

**Estudi del gen UBE3A en la Síndrome
d'Angelman i del centre d'impressió en les
Síndromes de Prader-Willi i d'Angelman.**

Coberta anterior: Aquarel·la *DNA* de Paul Moyne.
Reproduït amb el permís de l'autor.
<http://paul.moyne.free.fr>

**Estudi del gen UBE3A en la Síndrome
d'Angelman i del centre d'impressió en les
Síndromes de Prader-Willi i d'Angelman.**

Memòria presentada per na Cristina Camprubí i Sánchez per a
obtenir el grau de Doctora en Biologia Cel·lular per la Universitat
Autònoma de Barcelona

Cristina Camprubí

Bellaterra, juny de 2005

La Dra. M. Dolors Coll i Sandiumenge del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Míriam Guitart i Feliubadaló, Cap de Secció de Genètica i Immunologia de la UDIAT-Laboratori, Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell-Fundació Parc Taulí-UAB,

CERTIFIQUEN:

Que na Cristina Camprubí Sánchez ha realitzat sota la seva direcció, a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball de Tesi Doctoral titulat:

Estudi del gen UBE3A en la Síndrome d'Angelman i del centre d'impressió en les Síndromes de Prader-Willi i d'Angelman.

I perquè consti, signen el present certificat

Bellaterra, juny de 2005

Dra. M. Dolors Coll i Sandiumenge

Dra. Míriam Guitart i Feliubadaló

A mis padres y a mi hermano.
Mi luz y mi columna.
Mi mayor orgullo.

A qui escolta el meu silenci
i m'acompanya,
fins i tot en l'absència.
A qui he estimat, i estimo.

Ayudadme a comprender lo que os digo
y os lo explicaré mejor.

Antonio Machado

1. Introducció

1.1. La impressió genètica	1
1.2. Regió cromosòmica 15q11-q13	5
1.2.1. El centre d'impressió de la regió 15q11-q13	10
1.2.1.1. <i>Anàlisi de metilació del centre d'impressió de la regió 15q11-q13</i>	14
1.2.2. Funció, estructura i mutacions del gen UBE3A	16
1.3. Descripció de les Síndromes de Prader-Willi i Angelman	18
1.3.1. Manifestacions clíniques	19
1.3.2. Causes genètiques i consell genètic	22
1.3.3. Correlacions fenotip-genotip	27
1.4. Objectius	31

2. Material i mètodes

2.1. Pacients	33
2.2. Metodologia experimental	37
2.2.1. Extracció de DNA de postres de sang perifèrica	37
2.2.2. Anàlisi del patró de metilació	39
2.2.2.1. <i>Southern blot</i>	39
2.2.2.2. <i>M-PCR</i>	39
2.2.3. Cribatge de mutacions en els exons 15 i 16 del gen UBE3A per SSCP	41
2.2.3.1. <i>Condicions d'amplificació i detecció</i>	42
2.2.4. Cribatge de mutacions en el gen UBE3A per seqüenciació directa	45
2.2.4.1. <i>Condicions d'amplificació i detecció</i>	47
2.2.4.2. <i>Seqüenciació automàtica de productes de PCR</i>	48
2.2.5. Separació d'al·lels per clonatge	49
2.2.5.1. <i>Clonatge</i>	50
2.2.5.2. <i>Seqüenciació d'al·lels</i>	50
2.2.6. Anàlisi del centre d'impressió per <i>Southern blot</i> i per PCR quantitativa	50
2.2.6.1. <i>Southern blot</i>	51
2.2.6.2. <i>PCR quantitativa</i>	54
2.2.7. Estudi de l'origen familiar del cromosoma portador del defecte d'impressió per <i>Southern blot</i>	56
2.2.8. Seqüenciació del centre d'impressió	58

3. Resultats

3.1. Estudi del patró de metilació	59
3.1.1. Pacients SPW	59
3.1.2. Pacients SA	59
3.2. Estudi de mutacions en el gen UBE3A en pacients SA	60
3.2.1. Tècnica SSCP i posterior seqüenciació	61
3.2.1.1. Anàlisi de l'exó 15	61
3.2.1.2. Anàlisi de l'exó 16	62
3.2.2. Seqüenciació automàtica del DNA	64
3.3. Estudi del centre d'impressió en pacients SPW i SA	80
3.3.1. Tècnica <i>Southern blot</i>	80
3.3.2. Tècnica PCR quantitativa	83
3.3.3. Seqüenciació del CI	85

4. Discussió

4.1. Estudi del patró de metilació	87
4.1.1. Valoració de la tècnica M-PCR	87
4.1.2. Resultats globals	88
4.2. Estudi de mutacions en el gen UBE3A en pacients SA	89
4.2.1. Consideracions de les tècniques emprades	90
4.2.2. Valoració de les mutacions detectades	91
4.2.2.1. Exó 9	91
4.2.2.2. Exó 11	92
4.2.2.3. Exó 15	93
4.2.2.4. Exó 16	94
4.2.3. Valoració global de la sèrie SA amb anàlisi del gen UBE3A	96
4.3. Estudi del centre d'impressió en pacients SPW i SA amb defecte d'impressió	100
4.3.1. Tècniques moleculars aplicades a l'estudi del centre d'impressió	101
4.3.2. Valoració dels resultats obtinguts en els pacients SPW	103
4.3.3. Valoració dels resultats obtinguts en els pacients SA	105
4.4. Algoritme diagnòstic de la SPW i la SA	108

5. Conclusions	111
-----------------------	-----

Bibliografia	115
---------------------	-----

Agraïments

Final

1.1. La impressió genètica

La impressió genètica és un procés epigenètic pel qual, a la línia germinal masculina i femenina, es marquen regions cromosòmiques específiques de forma diferencial (*Differentially methylated regions: DMR*). Aquesta marca s'esborra i s'estableix de nou a la línia germinal a cada generació segons el sexe de l'individu i s'hereta de forma estable en les successives divisions de les cèl·lules somàtiques durant el desenvolupament postzigòtic, i que es manté després del naixement. Els gens regulats per aquest fenomen no es troben distribuïts a l'atzar en el genoma sinó que es troben agrupats en *clusters*, fet que suggereix que la impressió genètica no controla un únic gen, sinó un domini cromosòmic. Molts d'aquests gens amb expressió depenent de l'origen parental són importants en el desenvolupament embrionari.

S'han proposat diverses teories sobre l'origen evolutiu de la impressió genètica, lligades al fet d'haver identificat gens regulats per aquest mecanisme en plantes amb flor, mamífers metateris (marsupials) i euteris (placentaris), però no en prototeris (monotremes). Una de les teories més debatudes ha estat la proposada per Moore i Haig (1991), segons la qual la impressió genètica hauria sorgit en l'evolució per equilibrar el conflicte d'interessos entre el comportament activador dels gens paternals, que empenyen evolutivament a l'increment del creixement fetal i a l'aprofitament dels recursos materns en benefici de la salut de la descendència, mentre que els gens materns serien repressors limitant la mida fetal i els recursos al llarg de la gestació. Segons aquest raonament, la impressió genètica tant sols seria rellevant per a les espècies de mamífers amb gestació intrauterina (Reik i Walter, 2001; Murphy i Jirtle, 2003).

Tot i que els mecanismes moleculars implicats en la impressió genètica són bastant desconeguts, s'han identificat diferents modificacions en la cromatina i en el DNA. Una de les modificacions més importants associades a la impressió genètica és la metilació del DNA en el carboni 5

del nucleòtid citosina, quan a aquest li segueix una guanina (dinucleòtids CpG). La metilació de les regions DMR sol anar associada a inactivació gènica. Aquestes regions són illes CpG i corresponen a regions promotores de gens. La metilació del DNA *de novo* és catalitzada per la família de les DNA metiltransferases 3 (DNMT3), però en el cas de la replicació, l'enzim implicat en la metilació de la nova cadena de DNA és la DNMT1, pel que és possible que aquest enzim es trobi associat a la maquinària de la replicació (Reik i Walter, 2001). La deficiència de DNMT1 provoca pèrdua de metilació a nivell postzigòtic i no es pot tornar a establir de nou en aquestes regions DMR amb cap dels dos enzims. D'aquí que s'hagi considerat que la metilació en les regions DMR que hagin estat desmetilades, és un procés que depèn del pas per línia germinal per la presència de factors específics que reconguin aquestes regions DMR (Tucker i col·l., 1996). Una altra funció de les DNMTs és la de reclutar deacetilases d'histones (Rountree i col·l., 2000; Aapola i col·l., 2002). Aquesta deacetilació d'histones no sembla un marcatge d'impressió en la línia germinal, però sí que pot tenir un paper en el manteniment del marcatge, ja que en teixits somàtics els gens imprintats mostren un patró específic d'acetilació d'histones depenent de l'origen parental (Saitoh i Wada, 2000; Fulmer-Smentek i Francke, 2001).

En aquests dominis també han estat descrites diferències depenents de l'origen parental com: freqüència de recombinació meiòtica (Robinson i Lalande, 1995; Paldi i col·l., 1995); asincronia en la replicació en la fase S del cicle cel·lular (Kitsberg i col·l., 1993; Knoll i col·l., 1994), característica que no succeeix en la línia germinal (Simon i col·l., 1999); diferent sensibilitat a nucleases (Schweizer i col·l., 1999), i diferències en la densitat de regions d'ancoratge a la matriu (*Matrix Attachment regions*) (Greally i col·l., 1999). Totes aquestes característiques implicades en l'establiment i/o manteniment de la impressió genètica, estan lligades a diferències en la conformació de la cromatina en un domini cromosòmic concret i a la metilació del DNA en regions promotores de gens inclosos en aquest domini.

El silenciament selectiu dels gens sotmesos a impressió genètica es regula al llarg de la vida de l'organisme. Cada gàmeta porta un marcatge específic que es requereix pel desenvolupament correcte. Aquest marcatge s'esborra en estadis primerencs de la gametogènesi i s'estableix de nou, a paquitè en la meiosi masculina, i durant o després de la fecundació en la meiosi femenina (El-Maarri i col·l., 2001; Reik i col·l., 2001). A la fecundació els dos pronuclis, epigenèticament diferents, coexisteixen en el mateix ambient dominats per factors oocitaris específics. Un fet remarcable és la pèrdua activa i ràpida de metilació en regions sotmeses a impressió en el pronucli masculí abans de la primera divisió cel·lular. Contràriament a això, el genoma matern es desmetila de forma passiva al llarg de les successives divisions cel·lulars. Malgrat que els patrons epigenètics específics de teixit emergeixen de nou durant el desenvolupament embrionari en canvi, els gens imprintats estan protegits enfront aquesta desmetilació (Reik i col·l., 2001).

Una característica important, que podria associar-se al marcatge matern a la línia germinal, és una metilació preferent de la lisina 9 de la histona H3 en la còpia materna del centre de impressió (CI) de la regió 15q11-q13 del genoma humà (Xin i col·l., 2001; Xin i col·l., 2003). Aquests autors proposen que en la línia germinal masculina aquest marcatge s'esborraria durant l'espermatogènesi com a conseqüència de la substitució de les histones per protamines.

Ha estat identificada una proteïna d'unió a DNA amb dits de zinc, específica de testis que es creu pot estar implicada en l'establiment de la impressió a línia germinal masculina (Loukinov i col·l., 2002). Aquesta proteïna anomenada BORIS (*Brother of the regulator of imprinted sites*) és un paràlog del factor d'unió a CCCTC (CTCF) que intervé en l'establiment de la impressió. La síntesi d'ambdues proteïnes és mútuament excloent, fet que suggereix que tenen funcions similars separades en l'espai i en el temps. L'expressió de BORIS al testis es limita al període de l'espermatogènesi en què s'esborren els patrons de metilació, pel que es proposa que la proteïna BORIS facilitaria el nou establiment de la

metilació, mentre que CTCF actuaria mantenint i/o llegint aquest marcatge durant el període pre- i postnatal.

Recentment s'ha obert un debat per aprofundir en els mecanismes de la impressió genètica. Ha estat descrit un augment de la freqüència de Síndrome d'Angelman (SA) i Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) causades per errors en la impressió genètica en individus concebuts mitjançant tècniques de reproducció assistida, especialment amb la tècnica d'injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoide (ICSI) (Cox i col·l., 2002; Ørstavik i col·l., 2003; DeBaun i col·l., 2003; Gosden i col·l., 2003; Maher i col·l., 2003; Niemitz i Feinberg, 2004). En la SA només el 1-5% del casos són deguts a errors en la impressió, en concret hipometilació de la còpia materna de la regió reguladora, mentre que més de la meitat de casos SBW són causats per hipometilació en la còpia materna del gen *LIT1* associat a control de creixement (DeBaun i col·l., 2003). Aquestes coincidències han portat a sospitar una associació entre errors epigenètics i reproducció assistida, així com a suggerir:

- 1) que els problemes de esterilitat dels individus que recorren a la reproducció assistida estigui lligada a problemes en la impressió en els gàmetes;
- 2) que la superovulació comporti errors alhora d'establir la impressió materna;
- 3) que la tècnica d'ICSI pugui alterar els patrons en la impressió pel fet de que no es produeixi la fecundació i activació de l'oòcit de forma natural, o bé que s'alterin les oscil·lacions de calci endarrerint la descondensació del genoma patern;
- 4) que s'interrompi la producció de factors materns implicats en l'establiment de la impressió;
- 5) que el cultiu *in vitro* dels embrions alteri els seus patrons d'impressió.

L'última hipòtesi quedaria avalada pels estudis experimentals que associen canvis epigenètics, derivats del cultiu *in vitro* d'embrions, en ratolí i rumiants amb un augment desmesurat en el creixement (*Large offspring syndrome: LOS*) (Young i col·l., 1998; Young i Fairburn, 2000). A

més, una altra dada a tenir en compte són els problemes en el desenvolupament d'embrions clonats per transferència nuclear, possiblement associats a errors epigenètics (Rideout i col·l., 2001).

El progrés en l'estudi de les regions sotmeses a impressió genètica, així com dels gens inclosos en elles i la recerca dels factors que hi participen, aportarà un major coneixement dels mecanismes i molècules implicades en esborrar, establir i mantenir la impressió genètica. L'estudi del CI que regula la regió crítica (15q11-q13) de les síndromes de Prader-Willi (SPW) i SA és important en l'assoliment d'aquest coneixement.

1.2. Regió cromosòmica 15q11-q13

Del total de gens mapats actualment en la regió 15q11-q13, de 4 Mb, han estat descrits alguns amb expressió diferencial depenent de l'origen parental que defineixen un domini de 2 Mb sotmès a impressió genètica (Figura 1). L'absència o impressió incorrecta de gens d'expressió paterna d'aquest domini causa la SPW. La SA s'associa a anomalies que afecten a un únic gen d'expressió materna, el gen UBE3A.

