhinweis

Berufsverband Medizinische Genetik e.V., Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (2001) Leitlinien für die molekulare und cytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom. *medgen* 13: 71-73.