Pel que fa als gens d'expressió materna s'han identificat dos gens codificants per una proteïna:

- **UBE3A**: a diferència dels gens d'expressió paterna de la regió 15q11-q13 que mantenen aquest patró d'expressió en la majoria o en tots els teixits, l'expressió materna del gen UBE3A és específica del cervell i cerebel en humans i en ratolí. Estudis en ratolí han mostrat expressió monoal·lèlica materna d'Ube3a en cèl·lules de Purkinje del cerebel, neurones de l'hipocamp i cèl·lules olfatòries mitrals (Albrecht i col·l., 1997). Paral·lelament, estudis en humans han demostrat el mateix patró d'expressió del gen UBE3A (Vu i Hoffman, 1997; Rougeulle i col·l., 1997). En la resta de teixits la seva expressió és bial·lèlica.

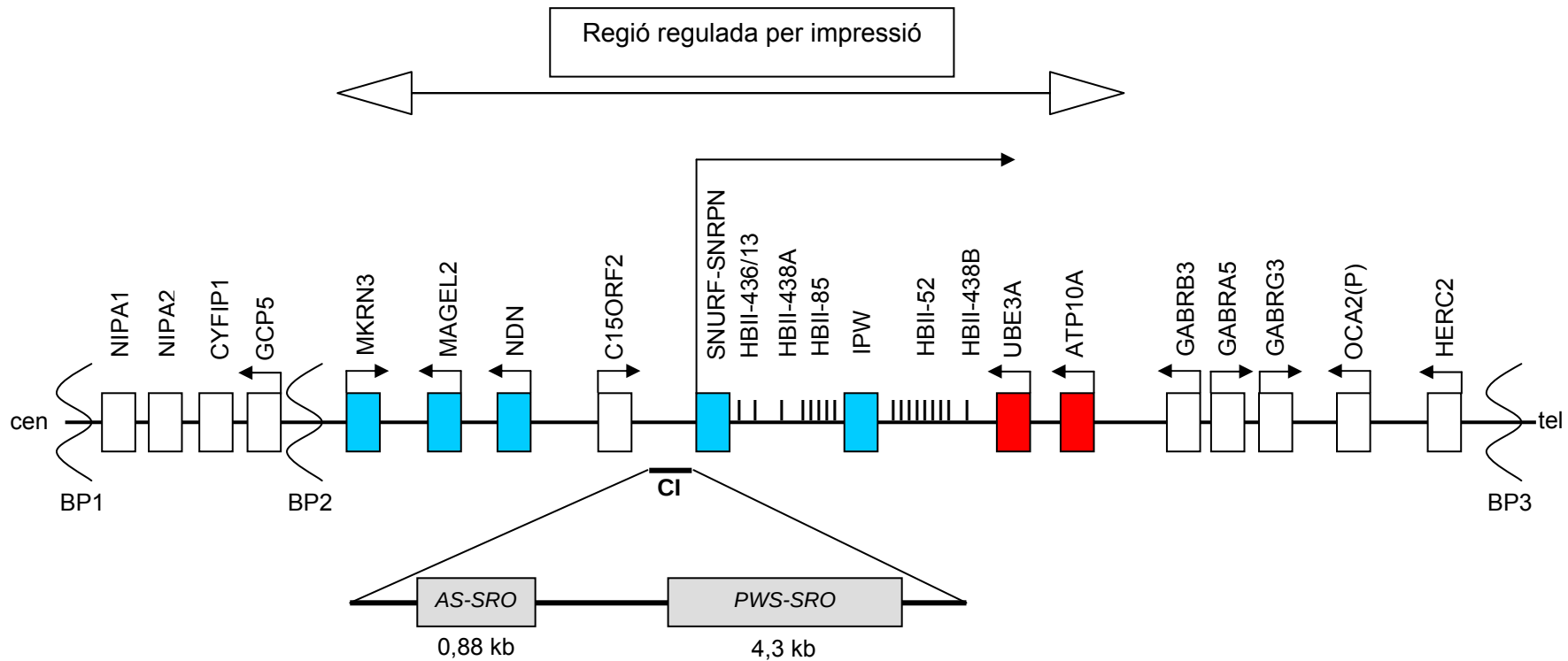


Figura 1. Esquema de la regió 15q11-q13. Blanc: gens d'expressió bial·lèlica; Vermell: gens d'expressió materna; Blau: gens d'expressió paterna. Les fletxes indiquen la orientació de la transcripció. Els gens snoRNA (HBII) corresponen a les barres verticals. CI: centre regulador de la impressió. BP (*Break Point*): punts de trencament.

El gen UBE3A, d'expressió materna teixit-específica, és associat a la SA, ja que des de l'any 1997 es coneix que mutacions puntuals en aquest gen causen SA (Matsuura i col·l., 1997; Kishino i col·l., 1997; Malzac i col·l., 1998). Ha estat descrita una deleció familiar de 570kb afectant al gen UBE3A que provoca el desenvolupament de SA i no de SPW (Bürger i col·l., 2002).

- **ATP10A**: és un altre gen amb un patró d'expressió similar a UBE3A. Aquest gen (prèviament anomenat ATP10C), és situat a 200 kb del gen UBE3A i codifica una translocasa d'aminofosfolípids. Tot i que es va considerar un possible candidat a causar SA tenint en compte el seu patró d'expressió, no s'han trobat evidències d'aquesta possible relació (Meguro i col·l., 2001; Herzing i col·l., 2001).

En quant als gens d'expressió paterna, han estat identificats quatre gens codificants per una proteïna: MKRN3, MAGEL2, NDN i SNURF-SNRPN:

- **MKRN3**: és un gen sense introns que codifica un factor de transcripció amb dits de zinc que podria tenir funció de ribonucleoproteïna (Jong i col·l., 1999).

- **MAGEL2**: és un gen sense introns que codifica una proteïna de la família MAGE (*Melanoma Associated Antigen*). Estudis en ratolí han demostrat una expressió preferent del gen Magel2 a placenta així com a l'hipotàlam i altres regions del cervell en estadis tardans del desenvolupament embrionari i en adults (Boccaccio i col·l., 1999; Lee i col·l., 2000).

- **NDN (*NECDIN*)**: és un gen sense introns que com el gen MAGEL2 codifica una proteïna de la família MAGE. El gen Ndn ha estat àmpliament estudiat en ratolí i ha estat relacionat amb la SPW (Jay i col·l., 1997; MacDonald i col·l., 1997; Nakada i col·l., 1998; Gérard i col·l., 1999; Muscatelli i col·l., 2000). Aquest gen s'expressa en ratolí de forma predominant en neurones postmitòtiques, i amb els nivells d'expressió més elevats en l'hipotàlam i en altres regions del cervell. Aquest patró d'expressió s'observa durant els estadis del desenvolupament embrionari més tardans i en estadis postnatals temprans (Gérard i col·l., 1999;

Muscatelli i col·l., 2000; Kobayashi i col·l., 2002). Aquests resultats, amb els obtinguts d'experiments *in vitro* han demostrat que la sobre-expressió de NDN provoca supressió de proliferació cel·lular, tot suggerint un paper en la promoció de la diferenciació i la supervivència de neurones postmitòtiques (Kobayashi i col·l., 2002).

- **C15ORF2 (*chromosome 15 open reading frame 2*)**: és un gen sense introns localitzat entre el gen NDN i el locus SNURF-SNRPN. Amb anàlisis de *zoo-blot* s'establí que aquest gen només es troba en primats. Un fet molt interessant és que aquest gen té expressió bial·lèlica en testis, i és en l'únic teixit en el que s'expressa (Färber i col·l., 2000).

- El locus **SNURF (*SNRPN Upstream Reading Frame*)-SNRPN (*Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*)** és complex i té diferents funcions: inclou el CI de la regió 15q11-q13; és un locus policistrònic (atípic en eucariotes) ja que codifica dos polipèptids i un seguit de snoRNAs. Originàriament, 8 exons havien estat descrits constituint el gen SNRPN, fins que Glenn i col·l., (1996) varen caracteritzar els que van anomenar exons -1 i 0, concloent una estructura final de 10 exons. El mateix any Dittrich i col·l., van descriure la presència d'exons alternatius del gen SNURF-SNRPN en posició 5', a més d'aquests -1 i 0, reafirmant-se que el marc obert de lectura d'aquest gen està constituït per 10 exons, que els autors van numerar de l'1 al 10:

- Els exons 1-3 codifiquen per un petit polipèptid de 71 aminoàcids de funció desconeguda, de localització nuclear i ric en residus d'arginina.

- Els exons 4-10 codifiquen una proteïna de l'*spliceosoma* implicada en l'eliminació d'introns del RNA missatger en el cervell (Gray i col·l., 1999).

Els transcrits alternatius van ser caracteritzats en detall i es confirmà que formen part del CI junt amb la regió promotora i l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN (Färber i col·l., 1999).

Tanmateix, han estat identificats múltiples exons en posició 3' (Buiting i col·l., 1997; Runte i col·l., 2001; Runte i col·l., 2004) que converteixen aquest locus en una unitat de transcripció de més de 460 kb que inclou, a

més de 148 exons, i al locus IPW, que prèviament havia estat considerat un gen independent (Wevrick i col·l., 1994). Diferents transcrits alternatius del locus SNURF-SNRPN són predominants en el cervell i se sobreposen a UBE3A amb una orientació *antisense*. A diferència del gens d'expressió paterna, l'expressió materno-específica d'UBE3A en el cervell no és regulada mitjançant metilació de DNA. Diversos estudis suggereixen que el silenciament de la còpia paterna d'aquest gen al cervell és conseqüència de l'expressió d'aquest llarg transcrit (Rougeulle i col·l., 1998; Runte i col·l., 2001; Chamberlain i Brannan, 2001; Yamasaki i col·l., 2003; Landers i col·l., 2004; Runte i col·l., 2004).

Aquest transcrit també inclou múltiples còpies de snoRNAs codificades en regions intròniques d'aquesta complexa unitat de transcripció. Aquests snoRNAs són processats a partir del transcrit primari i, per tant, segueixen el mateix patró d'expressió que aquest. Aquests gens es presenten com a còpies úniques (HBII-13, HBII-436, HBII438A i HBII-438B) o bé com a *clusters* de gens (HBII-85 amb 27 còpies i HBII-52 amb 47 còpies) (Cavaillé i col·l., 2000; Runte i col·l., 2001). A diferència d'altres snoRNAs, aquests no estan implicats en la modificació d'RNAs ribosòmics ja que no presenten regions complementàries a ells, pel que es creu que deuen participar en modificacions de missatgers. Consistent amb aquesta hipòtesi és el fet que els snoRNAs HBII-52 contenen una caixa de 18 pb complementària a una regió del mRNA del receptor de serotonina 5-HT_{2C}, suggerint una possible edició post-transcripcional o *splicing* alternatiu d'aquest missatger per part d'aquest snoRNA (Cavaillé i col·l., 2000). Anomalies en el receptor de serotonina han estat implicades en el desenvolupament d'obesitat en ratolins mutants per aquest gen (Heisler i col·l., 1998) pel que s'havia relacionat la implicació de HBII-52 amb el fenotip SPW. Estudis recents descarten la implicació de HBII-52 amb el fenotip SPW, ja que han estat descrites deleccions que afecten aquests gens en el cromosoma patern d'individus fenotípicament normals (Runte i col·l., 2005). Els autors però no exclouen la possibilitat que la pèrdua de HBII-52 tingui un efecte fenotípic quan s'acompanya per la pèrdua d'altres gens de la regió 15q11-q13.

En una posició més telomèrica es troben altres gens d'expressió bial·lèlica que també poden estar implicats en el fenotip d'alguns individus SPW o SA. El gen **OCA2** (gen de l'albinisme oculocutani tipus II) i subunitats de receptors d'àcid gamma-aminobutíric (GABA) (**GABRB3**, **GABRA5** i **GABRG3**).

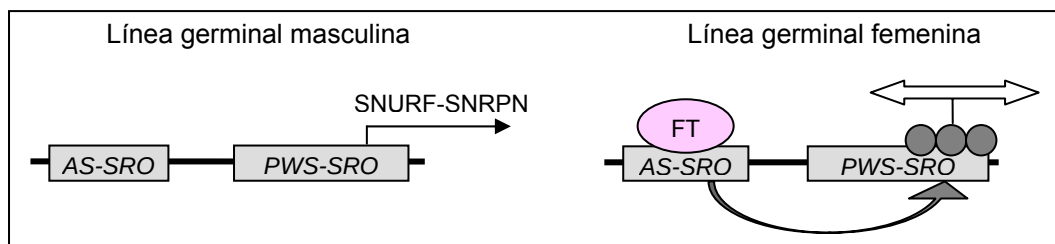
1.2.1. El centre d'impressió de la regió 15q11-q13

La regulació de la impressió de la regió cromosòmica 15q11-q13 depèn del CI d'aquesta regió. Aquest CI inclou la regió promotora i l'exó 1 de la unitat de transcripció SNURF-SNRPN. La relació entre la presència de delecions en aquesta regió i el desenvolupament de la SPW o SA, ha definit l'estructura molecular bipartida del CI (Figura 1) (Sutcliffe i col·l., 1994; Buiting i col·l., 1995; Saitoh i col·l., 1996; Dittrich i col·l., 1996; Saitoh i col·l., 1997; Bürger i col·l., 1997; Horsthemke i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Nichols i col·l., 1998; Ohta i col·l., 1999a; Ohta i col·l., 1999b; Buiting i col·l., 2000; Buiting i col·l., 2003). Les famílies SA que presenten delecions han permès definir el que s'ha anomenat *AS-smallest region of deletion overlap* (AS-SRO). La regió AS-SRO té 880 pb, es troba a 35 kb de l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN, i inclou dos dels exons alternatius a 5' d'aquest gen (Buiting i col·l., 1999). Aquestes delecions es troben en el CI del cromosoma 15 matern dels individus afectes i en el CI del cromosoma 15 patern en les mares fenotípicament normals. Les delecions presents en famílies SPW, han definit el que s'ha anomenat *PWS-smallest region of deletion overlap* (PWS-SRO). La regió promotora i l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN estan incloses en la PWS-SRO, que ha estat acotada a 4,3 kb (Sutcliffe i col·l., 1994; Buiting i col·l., 1995; Saitoh i col·l., 1996; Dittrich i col·l., 1996; Ohta i col·l., 1999b). En aquest cas la delecio és present en el CI del cromosoma 15 patern de l'individu afecte i en el CI del cromosoma matern del pare fenotípicament normal.

Aquestes dades han suggerit la hipòtesis sobre l'establiment de la impressió en la regió 15q11-q13. La regió AS-SRO del CI està implicada en el canvi de la impressió paterna a materna a la línia germinal femenina, i la regió PWS-SRO és necessària pel canvi de la impressió materna a

paterna a la línia germinal masculina (Dittrich i col·l., 1996; Horsthemke i col·l., 1997; Nicholls i col·l., 1998; Buiting i col·l., 1998; El-Maarri i col·l., 2001). Existeixen diferents models tots ells basats en el model descrit per Horsthemke i col·l., (1997) que s'esquematitza a la figura 2.

Figura 2. Model d'establiment de la impressió. FT: factor *trans*. Cercles: metilació.

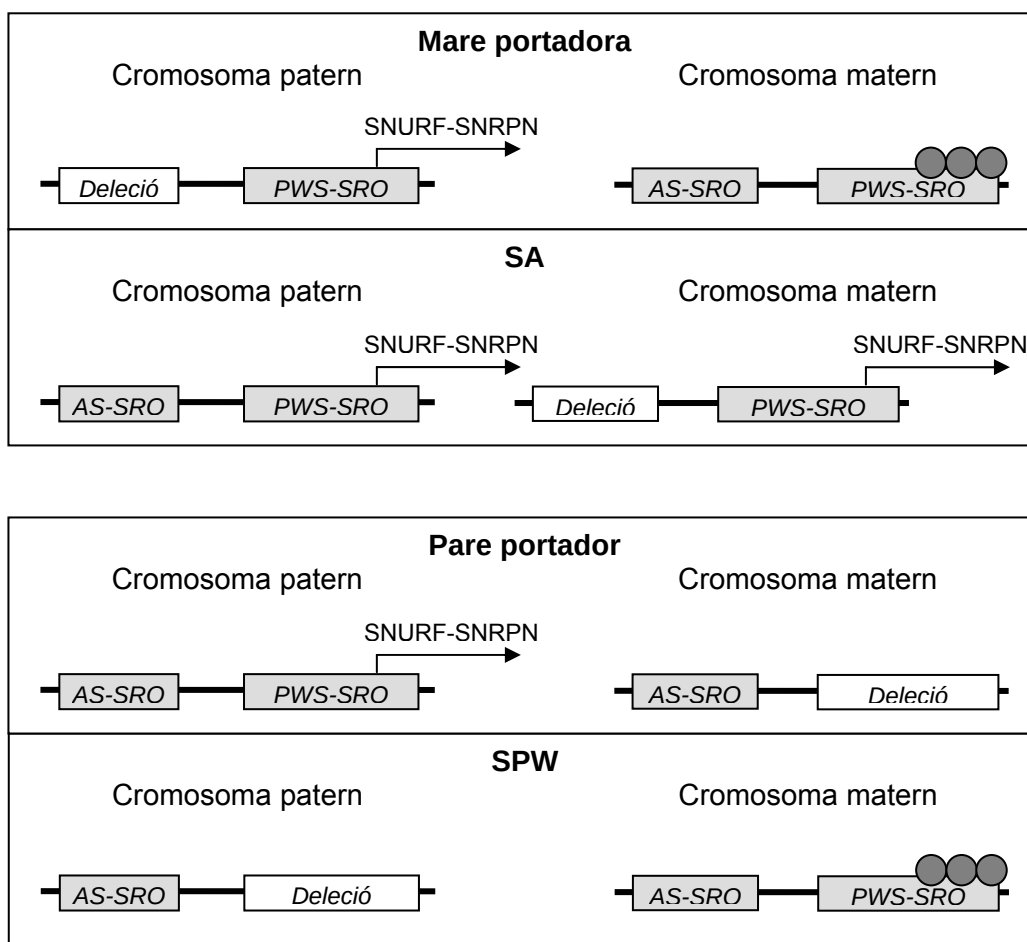


Aquest model explica la implicació d'ambdues regions en l'establiment de la impressió genètica. La transcripció dels exons 5' alternatius inclosos en AS-SRO actuaria en *cis* sobre PWS-SRO, possiblement induint canvis en la cromatina per la transcripció *per se* o per la interacció dels transcrits amb el DNA. Es creu que a la línia germinal femenina ha d'existir un factor *trans* (FT) que bloquejaria l'activitat transcripcional de AS-SRO iniciant i/o completant el canvi a impressió paterna a materna, que implicaria heterocromatinització de la regió i metilació dels dinucleòtids CpG de la regió promotora de la unitat de transcripció SNURF-SNRPN. Aquests canvis necessiten de la proximitat i/o correcta orientació de les regions AS-SRO i PWS-SRO (Buiting i col·l., 2001). A la línia germinal masculina, en absència d'aquest FT i/o implicant altres factors, s'establiria la impressió paterna per defecte.

Delecions en la regió AS-SRO comportarien que aquesta no pugui ser reconeguda pel FT, establint-se per defecte la impressió paterna. En canvi, delecions en la regió PWS-SRO, implicarien el manteniment de la impressió materna per l'absència del lloc d'inici del canvi de impressió. Les delecions en la regió PWS-SRO, no només suposen incapacitat per a canviar la impressió materna a paterna, sinó que a més impliquen deleció de la regió promotora i de l'exó 1 de la unitat de transcripció SNURF-

SNRPN, i per tant, manca d'expressió d'aquest llarg transcrit. La manca d'expressió d'aquest llarg transcrit està directament relacionat amb el desenvolupament de SPW i no de SA. Aquest fet explica que no es trobin delecions que incloguin la regió *PWS-SRO* en famílies SA (Figura 3).

Figura 3. Esquema de les delecions en el CI en individus afectes de SPW i SA i en individus portadors.



Els mecanismes implicats en esborrar la impressió a línia germinal encara romanen desconeguts. La majoria de casos SA i SPW causats per defectes en la impressió (DI) de la regió crítica no presenten delecions en el CI, tot i que presenten patrons de metilació anòmals en la regió promotora del transcrit *SNURF-SNRPN*. S'han considerat casos esporàdics deguts a epimutacions (Bürger i col·l., 1997; Schulze i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Buiting i col·l., 2003).

La descripció d'un polimorfisme de restricció pels enzims HpaII i MspI a l'intró 1 del gen SNRPN, ha permès desenvolupar una estratègia per a investigar l'origen del cromosoma portador del DI, sense la necessitat d'estudiar els avis (Saitoh i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998). Els resultats d'aquestes anàlisis en llargues sèries d'individus SPW causats per epimutacions, mostren que l'origen del cromosoma portador del DI és sempre el matern del pare, mentre que en els individus SA esporàdics, el cromosoma portador del DI pot ser tant el patern com el matern de la mare (Horsthemke i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Buiting i col·l., 2003). Aquests resultats han suggerit que els casos SPW han estat conseqüència de la incapacitat d'esborrar la impressió materna a la línia germinal masculina. Per contra, tenint en compte els resultats obtinguts en els casos SA, a la línia germinal femenina no s'ha pogut establir la impressió materna en el cromosoma patern (possiblement per manca del FT), o bé s'ha esborrat en el matern.

Actualment es coneix que moltes de les epimutacions en el cromosoma matern es presenten en mosaic (Gillissen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupond i col·l., 1999; Molfetta i col·l., 2002; Horsthemke i col·l., 2003a; Buiting i col·l., 2003), és a dir, que l'error en la impressió ha estat postzigòtic. Aquesta dada ha suggerit la hipòtesis sobre el manteniment de la metilació a la còpia materna de la unitat de transcripció SNURF-SNRPN. Buiting i col·l., (2003) proposen una possible inestabilitat de la metilació de la Lys9 de la histona H3 (Xin i col·l., 2001) o d'altres modificacions en la cromatina, que puguin comportar errors a l'hora de traduir aquest marcatge matern primari a metilació, o bé errors en la metilació durant la replicació en les primeres divisions embrionàries. Pel que fa al manteniment de la impressió paterna, Bielinska i col·l., (2000), varen demostrar que delecions de l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN, comportaven un canvi del patró de metilació de diferents loci de patern a matern, en embrions de ratolí i humans. Aquest fet va suggerir als autors que aquesta regió no només és important en l'establiment de la impressió paterna, sinó també en el seu manteniment durant el desenvolupament embrionari.

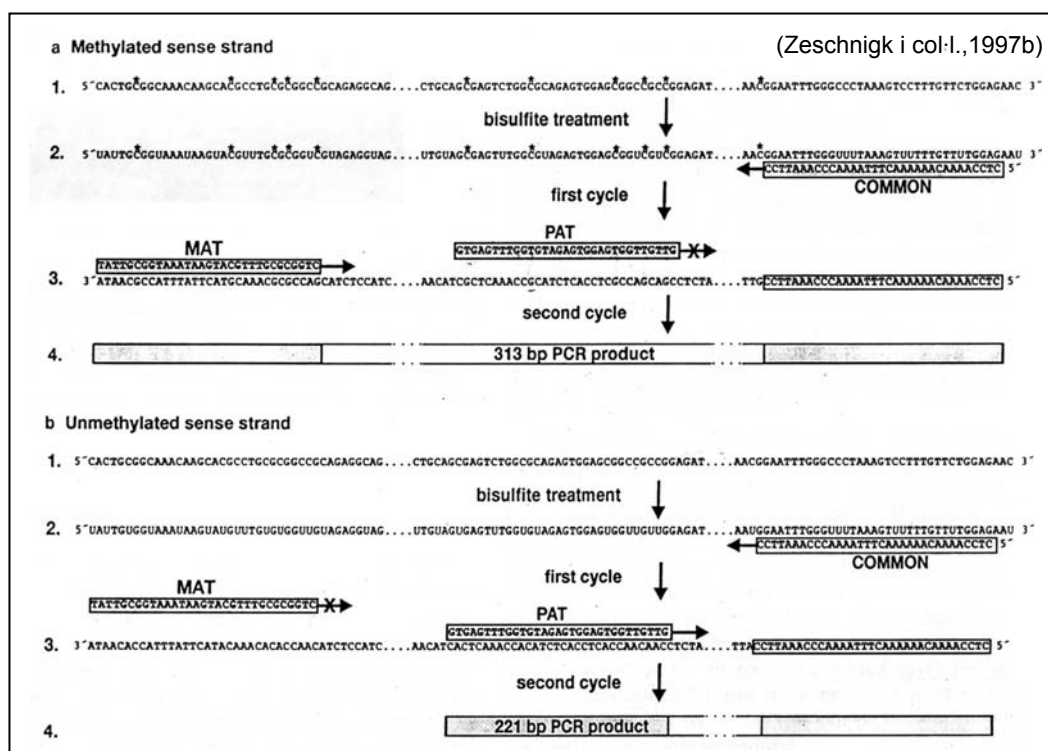
1.2.1.1. Anàlisi de metilació del centre d'impressió de la regió 15q11-q13

El CI de la regió 15q11-q13 presenta dues illes CpG diferencialment metilades segons l'origen parental. Una d'elles és la regió promotora i l'exó 1 de la unitat de transcripció SNURF-SNRPN que pertany a la regió *PWS-SRO*. La segona, més centromèrica, correspon al locus D15S63, anomenat PW71/PWCFOA, dista 100 kb de la primera regió i correspon al lloc d'inici de transcripció dels transcrits 5' alternatius d'aquesta. A l'any 1996, Kubota i col·l., van analitzar l'estat de metilació d'ambdues regions en mostres de limfòcits de controls normals i de pacients SPW i SA, així com en mostres d'amniòcits, còrion i teixits fetals mitjançant *Southern blot*. Els resultats de l'anàlisi de metilació de la regió promotora del gen SNURF-SNRPN van ser consistents. En canvi, el locus PW71 presenta hipometilació en les mostres de teixit fetal. L'anàlisi de metilació de la regió PW71 no és doncs aconsellable pel diagnòstic prenatal ja que podria generar falsos positius tant per hipometilació com per delecions -considerades com un polimorfisme neutre i que van ser descrites posteriorment (Buiting i col·l., 2000; Silverstein i col·l., 2001)-.

En el mateix context de comparar l'estat de metilació dels dos loci, l'any 1997, Zeschnigk i col·l., publicaren l'estudi de la metilació en mostres control i mostres de a pacients SPW i SA aplicant la tècnica de seqüenciació de DNA tractat amb bisulfit sòdic. El bisulfit sòdic converteix les bases citosina (C) a uracils (U) per una reacció de sulfonació, quan aquestes bases no es troben metilades. En realitzar una reacció d'amplificació i seqüenciació d'aquestes regions, posterior al tractament amb bisulfit sòdic, la còpia no metilada queda reflectida per l'obtenció de timines (T) a la seqüència, i la metilada per l'obtenció de C (Herman i col·l., 1996). Els autors van concloure que la freqüència de metilació a la regió PWCFOA és considerablement inferior i menys uniforme que la trobada en la regió promotora de SNURF-SNRPN. El mateix any, en un segon treball Zeschnigk i col·l., van descriure un mètode de diagnòstic de les SPW i SA, basat en una amplificació, mitjançant PCR, del DNA genòmic tractat amb bisulfit sòdic (Figura 4).

Varen escollir la regió de l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN per l'elevada densitat de bases 5-metil-C (5-mC) en el cromosoma matern i C en el patern utilitzant encebadors específics per a cadascuna de les còpies fet que permetrà l'amplificació d'ambdues en la mateixa reacció de PCR. Aquesta tècnica, anomenada PCR específica de metilació (M-PCR o MS-PCR), és vàlida per l'anàlisi de l'estat de metilació, i per tant, pel diagnòstic de totes les etiologies causants de la SPW i del 80% de casos SA. És important l'amplificació d'ambdós al·lels alhora per a la detecció de casos SA deguts a DI en mosaic (Horsthemke i col·l., 2003a). L'elecció de la regió promotora i de l'exó 1 del gen SNURF-SNRPN és útil en diagnòstic prenatal ja que presenta homogeneïtat del patró diferencial de metilació segons l'origen parental en diferents teixits (Zeschnigk i col·l. 1997a; Zeschnigk i col·l. 1997b; Glenn i col·l., 2000).

Figura 4. Esquema de la tècnica M-PCR. Seqüència 5'-3' de l'exó 1 del gen SNRPN: a, cadena metilada (al·lel matern) i b, cadena no metilada (al·lel patern). Les 5-mC estan marcades amb un asterisc. Els encebadors estan enquadrats i s'indiquen: MAT, específic per l'al·lel matern; PAT, específic per l'al·lel patern, i COMMON, comú per ambdós al·lels. La PCR es realitza emprant els tres encebadors alhora de manera que aquell que no és complementari a un o altre al·lel s'indica amb el signe X.



1.2.2. Funció, estructura i mutacions del gen UBE3A

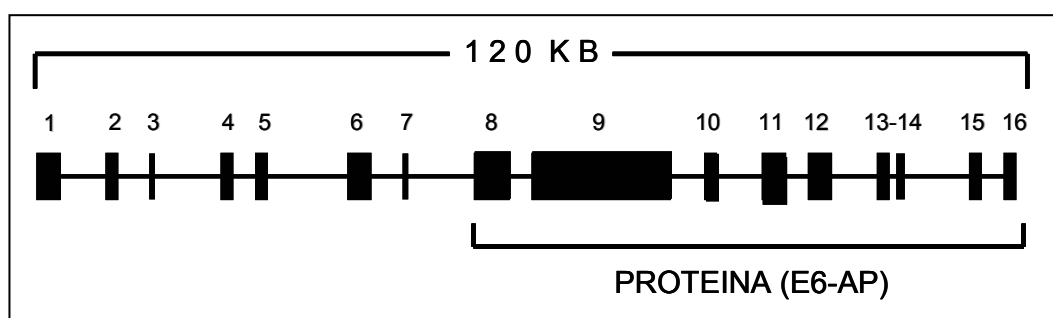
El gen UBE3A, localitzat a la regió 15q11-q13, codifica una proteïna cel·lular, anomenada E6-AP (*Human Papillomavirus E6-Associated Protein*), constituïda per 865 aminoàcids i amb un pes molecular de 100 kD. Inicialment va ser identificada per la seva mediació en l'associació *in vitro* de la proteïna E6 del papilomavirus humà de tipus 16 i 18, amb p53 (Huibregtse i col·l., 1991; Huibregtse i col·l., 1993). El complex E6-AP/E6 s'uneix a p53, comportant la degradació d'aquesta mitjançant la via de degradació proteica dependent d'ubiquitina (Scheffner i col·l., 1990; Scheffner i col·l., 1993). La proteïna E6-AP és una E3 *ubiquitin-protein* lligasa, membre de la família proteica que presenta 350 aminoàcids a l'extrem carboxi-terminal, formant l'anomenat domini *hect* (*Homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) (Huibregtse i col·l., 1995). En la via de degradació proteica dependent d'ubiquitina intervenen tres enzims: els enzims E1 activadors d'ubiquitina, els E2 conjugadors d'ubiquitina i els enzims E3 *ubiquitin-protein* lligases. Aquesta via és emprada per la cèl·lula per a la degradació proteica de substrats específics, pel que certs components d'aquesta cascada han d'actuar conferint aquesta especificitat. Els enzims E3 amb domini *hect* són importants pel reconeixement del substrat i transferència d'ubiquitina del complex E2-ubiquitina al substrat (Huibregtse i col·l., 1995; Scheffner i col·l., 1995; Huang i col·l., 1999). Es va descriure una segona funció independent d'aquesta primera, com co-activador de receptors hormonals nuclears i es va realitzar un estudi de correlació d'ambdues funcionalitats en individus amb el fenotip SA, expressant formes mutants del gen UBE3A d'individus SA. Els resultats d'aquesta anàlisi van permetre correlacionar el fenotip SA amb una activitat *ubiquitin-protein* lligasa defectuosa, mentre que l'activitat com a coactivador es va considerar intacta en aquests pacients (Nawaz i col·l., 1999)

En una primera descripció de l'estructura del gen UBE3A, Yamamoto i col·l., (1997) van identificar 10 exons codificant el marc obert de lectura (*ORF: Open Reading Frame*) del gen, i 4 exons alternatius inclosos en la regió 5' no traduïda (*5'-UTR: 5'-Untranslate Region*). També van descriure

cinc tipus de missatgers diferents, que generarien tres isoformes de la proteïna, segons el codó d'inici emprat. La isoforma I descrita per Yamamoto i col·l., correspon a l'ORF de E6-AP prèviament descrit per Huibregtse i col·l., (1993). Les isoformes II i III contenen respectivament 20 i 23 aminoàcids més a l'extrem amino-terminal. Les diferències en l'extrem amino-terminal de les diverses isoformes no afecten la seva funció d'estimulació de la degradació de p53 depenent d'E6 *in vitro*, i tot i que no es coneix la funcionalitat de les diferents isoformes, aquestes podrien conferir variabilitat en el reconeixement del substrat.

L'estructura coneguda d'aquest gen, va ser descrita per Kishino i Wagstaff (1998), així com la de dos pseudogens, UBE3AP1 i UBE3AP2, localitzats als cromosomes 2 i 21, respectivament. Els autors van descriure dos exons més a l'extrem 5'-UTR del gen UBE3A, i una regió 3'-UTR de més de 2 kb. Conclouen que el gen UBE3A de 120 kb, està constituït al menys per 16 exons, sent els exons 1-6 part de la regió 5'-UTR, i la seva transcripció s'orienta de telòmer a centròmer. En el ORF d'E6-AP (Isoforma I) l'exó 7 aporta únicament els seus dos últims nucleòtids (AT) al codó d'inici. El codó d'inici de traducció (AUG) es completa després de realitzar l'*splicing* entre els exons 7 i 8 (Figura 5).

Figura 5. Estructura del gen UBE3A.



Des de l'any 1997 han estat descrites mutacions en els diferents exons que pertanyen a l'ORF d'aquest gen, essent la majoria d'elles mutacions que comporten terminacions prematures de la proteïna E6-AP, i que, per tant, afecten el domini *hect* imprescindible per la funcionalitat *ubiquitin-*

protein lligasa de la proteïna (Kishino i col 1997; Matsuura i col·l., 1997; Malzac i col·l., 1998; Fung i col·l., 1998; Tsai i col·l., 1998; Baumer i col·l., 1999; Fang i col·l., 1999; Moncla i col·l., 1999b; Russo i col·l., 2000; Bercovich i Beaudet 2003; Molfetta i col·l., 2004; Rapakko i col·l., 2004; Salvat i col·l., 2004; Cooper i col·l., 2004).

La majoria de les mutacions descrites en el gen UBE3A derivades de petites delecions o insercions/duplicacions canvien la pauta de lectura (*frameshift*), i altres corresponen a mutacions sense sentit (*nonsense*). Algunes d'aquestes petites delecions i insercions semblen derivar d'errors d'aparellament en la replicació. Per altra banda algunes mutacions sense sentit corresponen a transicions del nucleòtid C a T, possiblement derivades de la deaminació de 5-mC (Nicholls i col·l., 2001).

En la majoria dels estudis del gen UBE3A, les tècniques emprades són la tècnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorfism*) i seqüenciació automàtica de DNA. Al marge de la tècnica emprada un fet comú és que és imprescindible l'ús d'encebadors intrònics per l'anàlisi de les regions d'*splicing*, així com per evitar l'amplificació i anàlisi no desitjada dels pseudogens, UBE3AP1 i UBE3AP2 atesa la seva elevada homologia amb el gen UBE3A (Kishino i Wagstaff 1998).

1.3. Descripció de les Síndromes de Prader-Willi i d'Angelman

La SPW afecta aproximadament a 1 de cada 10.000-15.000 nascuts vius d'ambdós sexes i de totes les races (Cassidy i Schwartz, 1998; Cassidy i col·l., 2000) i és causada per diferents anomalies genètiques que tenen com a conseqüència la pèrdua o inactivació de gens d'expressió paterna de la regió 15q11-q13. La incidència de la SA s'estima que és aproximadament la mateixa que la de la SPW (1 de cada 10.000-20.000 nascuts vius) (Cassidy i Schwartz, 1998; Cassidy i col·l., 2000). No obstant, com que els estudis epidemiològics i el coneixement clínic de la malaltia són relativament recents, hi ha certa controvèrsia en l'estimació

de la seva incidència (Williams i col·l., 1995a; Buckley i col·l., 1998; Clayton-Smith i Laan, 2003; Williams 2005).

1.3.1. Manifestacions clíniques

Síndrome de Prader-Willi: La SPW va ser descrita a l'any 1956 pels pediatres Prader, Labhart i Willi (Prader i col·l., 1956). Els criteris diagnòstics de la SPW van ser descrits per Holm i col·l., (1993) i han estat revisats per diversos autors (Cassidy i Schwartz, 1998; Cassidy i col·l., 2000; Gunay-Aygun i col·l., 2001). Tot i ser ben conegut actualment, el fenotip de la SPW és complex i la majoria de les manifestacions clíniques són conseqüència de disfuncions l'hipotalàmiques. La hipotonia neonatal és considerada una de les majors manifestacions clíniques i és la causa del moviment fetal reduït i de la debilitat en la succió amb la conseqüent necessitat de tècniques especials d'alimentació. En el període infantil, els reflexes poden presentar-se disminuïts o ser del tot absents i també és característic un retard motor que comporta un retard en l'inici de sedestació (12 mesos) i marxa (24 mesos). La hipotonia pot ser severa, i tot i que millora amb l'edat, s'arriba a l'edat adulta amb una disminució de la massa i del to muscular.

Els pacients desenvolupen hiperfàgia entre els 2 i els 6 anys, i en conseqüència, obesitat si no es controla. L'obesitat no només prové de la hiperfàgia, sinó que també té un origen hormonal derivat de l'hipotàlem i es manifesta per la pèrdua de la sensació de sacietat. L'hipogonadisme s'inicia en la gestació i s'evidencia en nounats amb hipoplasia genital que, en el sexe masculí, es manifesta amb criptorquídia, hipoplàsia de l'escrot i en ocasions amb un penis petit, mentre que en el femení amb hipoplàsia de llavis menors i clítoris. També es manifesta un desenvolupament puberal incomplet, amb absència del canvi de veu i disminució del pèl corporal i facial en els homes, i oligomenorrea o amenorrea i menàrquia avançada, en les dones. Els pacients no solen tenir activitat sexual i es consideren estèrils. L'esterilitat associada a l'hipogonadisme és considerada una característica comú, encara que han estat descrits dos casos de dones SPW que es van reproduir, i per tant cal contemplar la

possibilitat de què hi hagin més casos capaços de reproduir-se (Akefeldt i col·l., 1999; Schulze i col·l., 2000).

La talla baixa és una característica comú en la SPW associada a una insuficiència de producció d'hormona de creixement per part de l'hipotàlem. També es pot manifestar un retard en l'edat òssia i osteoporosis precoç. Actualment es tracten els pacients amb hormona de creixement obtenint una millora en el creixement, la composició corporal, la massa òssia, la força muscular, la funció respiratòria i l'activitat motora.

Els trets físics característics de la SPW són: dolicocefàlia, diàmetre bifrontal estret, ulls en forma d'ametlla, boca petita, llavi superior prim, comissures bucals avall, mans i peus petits, saliva viscosa, estrabisme, i en determinats casos hipopigmentació.

La majoria de casos SPW presenten un retard mental moderat, problemes d'aprenentatge i un fenotip conductual característic amb personalitat irritable, baixa tolerància a la frustració, pensament rígid, agressivitat, mossegar-se les ungles i els llavis, arrencar-se els cabells i esgarrapar-se la pell. Recentment han estat descrits trastorns psicòtics que es manifesten en l'adolescència i l'edat adulta (Boer i col·l., 2002; Clarke i col·l., 2002; Vogels i col·l., 2004).

La qualitat de vida és bona en general, encara que depèn dels problemes mèdics associats, dels trastorns conductuals i psicòtics que es puguin desenvolupar, i l'esperança de vida és considerada normal, tot i que depèn dels problemes associats a l'obesitat.

Síndrome d'Angelman: La SA va ser descrita a l'any 1965 pel pediatra Harry Angelman en tres nens amb característiques clíniques i conductuals comuns: retard sever en l'aprenentatge, atàxia, tremolor, absència de parla, aparença feliç, hipopigmentació, epilèpsia amb un patró característic en l'electroencefalograma (EEG), i aspecte físic similar amb prognàtia, ulls enfonsats, boca gran amb la llengua prominent, i microcefàlia amb l'occipuci pla (Angelman, 1965). Trenta anys després

d'aquesta primera descripció de la malaltia es va establir un consens, tant pel diagnòstic genètic de la SA causada per les etiologies conegudes fins el moment, com pel diagnòstic clínic (Williams i col·l., 1995a; Williams i col·l., 1995b). Els criteris de diagnòstic clínic descrits per Williams i col·l., no han variat en els últims anys, encara que gràcies al major coneixement actual, tant clínic com genètic de la malaltia, és possible relacionar fenotips parcialment divergents amb el genotip segons l'edat dels individus (Clayton-Smith i Laan, 2003).

Es consideren trets clínics consistents aquells que es presenten en el 100% dels casos, i s'agrupen en retard mental i motor sever, incapacitat en la parla, capacitats receptives i comunicació gestual superiors a la verbal, trastorn en el moviment o equilibri, sovint amb marxa atàxica i tremolor de les extremitats, i un fenotip conductual característic amb riure no provocat, aparença feliç, personalitat fàcilment excitable, conducta hiperactiva, dèficit d'atenció i aleteig de les mans. Es consideren freqüents les característiques que s'estimen presents en més del 80% dels afectats: microcefàlia, aparició de crisis d'epilèpsia usualment abans dels 3 anys, i EEG característic. També es troben inclosos en els protocols de diagnòstic clínic de la SA una colla de característiques associades i que es presenten entre el 20% i el 80% dels casos: occipuci pla, solc occipital, llengua prominent, problemes de succió i deglució associats a moviments anòmals de la llengua, problemes d'alimentació durant la infància, prognatisme, boca gran i dents separades, baveig i moviments mastegadors excessius, estrabisme, hipopigmentació, hipertonia de les extremitats, contractura en flexions i hipereflèxia, hipersensibilitat a la calor, trastorn del son i fascinació per l'aigua.

En una extensa revisió de les manifestacions clíniques de la SA, Clayton-Smith i Laan (2003) consideren el fenotip conductual característic com un dels marcadors clínics més importants, així com el retard mental i motor sever. Tanmateix l'EEG es considera un bon marcador. Presenten un retard en l'inici de sedestació (aproximadament als 12 mesos) i en l'inici de la marxa, essent l'edat mitjana als 4 anys. Molts individus presenten

moviments espàstics i tremolor que solen empitjorar en situacions d'estrès i que són més evidents en individus adults. També consideren que molts pacients són capaços d'entendre ordres simples en el context de la seva rutina, però que són minoritaris els casos capaços de comunicar-se per signes i gestos, encara que pot millorar en l'edat adulta en associació a una millora de la capacitat de concentració. Tot i tenint en compte els pocs casos capaços de parlar algunes paraules, en cap cas s'assoleix la capacitat d'entendre ordres complexes o pensaments abstractes (Clayton-Smith i Laan 2003; Williams 2005).

Durant la infantesa, les primeres aparicions de les crisis d'epilèpsia presents en el 80% dels individus, solen associar-se a estats febrils, podent-se presentar diferents tipus de crisis i són difícils de controlar amb fàrmacs.

La pubertat dels individus SA es desenvolupa de forma normal. Una característica important a tenir en compte és la progressió clínica en l'edat adulta, així com el desenvolupament d'escoliosi. L'escoliosi es presenta en pocs casos durant la infantesa, però és un dels problemes més importants en l'edat adulta, requerint fisioteràpia, tractaments ortopèdics i fins i tot cirurgia. Les característiques facials esdevenen més prominents, disminueix la mobilitat deguda a la hipertonicitat de les extremitats, a l'aparició d'escoliosi i per desgana. En conseqüència, alguns casos poden desenvolupar obesitat. L'esperança de vida de la majoria d'individus SA, no es veu molt reduïda respecte a la normal.

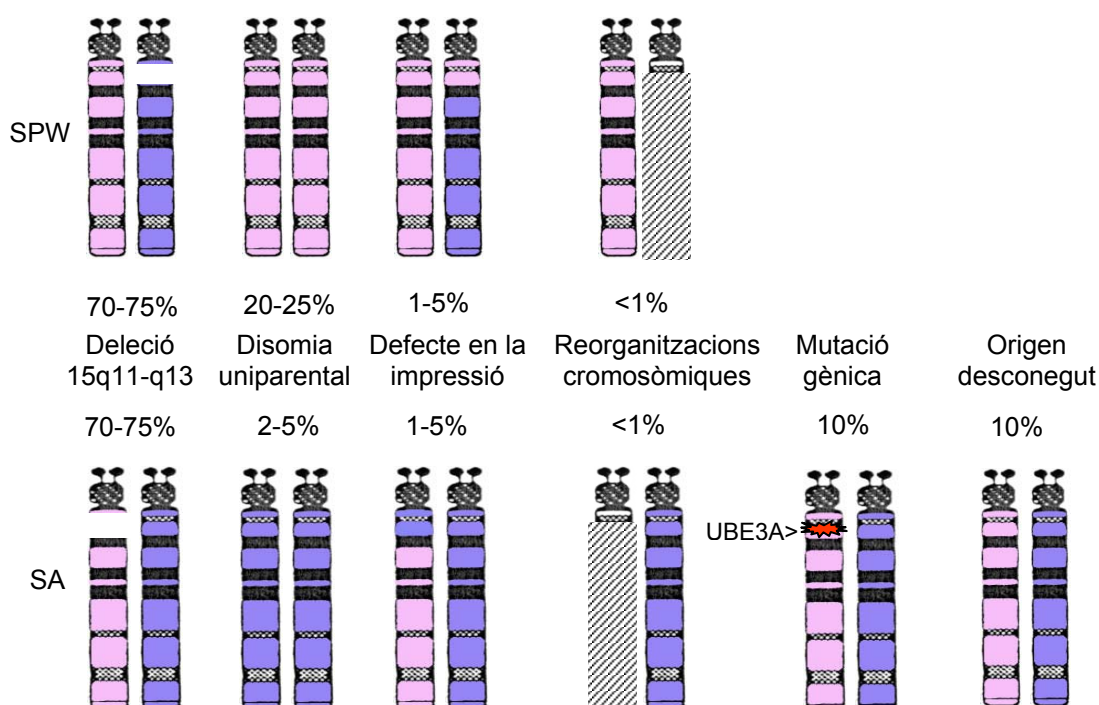
1.3.2. Causes genètiques i consell genètic

La SA es considera una síndrome monogènica ja que pot ser conseqüència de mutacions puntuals en un únic gen. Pel que fa a la SPW no s'han descrit casos deguts a mutacions puntuals en un gen, pel que es considera una síndrome multigènica, conseqüència de la pèrdua de funcionalitat de diversos gens d'expressió paterna.

Ambdues poden ser conseqüència de delecions de la regió 15q11-q13, de disomies uniparentals (DUP), de DI, i amb molt baixa freqüència de

reorganitzacions cromosòmiques que afectin la regió 15q11-q13. La SA també pot estar causada per mutacions puntuals en el gen UBE3A i en un 10% dels casos la clínica és consistent de la síndrome però es desconeix la causa genètica (Figura 6).

Figura 6. Causes genètiques de la SPW i la SA i incidència de cadascuna de les etiologies. S'indiquen el parell de cromosomes 15, diferenciant-se el d'origen matern (rosat) i patern (blau). Ratllat es representa el cromosoma 15 portador d'alguna reorganització cromosòmica que afecti la regió 15q11-q13.



La incidència de deleccions de la regió 15q11-q13 és en el rang del 70-75% en ambdues síndromes. La longitud del fragment deleccionat és d'aproximadament 4 Mb, tot i que depèn dels punts de trencament implicats. La regió 15q11-q13 es troba flanquejada per seqüències duplicades (anomenades duplicons), que deriven de duplicacions del gen HERC2, pel que es creu que les deleccions s'originen per recombinació homòloga entre elles (Amos-Landgraf i col·l., 1999; Christian i col·l., 1999; Ji i col·l., 2000a; Ji i col·l., 2000b).

Es coneixen tres punts de trencament (BP: *Break Point*), dos de proximals BP1 i BP2, i un de distal BP3, i les delecions més freqüents (60%) són les que impliquen els punts BP2 i BP3. Les delecions de la regió 15q11-q13 s'originen *de novo* pel que el risc de recurrència es considera baix ($\leq 1\%$) i similar al risc en la població general. Cal tenir en compte que en mares que presenten una inversió en heterozigosi de la regió inclosa entre aquests punts de trencament BP2/BP3 podrien tenir una predisposició superior a tenir descendència afecta per delecio. Es considera que la inversió és un polimorfisme, ja que es troba en un 9% de la població, i podria representar un estadi intermedi que predisposi a originar la delecio en la descendència (Gimelli i col·l., 2003).

La segona causa més freqüent en la SPW (20-25% dels casos) és la DUP materna (DUPmat). En la SA la freqüència de DUP, en aquest cas paterna (DUPpat), és baixa (2-5% dels casos) i són majoritàriament isodisomies. En els treballs de Robinson i col·l., (1998 i 2000), es descriu que a la SPW la DUPmat s'origina per una no-disjunció meiótica materna, seguida d'una pèrdua postzigòtica del cromosoma 15 d'origen patern. Aquestes DUPmat semblen derivar d'errors de meiosi I ja que la recombinació es produeix prèvia a la segregació, fet que crea regions cromosòmiques heterodisòmiques i isodisòmiques. Atès que la no disjunció en meiosi masculina és un fenomen rar i que les DUPpat són majoritàriament isodisomies, aquestes semblen tenir el seu origen en una no-disjunció materna seguida per duplicació postzigòtica del cromosoma 15 patern. El risc de recurrència de les DUP es considera baix ($\leq 1\%$).

La tercera causa genètica comú i amb una incidència similar en les dues síndromes (1-5% dels casos), són els DI de la regió 15q11-q13. En aquest cas estan presents el cromosoma d'origen matern i el d'origen patern, així com la regió crítica en cadascun d'ells, però s'ha establert la impressió materna en el cromosoma patern, en el cas de la SPW, o la paterna en el cromosoma matern, en el cas de la SA. Els DI poden ser originats per una delecio en el CI o per un error epigenètic (Sutcliffe i col·l., 1994; Buiting i col·l., 1995; Saitoh i col·l., 1996; Dittrich i col·l., 1996; Saitoh i col·l., 1997;

Bürger i col·l., 1997; Horsthemke i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Nichols i col·l., 1998; Ohta i col·l., 1999a; Ohta i col·l., 1999b; Buiting i col·l., 2000; Buiting i col·l., 2003). La majoria de casos de delecions del CI són familiars i el risc de recurrència és del 50%. S'ha de considerar als germans del pare portador o les germanes de la mare portadora també possibles portadors de la delecio i per tant amb un risc del 50% de tenir descendència afecta. Les germanes del pare portador i els germans de la mare portadora tindran descendència no afecta però poden transmetre la malaltia a través dels seus fills o filles, respectivament. Es coneixen dos casos SA i un cas SPW en que la delecio del CI ha estat *de novo* (Buiting i col·l., 1998; 2003). En aquests casos cal tenir en compte possibles portadors en línia germinal, fet que estableix un risc de recurrència en el rang 0-50%, depenent de la seva presència i del grau de mosaïcisme (Saitoh i col·l., 1997; Gilbert i col·l., 1997). En la majoria de casos (~85%) el DI té un origen epigenètic i es considera esporàdic. En la SA aquests errors epigenètics en el cromosoma matern poden ser postzigòtics i presentar-se en mosaic (Gillesen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupond i col·l., 1999; Molfetta i col·l., 2002; Horsthemke i col·l., 2003a; Buiting i col·l., 2003). La freqüència de DI en mosaic en la SA, estimada per Buiting i col·l., (2003) en una sèrie de 85 pacients SA amb DI, és del 27%. El risc de recurrència estimat en els casos considerats errors epigenètics és <1%.

Amb una incidència molt baixa (<1%) la causa pot ser una reorganització cromosòmica que afecti a la regió 15q11-q13 alterant el patró en la impressió. El risc de recurrència en aquests casos s'estima entre el 5-50% (Cassidy i col·l., 2000), en funció de la reorganització en concret i del seu origen parental.

En la SA la segona causa més freqüent (~10% dels casos) són les mutacions en el gen UBE3A que poden ser familiars, i llavors el risc de recurrència del 50%, o poden ser *de novo*. En el consell genètic en els casos *de novo*, s'ha de considerar a la mare com a possible portadora de la mutació en la línia germinal (Malzac i col·l., 1998; Stalker i col·l.,

1998b; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan 2003). En els casos familiars les germanes de la mare portadora s'han de considerar possibles portadores amb un risc del 50% de tenir descendència afectada, mentre els germans de la mare portadora tindran descendència no afectada però poden transmetre la malaltia a través de les filles o silenciosament a través dels seus fills.

Per últim, en un 10% de casos de SA, es desconeix la causa genètica. En aquests casos no és possible establir el risc de recurrència ni oferir un consell genètic. En els darrers anys aquest percentatge de casos amb diagnòstic clínic de SA sense causa genètica establerta ha minvat com a conseqüència del major coneixement de la SA. En una revisió Williams i col·l., (2001) varen observar altres anomalies genètiques que es manifesten en fenotips similars a la SA. Dins d'aquest grup es troben: diferents anomalies cromosòmiques com delecions terminals de la regió 22q13; anomalies causades per la deficiència d'un únic gen com la Síndrome de Rett, retard mental alfa-talasèmia, deficiència de l'enzim metil tetrahidrofolat reductasa (MTHFR) o la Síndrome de Gurrieri; i malalties complexes com la Síndrome de Lennox-Gastaut, encefalopaties mitocondrials o l'autisme. S'han descrit casos en els que existia la sospita clínica inicial de SA i que en estudis posteriors es van evidenciar algunes de les anomalies mencionades (Arn i col·l., 1998; Imessaoudene i col·l., 2001; Watson i col·l., 2001; Tao i col·l., 2004), així com la situació contrària en un cas amb sospita inicial de Síndrome de Gurrieri que finalment va ser diagnosticat molecularment de SA (Battaglia i Gurrieri, 1999).

El diagnòstic prenatal en la SA es recomana en posteriors embarassos independentment de la causa genètica i de què el risc de recurrència sigui considerat molt baix (Stalker i Williams 1998). Tanmateix aquesta conclusió no és exclusiva de la SA sinó que és extrapolable a la SPW, atès que ambdues síndromes comparteixen etiologies. A més s'ha de considerar que han estat descrits casos recurrents: dues famílies amb delecio de la regió 15q11-q13 i delecions del CI que aparentment eren de

novo, però es van considerar als progenitors portadors de mosaics germinals (Saitoh i col·l., 1996; Gilbert i col·l., 1997; Kokkonen i Leisti, 2000; Fernandez-Novoa i col·l., 2001).

1.3.3. Correlacions fenotip-genotip

En diversos estudis que correlacionen el genotip amb el fenotip dels individus afectes de SPW o SA, s'han trobat certes diferències en ambdues síndromes. De forma genèrica es considera que els casos deguts a DUP i a DI presenten fenotips menys severs respecte als individus amb deleció. No es coneixen les raons que explicarien aquest fet, però podria deure's a errors incomplets de la impressió, a haploinsuficiències de gens no imprintats en els casos de deleció, o sobreexpressió d'alguns gens en els casos de DUP.

Síndrome de Prader-Willi: Les diferències en el fenotip dels individus amb SPW segons el genotip són poc evidents, i la majoria d'estudis realitzats tenen en compte únicament els dos grups majoritaris, és a dir, les delecions i les DUP.

En un estudi realitzat per Gillessen-Kaesbach i col·l., (1995), en 116 pacients amb deleció i 51 amb DUP, troben diferències significatives entre els dos grups, respecte a la presència d'hipopigmentació i el pes en néixer. La hipopigmentació es presenta amb major freqüència en els individus amb deleció, i el pes en néixer és inferior respecte al grup amb DUP. La hipopigmentació és potser la diferència més significativa associada majoritàriament a pacients amb deleció i és deguda a la pèrdua d'una de les còpies del gen OCA2/P (Cassidy i col·l., 1997; Cassidy i Schwartz, 1998; Cassidy i col·l., 2000). El gen OCA2/P es troba a la regió 15q11-q13 i codifica una proteïna integral de membrana del melanosoma transportadora de tirosina (precursor de melanina) que està implicada en l'albinisme oculocutani. També ha estat descrit un cocient intel·lectual lleugerament més baix en el grup de deleció respecte al grup de DUP, i més freqüència i severitat de certes conductes (gratar-se la pell, abandonament, agressió, hiperfàgia) en individus amb deleció (Dykens i

col·l., 1999). L'edat de diagnòstic és significativament més avançada en els pacients amb DUP (Gunay-Aygun i col, 1997), fet que es pot atribuir a un aspecte menys típic en les DUP, ja que no s'han observat diferències entre els dos grups en la hipotonia neonatal, problemes en l'alimentació durant la infància, obesitat, retard mental o hipogonadisme (Gunay-Aygun i col, 1997; Cassidy i col·l., 1997; Cassidy i Schwartz, 1998).

No s'han descrit diferències en la hiperfàgia entre els tres grups (delecíó, DUP i DI). En un estudi d'expressió de possibles gens candidats a participar en la SPW, Horsthemke i col·l., (2003b) proposen la implicació del gen de la secretogranina II (SCG2) en la hiperfàgia. Els autors troben una expressió molt reduïda d'aquest gen en cèl·lules amb DUP materna respecte a cèl·lules normals d'un mateix individu amb DUPmat en mosaic. La SCG2 és un precursor de la secretoneurina, la qual indueix l'alliberament de dopamina. Es coneix que la dopamina regula la ingesta modulant la seva recompensa a través del circuit mesolímbic del cervell (Volkow i col·l., 2003). Tot i que el gen SCG2 és un gen no regulat per impressió genètica i localitzat al cromosoma 2, la disminució en la seva expressió pot dependre d'un defecte en el sistema serotoninèrgic i/o dopaminèrgic.

Els individus afectes es consideren infèrtils com a conseqüència de l'hipogonadisme, respecte al qual no hi ha descrites diferències segons el genotip. El gen C15orf2 podria estar implicat en l'esterilitat dels individus SPW de sexe masculí (Färber i col·l., 2000). El fet que hagi estat descrita la possibilitat de reproducció en un cas aïllat d'una dona SPW (Akefeldt i col·l., 1999) no interferiria amb aquesta hipòtesi.

Per últim, i basat en estudis recents, s'ha descrit una associació entre el desenvolupament de trastorns psicòtics en edat adolescent-adulta, en casos deguts a DUP o a DI (Boer i col·l., 2002; Clarke i col·l., 2002; Vogels i col·l., 2004). L'origen d'aquesta important diferència no es coneix. Tanmateix, en casos que presenten delecíó entre els punts de trencament BP1 i BP3, s'han descrit una major severitat dels problemes conductuals i

psicològics respecte als casos amb deleció entre els punts de trencament BP2 i BP3 o DUP (Butler i col·l., 2004).

Síndrome d'Angelman: Els estudis de correlació fenotip-genotip en la SA són extensos i han estat descrites diferències clíniques importants a tenir en compte en l'establiment del valor pronòstic de la malaltia. Hi ha una gradació de severitat en el fenotip segons la causa genètica, de manera que major severitat s'associa a les delecions, seguides de les mutacions en el gen UBE3A i la SA de causa desconeguda, i menys severitat s'associada als casos deguts a una DUP o un DI (Bürger i col·l., 1996; Cassidy i Schwartz 1998; Moncla i col·l., 1999a; Cassidy i col·l., 2000; Lossie i col 2001; Clayton-Smith i Laan, 2003). En els últims anys han estat descrits casos deguts a DI en mosaic. Aquests presenten un ample rang de fenotips que inclou des del característic de la SA fins a fenotips semblants a la SPW (*PWS-like*), en el que els individus afectes presenten obesitat, hipotonia muscular i habilitats en la parla (Gillesen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupont i col·l., 1999; Brockmann i col·l., 2002; Molfetta i col·l., 2002; Buiting i col·l., 2003). A part d'aquests casos amb fenotips menys severs de SA, l'any 2000 Tekin i col·l., van donar a conèixer un cas amb deleció de la regió 15q11-q13 en mosaic, en un pacient amb un fenotip menys sever.

Els casos per deleció són, en general, els més severs ja que presenten una major incidència de crisis d'epilèpsia, microcefalia, hipopigmentació, major rigidesa motora i absència de parla (Bürger i col·l., 1996; Smith i col·l., 1996; Minassian i col·l., 1998; Cassidy i Schwartz, 1998; Moncla i col·l., 1999a; Cassidy i col·l., 2000; Lossie i col·l., 2001). Aquest fenotip més sever es creu que és conseqüència de la haploinsuficiència de gens de la regió 15q11-q13. Minassian i col·l., (1998) van suggerir que la severitat en les crisis d'epilèpsia és associada a la pèrdua d'una de les còpies dels gens dels receptors de GABA inclosos en la regió delecionada. Tal i com ja s'ha descrit en la SPW, la major freqüència d'hipopigmentació en els casos amb deleció, s'associa a la pèrdua d'una de les còpies del gen OCA2/P. Han estat descrits casos de pacients SA

per deleció que a més presenten una mutació en la còpia paterna del gen OCA2/P. Aquests individus presenten albinisme oculocutani de tipus II a més de la SA, fet que confirma la implicació d'aquest gen en la hipopigmentació associada als casos de deleció (Saitoh i col·l., 2000; Fridman i col·l., 2003).

Els pacients amb DUP o DI complet presenten menor incidència de crisis d'epilèpsia, microcefalia i hipopigmentació i millor comunicació gestual. A més molts dels individus amb DUP són capaços de dir algunes paraules i tenen una aparença facial menys típica, tot i que presenten el fenotip conductual característic (Saitoh i col·l., 1997; Stalker i Williams 1998; Moncla i col·l., 1999a; Ohta i col·l., 1999b; Gillesen-Kaesbach i col·l., 1999; Clayton-Smith i Laan, 2003).

El fenotip causat per una mutació en el gen UBE3A és intermedi entre el que presenten els casos amb deleció i les DUP. És característica una major incidència de crisis d'epilèpsia i microcefàlia que els casos amb DUP, no tenen hipopigmentació i presenten millors habilitats en la comunicació que els casos amb deleció. En aquest grup, l'epilèpsia podria associar-se a una possible alteració de la funció sinàptica per l'absència del producte del gen UBE3A, ja que en aquests individus no hi manquen els gens de receptors de GABA (Cassidy i col·l., 2000). Per altra banda ha estat descrita una major predisposició a desenvolupar obesitat en el grup de mutació en UBE3A (Lossie i col·l., 2001).

El grau de severitat del fenotip dels pacients SA de causa genètica desconeguda es considera similar al que presenten els individus amb mutació en el gen UBE3A. Encara que no és possible donar una explicació genètica a aquest fet hi ha diverses hipòtesis que postulen possibles mutacions en gens o en regions de control desconegudes que afectarien a altres gens, mutacions en regions promotores del gen UBE3A o en proteïnes diana d'aquest. També hi ha la possibilitat que en aquest grup s'incloguin individus que presentin altres síndromes amb fenotips que emmascaren la SA (Lossie i col·l., 2001; Williams i col·l., 2001; Clayton-Smith i Laan 2003).

1.4. Objectius

En un grup de 299 pacients amb característiques clíniques de SA, i en un altre grup de 282 pacients amb característiques clíniques de SPW, es va confirmar la clínica amb un diagnòstic genètic en el 22% dels casos. L'objectiu principal va ser millorar les tècniques diagnòstiques i aprofundir en la etiologia d'ambdues síndromes.

Els objectius concrets van ser:

- 1r. Posada a punt de la tècnica M-PCR per diferenciar si el patró de metilació és compatible amb la SPW i SA.
- 2n. Seqüenciació del gen UBE3A en pacients amb fenotip SA i amb patró de metilació normal, i detecció de portadors asimptomàtics.
- 3r. Estudi del centre regulador de la impressió de la regió 15q11-q13 en pacients SPW i SA causats per un DI, i detecció dels portadors asimptomàtics.
- 4t. Proposta d'un algoritme diagnòstic de laboratori.
- 5è. Oferir un consell genètic a les famílies afectes.
- 6è. Valoració de les correlacions fenotip-genotip en la SPW i SA.

2.1. Pacients

D'un grup de 299 pacients SA i de 282 pacients SPW s'han seleccionat 36 pacients després de realitzar la tècnica de *Southern blot* i/o M-PCR per obtenir el patró de metilació:

- 30 pacients amb sospita clínica de SA i patró de metilació normal per l'anàlisi de mutacions en el gen UBE3A
- 4 pacients SA i 2 pacients SPW amb un patró de metilació característic, absència de deleció mitjançant l'estudi de FISH i herència biparental, i per tant amb DI, per l'estudi del CI.

El material biològic es va obtenir a partir d'un total de 49 mostres de sang perifèrica (SP) corresponents als pacients afectes de SPW i SA, a 13 mostres de pares en els casos en que va ser necessari, i a una mostra de líquid amniòtic. Aquest estudi prenatal va ser indicat per un antecedent d'un fill amb mutació en l'exó 11 del gen UBE3A. Les mostres procedien dels Serveis de Genètica i/o Neuropediatria de: Corporació Sanitària Parc Taulí (Sabadell), Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona), Fundación Hospital Alcorcón (Madrid), Hospital Puerta del Mar (Cadis), Hospital Universitari Sant Cecilio (Granada), Hospital Materno Infantil de Badajoz, Hospital de Terrassa (Barcelona), Hospital De Cruces (Biscaia) i Hospital Provincial de San Telmo (Palència).

A la Taula 1 i 2 s'especifiquen les característiques clíniques dels pacients SA i SPW, tenint en compte els criteris clínics descrits per Williams i col·l., (1995) i Gunay-Aygun i col·l., (2001), respectivament.

Taula 1. Característiques clíniques dels pacients SA.

		Pacients amb patró de metilació normal												
	Característiques clíniques	491	731 ^a	734 ^b	821	1091	1201	1221	1331	1341 ^a	1344 ^b	1361	1391	1411
	Edat diagnòstic clínic (anys)	10	10	-	6	4	3	11	3	3	2	2	12	9
Consistents (100%)	Retard mental/motor sever	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Absència de parla	+/-	+/-	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Atàxia	+	-	NA	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+
	Conducta típica ⁺	-	+/-	NA	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
Freqüents (>80%)	Microcefàlia	-	-	NA	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	Epilèpsia	+	+	NA	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
	EEG característic	-	-	NA	NA	-	-	NA	-	+	+	-	+	NA
Associades (20-80%)	Occipuci pla	-	-	NA	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	Protusió de la llengua	-	+/-	NA	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
	Problemes alimentació a la infància	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Prognatisme	-	-	NA	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Macrostomia	-	-	NA	-	+	+	+	+/-	+	+	-	+	+
	Baveig freqüent	-	+	NA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Estrabisme	-	-	NA	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	Hipopigmentació	-	-	NA	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Flexió dels braços durant deambulació	NA	+	NA	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	-
	Hipersensibilitat a la calor	-	NA	NA	-	+	NA	NA	+	NA	NA	+	+	NA
	Trastorn de la son	-	+/-	NA	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Atracció/fascinació per l'aigua	NA	NA	NA	+	+	+	NA	+	+	+	-	+	+

^{a/b} Individus germans⁺ somriure, conducta feliç, personalitat fàcilment excitable, conducta hipermotòrica

NA: no avaluat

734 Pacient que va ser exitus per hipertensió pulmonar crònica i no es disposa de la clínica.

		Pacients amb patró de metilació normal												
	Característiques clíniques	1461	1491	1661	1671	1711	1721	1751	1761	1861	1901	1981	2041	2051
	Edat diagnòstic clínic (anys)	ND	5	4	2	3	6	ND	1.5	2	5	ND	5	5
Consistents (100%)	Retard mental/motor sever	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Absència de parla	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Atàxia	+	+	+/-	-	+	NA	-	+/-	+	+	-	+	+
	Conducta típica ⁺	+	+	+/-	+/-	+	NA	+/-	+	+	+	+	+	+
Freqüents (>80%)	Microcefàlia	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	Epilèpsia	+	NA	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	EEG característic	NA	NA	NA	-	+	-	-	+	NA	NA	-	NA	NA
Associades (20-80%)	Occipuci pla	+	+	+	+	+	NA	+	-	-	+	+	+	-
	Protusió de la llengua	-	-	-	+	+	NA	-	-	-	-	+	-	-
	Problemes alimentació a la infància	-	-	-	+	+	NA	-	+	-	-	NA	-	+
	Prognatisme	-	+	-	-	+	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-
	Macrostomia	-	-	-	+/-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	Baveig freqüent	-	NA	NA	-	+	NA	-	+	-	-	NA	+	-
	Estrabisme	+	+	+	-	-	NA	-	-	-	-	NA	+	-
	Hipopigmentació	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	NA	-	-
	Flexió dels braços durant deambulació	+	+	NA	-	+	NA	-	+	+	-	NA	+	+
	Hipersensibilitat a la calor	+	NA	+	-	+	NA	-	NA	+	-	NA	+	-
	Trastorn de la son	-	NA	NA	+	-	NA	-	+	NA	-	NA	-	-
	Atracció/fascinació per l'aigua	+/-	NA	+	+	+	NA	-	+	+	+	NA	+	+

⁺somriure, conducta feliç, personalitat fàcilment excitable, conducta hipermotòrica

NA: no avaluat

		Pacients amb patró de metilació normal				Pacients amb defecte d'impressió			
Característiques clíniques		2061	2101	2111	2161	1771* ^c	1781	1921*	2301
Edat diagnòstic clínic (anys)		3	4	2.7	3.2	2.5	6	19	3
Consistents (100%)	Retard mental/motor sever	+	+	+	+	-	+	+	+
	Absència de parla	+	+	+	+	-	+	+	+
	Atàxia	+	+	+/-	+	-	+	+	-
	Conducta típica ⁺	+	+	+	+	-	+	-	+
Freqüents (>80%)	Microcefàlia	+	-	-	+	-	NA	+	-
	Epilèpsia	+	-	-	+	-	-	+	+
	EEG característic	NA	-	-	+	-	NA	NA	-
Associades (20-80%)	Occipuci pla	+	+	+	+	-	NA	+	-
	Protusió de la llengua	-	-	-	+/-	-	-	-	-
	Problemes alimentació a la infància	-	NA	-	-	-	+	-	-
	Prognatisme	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+
	Macrostomia	+	-	-	-	-	+	+/-	-
	Baveig freqüent	+	-	+	NA	-	-	+	-
	Estrabisme	-	-	-	+	-	-	-	+
	Hipopigmentació	-	+	-	-	-	NA	-	-
	Flexió dels braços durant deambulació	+	+	NA	NA	-	+	+	+
	Hipersensibilitat a la calor	+	-	NA	-	-	NA	-	-
	Trastorn de la son	-	-	-	+	-	NA	+	+
	Atracció/fascinació per l'aigua	+	-	+	+	-	NA	-	+

⁺ somriure, conducta feliç, personalitat fàcilment excitable, conducta hipermotòrica

* Casos de defecte d'impressió en mosaic

^c Pacient amb indicació d'estudi de metilació per sospita clínica de SPW

NA: no avaluat

Taula 2. Característiques clíniques dels dos pacients SPW amb DI.

CARACTERÍSTIQUES CLÍNIQUES	SPW-851	SPW-1401
Edat diagnòstic (anys)	5	29
Retard mental moderat	Sí	Sí (sever)
Hipotonia muscular	Sí	Sí
Hipogonadisme	No	Sí
Alçada baixa	-	Sí
Hiperfàgia	Sí	No
Obesitat	Sí	No
Peus i mans petits	Sí	Sí
Hipopigmentació	No	No
Cara característica ^a	Sí	Lleuger
Fenotip conductual ^b	-	Atípic*

^a Dolicocefàlia, diàmetre bifrontal estret, ulls en forma d'ametlla, boca petita, llavi superior prim, comissures bucals avall

^b Irritable, baixa tolerància a la frustració, tossut, pensament rígid, rampells, dir mentides, conductes agressives, hàbit de lesionar-se la pell i gratar-se les ferides, menjar-se les ungles, arrancar-se els cabells, mossegar-se els llavis

* Pacient que ha estat ingressada per trastorn psiquiàtric i que no presenta un fenotip característic de SPW

2.2. Metodologia experimental

2.2.1. Extracció de DNA de mostres de sang perifèrica

- 1) Afegir sèrum fisiològic fins a un volum de 50 mL a la mostra de 10-15 mL de SP recollida amb EDTA tripotàssic (Tubs *Nunc* de 50 mL)
- 2) Agitar suaument i centrifugar a 2500 rpm durant 10 min a 4°C (Centrífuga *Jouan* MR22I)
- 3) Eliminar la fase superior amb cura de no arrossegar la interfase de leucòcits i afegir aigua destil·lada fins a omplir el tub

- 4) Incubar en gel 30 min per lisar els eritròcits, centrifugar a 3000 rpm durant 15 min a 4°C i eliminar el sobrenadant. En aquest punt el precipitat es pot emmagatzemar a -20°C
- 5) Afegir aigua destil·lada fins a omplir el tub i repetir el pas 4)
- 6) Tractar el precipitat amb 6 mL de la solució de lisi de leucòcits, 0,4 mL de SDS 10% i 1 mL de solució de proteïnasa K i agitar fins a obtenir un aspecte homogeni
- 7) Incubar a 37°C durant tota la nit en un bany d'agitació
- 8) Afegir 2 mL de NaCl 5,5M, agitar i centrifugar a 3400 rpm durant 15 min a 4°C
- 9) Traspasar el sobrenadant a un tub net i repetir la centrifugació per tal d'eliminar el màxim les sals
- 10) Afegir un volum de cloroform al sobrenadant i barrejar. El cloroform ajuda a precipitar les proteïnes i les restes cel·lulars que puguin quedar
- 11) Centrifugar a 3000 rpm durant 15 min a 4°C, recuperar la fase superior, tot evitant endur-se part de la interfase
- 12) Afegir 2 volums d'etanol absolut i barrejar suaument fins a visualitzar el DNA. Recuperar-lo amb ajut d'una pipeta Pasteur de vidre, rentar-lo amb etanol 70% per eliminar l'excés de sals i resuspendre en 0,5 mL de TE o aigua destil·lada a 37°C durant 2 h
- 13) Fer una dilució 1:20 de la mostra i mesurar la densitat òptica (DO) a 260 nm i a 280 nm de longitud d'ona per a calcular la concentració i la puresa del DNA

Solucions:

Solució de lisi de leucòcits

36,4 mL NaCl 5,5M
4 mL EDTA 0,25M, pH 8,0
2,5 mL Tris-HCl 2M, pH 7,5
Enrasar fins a 0,5 L amb aigua destil·lada

Solució de proteïnasa K (2mg/mL)

100 mg Proteïnasa K
5 mL SDS 10%
0,4 mL EDTA 0,25M, pH 8,0
Enrasar fins a 50 mL amb aigua destil·lada

2.2.2. Anàlisi del patró de metilació

2.2.2.1. *Southern blot*

L'estudi del patró de metilació dels dos pacients SPW: 851 i 1401 i dels casos SA: 491, 731, 734, 821, 1091, 1201, 1221, 1331, 1341, 1361, 1391, 1411, 1461, 1491, 1711 i 1861, es realitzà mitjançant la tècnica de *Southern blot* amb enzims de restricció sensibles a metilació, i amb les sondes de DNA KB17 i PW71 marcades amb biotina per a diversos loci de la regió 15q11-q13 (Poyatos, 2005).

2.2.2.2. M-PCR

La resta de pacients SA s'analitzaren amb la tècnica M-PCR. Alguns casos SA, així com el cas SPW 1401, es van estudiar per duplicat també amb la tècnica *Southern blot*.

En cada sèrie de pacients es va incloure un control positiu i un control negatiu.

Tractament amb bisulfit sòdic:

El bisulfit sòdic converteix les bases citosina no metilades en uracils per una reacció de sulfonació. Això permet diferenciar l'al·lel matern (metilat) que presentarà citosines a la seva seqüència, de l'al·lel patern (no metilat) que presentarà uracils.

- 1) Resuspendre 4µg de DNA genòmic en 45µL d'aigua desionitzada i autoclavada
- 2) Afegir 5µL de NaOH 3M recentment preparat i desnaturalitzar durant 15 min a 37°C. Incubar durant 3 min a 95°C i deixar 3 min en gel
- 3) Afegir 500µL de solució de bisulfit sòdic i incubar 16 h a 55°C a les fosques
- 4) Recuperar el DNA amb el kit *GeneClean II* (Bio 101 Inc.) seguint el protocol del fabricant i fer-ne elució en 50µL d'aigua desionitzada autoclavada
- 5) Desulfonar afegint 5,5µL de NaOH 3M i incubant 15 min a 37°C
- 6) Neutralitzar amb 55µL d'acetat amònic 6M pH 7

7) Precipitar amb etanol absolut, rentar amb etanol 70%, deixar assecar el botó i resuspendre'l en 10µL d'aigua desionitzada autoclavada. En la posta a punt es va calcular que en aquest volum final la concentració de DNA estigués en el rang 50-100ng/µL

Solucions:

<u>Bisulfit sòdic</u>	8,1 g bisulfit sòdic (Sigma)
	0,5 mL hidroquinona (Sigma) 40mM
	0,6 mL NaOH 10M
	15 mL aigua destil·lada
	Ajustar el pH a 5

Condicions d'amplificació i detecció:

La reacció de PCR es realitza amb una barreja de tres encebadors específics per a la regió de l'exó 1 del gen SNRPN (Taula 3) segons la descripció de Zeschnigk i col·l., (1997): un *Forward* específic per l'al·lel matern metilat (MAT), un *Forward* específic pel patern no metilat (PAT) i un *Reverse* comú per ambdós al·lells (COM). Després del primer cicle d'amplificació del DNA tractat amb bisulfit sòdic, en l'al·lel matern la cadena complementària presentarà guanines i serà específica per l'encebador MAT, mentre que en l'al·lel patern hi hauran adenines essent aleshores l'encebador PAT l'específic per aquesta seqüència. El disseny dels encebadors permet realitzar l'amplificació d'ambdós al·lells en una sola reacció donat que la mida dels fragments resultants és de 313 pb i 221 pb.

Afegir a un tub eppendorf de 0,5 mL els següents reactius:

- 1) 50-100 ng de DNA
- 2) 2,5 µL de tampó 10X sense magnesi
- 3) 1,5 mM de MgCl₂
- 4) 2 µL d'una barreja equimolar de desoxinucleòtids per a que la seva concentració final sigui de 0'2 mM (10mM; 2,5 mM de cada un dels quatre tipus: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems)
- 5) 2 µL de cada encebador (concentracions finals a la taula 3)
- 6) 1-2,5 unitats de *Taq Gold Polimerasa* (Applied Biosystems)

- 7) Aigua desionitzada autoclavada fins a un volum final de 25 µL
- 8) Posar la barreja en el termociclador (MJ Research). Si es tracta d'un aparell sense tapa termoestable cal afegir una gota d'oli mineral

Condicions de la reacció de PCR:

Desnaturalització inicial 94°C durant 4 min

35 cicles de:

Desnaturalització 15 seg a 95°C

Annealing 5 min a 61°C

Extensió 30 seg a 72°C

Extensió final 72°C durant 5 min

- 9) Els productes resultants són visualitzats amb bromur d'etidi en un gel d'agarosa al 2% utilitzant un marcador de pes molecular de 100 pb.

Taula 3. Seqüències dels encebadors utilitzats, mida dels fragments resultants i concentració final necessària de cada un d'ells.

Seqüències dels encebadors (5'-3')	Concentració final	Mida (pb)
MAT TATTGCGGTAAATAAGTACGTTTGCGGTC	1µM	313
COM CTCCAAAACAAAACTTTAAAACCCAAATTCC	1µM	221
PAT GTGAGTTTGGTGTAGAGTGGAGTGGTTGTTG	0,25µM	

2.2.3. Cribatge de mutacions en els exons 15 i 16 del gen UBE3A per SSCP

La tècnica de SSCP es basa en l'anàlisi de diferències en el patró de migració de cadenes senzilles de DNA en un gel de poliàcrilamida no desnaturalitzant. La conformació secundària d'aquestes cadenes depèn de la seva seqüència, pel que molècules amb un únic canvi de base poden migrar de forma diferent en el gel. La resolució de la tècnica de SSCP es veu afectada per la mida dels fragments analitzats pel que es recomana que no superi els 300 pb (Sheffield i col·l., 1993).

2.2.3.1. Condicions d'amplificació i detecció

Per l'anàlisi mitjançant SSCP es van emprar els encebadors (Taula 4) i les condicions descrites per Malzac i col·l., (1998), segons les quals l'amplificació de l'exó 15 es realitzà mitjançant dues reaccions de PCR i l'exó 16 s'amplifica en una única reacció de PCR. El volum final de les reaccions de PCR en aquest anàlisi va ser de 25 µL en l'amplificació de l'exó 15 i 50 µL en l'amplificació de l'exó 16.

Afegir a un tub eppendorf de 0,5 mL els següents reactius:

- 1) 50-100 ng de DNA
- 2) 5 µL (2,5 µL si el volum final és de 25 µL) de tampó 10X sense magnesi
- 3) 1,5 mM de MgCl₂
- 4) 4 µL (2 µL si el volum final és de 25 µL) d'una barreja equimolar de desoxinucleòtids (2,5 mM de cada un dels quatre tipus: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per a què la seva concentració final sigui de 0,2 mM
- 5) 1 µM de cada encebador
- 6) 1-1,5 unitats de *Taq Gold Polimerasa* (Applied Biosystems)
- 7) Aigua desionitzada autoclavada fins a un volum final de 25/50 µL
- 8) Posar la barreja en el termociclador

Condicions de la reacció de PCR:

Desnaturalització inicial 94°C durant 5 min

35 cicles de:

Desnaturalització 1 min a 95°C

Annealing 1 min a la temperatura específica
de l'encebador

Extensió 1 min a 72°C

Extensió final 72°C durant 5 min

9) Els productes resultants són visualitzats amb bromur d'etidi en un gel d'agarosa al 2% utilitzant un marcador de pes molecular de 100 pb.

Taula 4. Seqüències dels encebadors utilitzats, mida dels fragments resultants i temperatures d'*annealing*.

Seqüències dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T ^a Annealing
E15F1 TGAATGCCAACTGAAACCA (Intró 14)	130	52°C
E15R1 CCCACAGGTGCTCTGTCT (Exó 15)		
E15R2 AACAGAAAAGACTCTTCTTG (Exó 15)	147	52°C
E15F2 TTCGGTAGGTATACAGTCAC (Intró 15)		
E16F CCATGACTTACAGTTTTCT (Intró 15)	276	55°C
E16R TGGGACACTATCACCACCAA (3'UTR)		

Digestió de l'exó 16 per l'anàlisi de SSCP

Els productes resultants de l'amplificació de l'exó 16 es van al·liquotar en 23 µL i digerir amb 20 unitats de l'enzim MspI (Boehringer Mannheim) incubant la barreja a 37°C durant 12-16 h. Els fragments resultants de la digestió han de ser de 189 i 91 pb.

Preparació de gels per l'anàlisi de SSCP i condicions electroforètiques

Els gels emprats es van preparar amb el derivat de l'acrilamida 2XMDE™ Gel Solution (BioWhittaker Molecular Applications Products). La cubeta d'electroforesi emprada està provista de placa d'alumini per evitar gradients de temperatura en la superfície del gel durant l'electroforesi.

1) Netejar amb sabó, aigua destil·lada i etanol absolut les dues plaques de vidre de 20x45 cm. Muntar-les separades per espaiadors de 0,4 mm de gruix

2) Preparar una solució amb:

12,5mL de 2XMDE™ Gel Solution

3 mL de TBE 10X

34,5 mL d'aigua desionitzada

375 µL de persulfat amònic (PSA) al 10% (Bio-Rad) recentment preparat

37,5 µL de TEMED (Serva)

3) Agitar suaument la solució evitant fer bombolles i abocar-la entre les dues plaques de vidre. Col·locar la pinta

- 4) Deixar polimeritzar la solució durant al menys 1 h
- 5) Retirar la pinta i muntar les plaques en la cubeta d'electroforesi vertical (Owl's Aluminium Backed Sequencing System S4S, Owl Scientific Inc.) amb TBE 1X i netejar els pous a pressió amb el mateix tampó per eliminar restes de solució
- 6) Sotmetre el gel a un camp elèctric de 20 W durant 15 min
- 7) Preparar les mostres i els controls:
 - Mostres:* 5 µL del producte de PCR+5 µL de tampó de càrrega (8 mL de formamida desionitzada, 0,2 mL EDTA 0,5M, 10 mg xilene cyanol, 10 mg blau de bromofenol, fins a 10 mL d'aigua desionitzada)
 - Controls* per a detectar la possible presència de fragments no digerits o no desnaturalitzats que puguin interferir en la interpretació del patró de migració:
 - Una mostra no digerida i no desnaturalitzada*
 - Una mostra digerida i no desnaturalitzada*
 - Una mostra no digerida i desnaturalitzada
- 8) Rentar novament els pous i carregar les mostres
- 9) Realitzar l'electroforesi a 2-3 W durant 12 h a Ta

Detecció per tinció amb nitrat de plata

El protocol de detecció dels gels de SSCP emprat consisteix en 4 passos principals realitzats a temperatura ambient i en agitació: fixació, oxidació, tinció amb nitrat de plata i revelat

- 1) Fixar el DNA submergint el gel en una solució d'etanol al 10% durant un mínim de 10 min, i després en una de metanol al 10% i àcid acètic al 10% durant 15 min
- 2) Oxidar el DNA en una solució d'àcid nítric a l'1% durant 30 seg. El temps en aquest pas és crític per a obtenir gels sense coloració de fons
- 3) Rentar dues vegades amb aigua destil·lada
- 4) Tenyir el DNA mantenint el gel en la solució de tinció durant 20 min.
- 5) Rentar dues vegades amb aigua destil·lada

6) Revelar mantenint el gel submergit en el revelador fins a observar la intensitat de bandes desitjada

7) Aturar el revelat eliminant la solució anterior i submergint el gel en una solució d'àcid acètic al 10% durant un mínim de 5 min

8) Posar el gel sobre paper Watman de 3mm i deixar assecar a Ta

Solucions:

<u>Oxidant</u>	15,4 mL d'àcid nítric al 65% (Merk) Enrasar fins a 1 L amb aigua destil·lada
<u>Tinció</u>	2,02 gr de nitrat de plata (Merk) 1 L aigua destil·lada
<u>Revelador</u>	29,6 gr de carbonat sòdic sense H ₂ O 540 µL de formaldehid al 37% Enrasar fins a 1 L amb aigua destil·lada

Valoració del patró de bandes

A partir del patró electroforètic característic per als exons 15 i 16 es va considerar una mostra amb possible variació de seqüència aquella que presentés un nombre de bandes diferent o que conservés el patró però presentés un retard o avanç en la migració respecte de la resta.

2.2.4. Cribatge de mutacions en el gen UBE3A per seqüenciació directa

S'han seqüenciat els productes de PCR dels exons 8-16 que pertanyen al major marc obert de lectura del gen UBE3A, dels 30 pacients del grup d'estudi. Per l'amplificació dels diferents exons es van emprar els encebadors descrits per Malzac i col·l., (1998) i Fang i col·l., (1999) i les temperatures d'*annealing* especificades a la Taula 5.

Taula 5. Seqüències dels encebadors utilitzats, mida dels fragments resultants i temperatures d'*annealing*.

Seqüències dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T ^a Annealing
E8F CACTGTGCTTATTGTTTGAATG (Intró 7) ^a	372	55°C
E8R TGGTTTTTCAGGCAACAATTCTC (Intró 8) ^a		
E9aF TTGCAACAGAGTAAACATACATATT (Intró 8) ^b	717	55°C
E9aR CTCCATCATTCTCCGAATCTGGT (Exó 9) ^b		
E9bF TTGCAAAGCGATGAGCAAGCTACCC (Exó 9) ^b	750	55°C
E9bR CACTGAACTGTATCATGATATC (Intró 9) ^b		
E10F GCAATCATCTTCTTTTCATGTT (Intró 9) ^a	217	55°C
E10R CGACACCATAATCACATTAC (Intró 10) ^a		
E11F AGTCCTTAATAAAATACAAAAGT (Intró 10) ^a	305	52°C
E11R GAATTAAAAAATGACAAAGAAC (Intró 11) ^a		
E12F AGAAGAGTGATATAAATTATTTG (Intró 11) ^b	465	58°C
E12R CTGCTTCATGTCCTCTTTCTCT (Intró 12) ^b		
E1314F TGTTAAGAAGTAGGTGTAAAATTGA (Intró 12) ^b	558	58°C
E1314R CCTAGAGATAAAGGTCTGAAGCA (Intró 14) ^b		
E15F TGAATGCCAAACTGAAACCA (Intró 14) ^a	224	52°C
E15R TTCGGTAGGTATACAGTCAC (Intró 15) ^a		
E16F CCATGACTTACAGTTTTCCT (Intró 15) ^a	276	55°C
E16R TGGGACACTATCACCACCAA (3'UTR) ^a		

^aMalzac i col·l., (1998); ^bFang i col·l., (1999)

S'ha utilitzat el mètode enzimàtic de seqüenciació de DNA desenvolupat per Sanger i col·l., (1992) automatitzat per Applied Biosystems amb l'ús de nucleòtids marcats amb diferents fluorocroms.

2.2.4.1. Condicions d'amplificació i detecció

El volum final de les reaccions de PCR per aquest anàlisi va ser de 25 µL.

1) Afegir a un tub eppendorf de 0,5 mL els següents reactius:

50-100 ng de DNA

2,5 µL de tampó 10X sense magnesi

1,5-2 mM de MgCl₂

2 µL d'una barreja equimolar de desoxinucleòtids (2,5 mM de cada un dels quatre tipus: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per a que la seva concentració final sigui de 0,2 mM

1 µM de cada encebador

1-1,5 unitats de *Taq Gold Polimerasa* (Applied Biosystems)

aigua destil·lada fins a un volum final de 25 µL

2) Posar la barreja en el termociclador.

Condicions de la reacció de PCR pels exons 9, 12, 13-14, 15 i 16:

Desnaturalització inicial 94°C durant 5 min

35 cicles de:

Desnaturalització 1 min a 95°C

Annealing 1 min a la temperatura específica de l'encebador

Extensió 1 min a 72°C

Extensió final 72°C durant 5 min

Condicions de la reacció de PCR pels exons 8 i 10:

Desnaturalització inicial 92°C durant 4 min

20 cicles de:

Desnaturalització 1 min a 94°C

Annealing 1 min a la temperatura específica de l'encebador

Extensió 1 min a 72°C

15 cicles de:

Desnaturalització 1 min a 94°C

Annealing 1 min a 50°C

Extensió 1 min 30 seg a 72°C

Extensió final 72°C durant 7 min

Condicions de la reacció de PCR per l'exó 11:

Desnaturalització inicial	92°C durant 2 min
32 cicles de:	
Desnaturalització	30 seg a 94°C
<i>Annealing</i>	1 min a la temperatura específica de l'encebador
Extensió final	72°C durant 7 min

3) Els productes resultants són visualitzats amb bromur d'etidi en un gel d'agarosa al 2% utilitzant un marcador de pes molecular de 100 pb.

2.2.4.2. Seqüenciació automàtica de productes de PCR

1) Purificar el producte de PCR per eliminar les restes de nucleòtids i encebadors recuperant el producte amb el kit de purificació QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN) o per hidròlisi enzimàtica amb el kit ExoSAP-IT® (usb® Corporation) seguint el protocol descrit pel fabricant

*Si el producte de PCR no era de qualitat i presentava fragments inespecífics es va recuperar la banda esperada del gel d'agarosa emprant el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)

2) Determinar la qualitat de la banda en un gel d'agarosa

3) Afegir al tub de reacció de seqüenciació 90 ng de DNA i 3,2 pmol d'encebador. La resta de reactius depèn del kit de seqüenciació emprat i les condicions recomenades pel fabricant

S'han utilitzat diferents kits i seqüenciadors automàtics: el kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) amb el seqüenciador ABI 373 A, i els kits BigDye Terminator v3.1 i v1.1 (Applied Biosystems) amb els seqüenciadors ABI 3100 i ABI 310, respectivament

4) Posar la barreja en el termociclador (MJ Research).

Condicions de la reacció de PCR:

25 cicles de:

Desnaturalització	10 seg a 96°C
<i>Annealing</i>	5 seg a 50°C
Extensió	4 min a 60°C

5) Precipitar el producte obtingut:

- 5.1) Afegir 2 μ L d'una solució d'acetat sòdic 1,5M i EDTA 250 mM a pH 8 i 100 μ L d'etanol 100%
- 5.2) Barrejar i deixar 15 min a Ta
- 5.3) Centrifugar 15 min a 13.500 rpm i eliminar el sobrenadant amb micropipeta
- 5.4) Rentar amb etanol 70% i centrifugar 5 min a 13.500 rpm
- 5.5) Eliminar el sobrenadant amb micropipeta i deixar assecar a Ta

6) Resuspendre:

- amb formamida i separar el producte per electroforesi en un gel de poliacrilamida/urea. Analitzar-ho en el seqüenciador automàtic ABI 373 si el kit de seqüenciació emprat és el DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham), o bé
- amb el polímer proporcionat pel fabricant del kit de seqüenciació BigDye Terminator (Applied Biosystems) i analitzar-ho en el seqüenciador automàtic ABI 310/3100

7) Obtenir els cromatogrames resultants i comparar les seqüències dels diferents individus entre ells i amb les del GenBank

2.2.5. Separació d'al·lels per clonatge

Atès que els possibles canvis esperats es presenten en heterocigosi, pot ser necessària la separació d'al·lels per confirmar la presència d'un canvi en la seqüència, o per facilitar la interpretació de les seqüències a partir dels cromatogrames. La separació d'al·lels es va realitzar clonant el producte de PCR desitjat utilitzant el kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega) pel lligament i posterior transformació del plàsmid en cèl·lules competents d'*E. Coli*. El vector pGEM®-T Easy Vector de 3018 pb té expressió fenotípica de resistència a ampicil·lina i el punt d'inserció es troba inclòs en la regió codificant de l' α -pèptid de l'enzim β -galactosidasa. Aquest fet permet la identificació directa dels clons recombinants en plaques LB amb ampicil·lina i X-Gal.

2.2.5.1. Clonatge

1) Lligament (kit pGEM[®]-T Easy Vector System):

- 1.1) Calcular la quantitat de DNA tenint en compte la mida del fragment a insertar emprant la fórmula proporcionada pel fabricant
- 1.2) Afegir a un tub eppendorf els reactius seguint el protocol proporcionat pel fabricant
- 1.3) Barrejar i incubar a 4°C durant 2 hores

2) Transformació (cal treballar en codicions estèrils):

- 2.1) Afegir 100 µL de cèl·lules competents (10⁸ cfu/mL)
- 2.2) Incubar en gel 30 min
- 2.3) Realitzar l'electroporació incubant a 42°C 1 min 30 seg i afegir ràpidament 800 µL de medi LB líquid
- 2.4) Incubar a 37°C 1 h 15 min

3) Sembrar 100 µL en plaques LB/Amp/X-Gal i incubar a 37°C (finalitzat el cultiu es poden conservar les plaques a 4°C)

2.2.5.2. Seqüenciació d'al·lels

- 1) Picar amb puntes de micropipeta diferents colònies blanques i diluir cadascuna amb 100 µL de d'aigua destil·lada en un tub eppendorf
- 2) Bullir 10 min (en aquest punt es pot conservar a -20°C)
- 3) Realitzar la seqüenciació automàtica segons l'apartat 2.2.4.2., realitzant la reacció directament a partir del plàsmid emprant un encebador universal M13 o bé els encebadors específics (Taula 5) de la seqüència del fragment insertat. Es va estandarditzar a 4 µL la quantitat de DNA necessària per a la reacció.

2.2.6. Anàlisi del centre d'impressió per *Southern blot* i per PCR quantitativa

L'estudi del CI es va realitzar per *Southern blot* amb sondes de DNA marcades amb ³²P, específiques de la regió PWS-SRO i de la regió AS-SRO i per PCR quantitativa (*Real-Time quantitative PCR*) emprant sondes TaqMan[®] (Applied Biosystems) i encebadors específics de la regió PWS-SRO i AS-SRO.

2.2.6.1. *Southern blot*

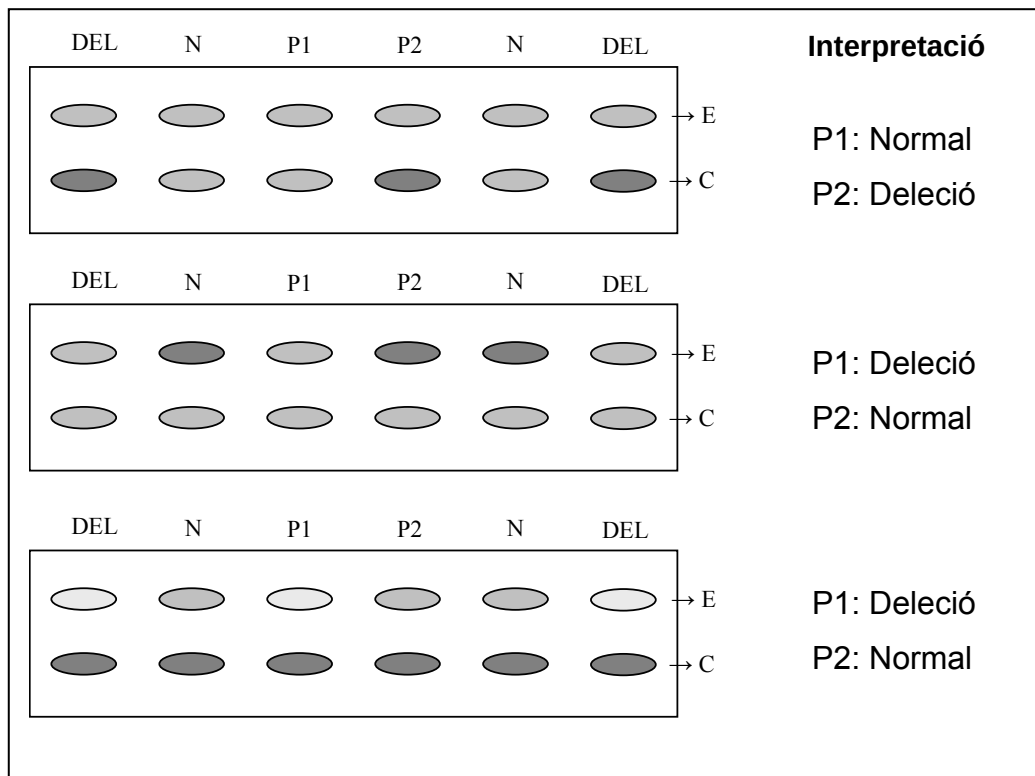
Les mostres de SPW es van digerir amb l'enzim de restricció BgIII, s'utilitzà la sonda KB17 específica de la regió PWS-SRO, i com estàndard intern el locus de la Síndrome *Trichorhinophalangeal* (TRPS) en el cromosoma 8. Les mostres SA es van digerir amb l'enzim de restricció EcoRV. Es va emprar la sonda IC1/3 específica de la regió AS-SRO i com estàndard intern el locus del gen Retinoblastoma (Rb) en el cromosoma 13. En ambdós estudis es van incloure per duplicat una mostra control normal i una mostra control de deleció del CI. És necessari incloure mostres control negatives i positives (DNA normal i DNA amb deleció 15q11-q13/CI) per duplicat per confirmar el patró de bandes en cada experiment, ja que aquest pot variar en cada experiment en funció de la eficiència d'hibridació de la sonda control intern i de la sonda específica. Els diferents patrons que es poden observar s'esquematitzen a la Figura 7:

-Si l'eficiència d'hibridació de la sonda control intern i de la sonda específica és la mateixa (mateixa intensitat d'ambdues bandes a la mostra control normal), s'observarà una major intensitat de la banda corresponent al control intern respecte a l'específica si existeix una deleció de la regió problema en un dels al·lels.

-Si l'eficiència d'hibridació de la sonda específica és major que el control intern (major intensitat de la banda corresponent a la sonda específica respecte el control intern a la mostra control normal), s'observarà la mateixa intensitat en ambdues bandes si existeix una deleció de la regió problema en un dels al·lels.

-Si l'eficiència d'hibridació del control intern és major que la de la sonda específica (major intensitat de la banda corresponent al control intern respecte l'específica a la mostra control normal), s'observaria el mateix patró si existís una deleció de la regió problema però amb una intensitat més feble de la banda corresponent a la sonda específica.

Figura 7. Exemples dels possibles patrons obtinguts en l'estudi de deleccions del CI mitjançant *Southern blot*. C: sonda control intern; E: sonda específica; DEL: control de deleció; N: control normal; P1 i P2: mostres problema.



Condicions de digestió i transferència a membrana:

- 1) Calcular el volum de DNA per a digerir 2 µg
- 2) Preparar la barreja de digestió en un tub eppendorf:

2 µL BSA	}	x núm. mostres
2 µL Tampó M/B 10X		
2 µL BglII/EcoRV (20 unitats)		
4 µL aigua destil·lada		
10 µL (2 µg DNA+ x µL aigua destil·lada)		
- 3) Incubar tota la nit a 37°C
- 4) Carregar els 20 µL de la digestió en un gel d'agarosa al 1%, tenyit amb bromur d'etidi i realitzar l'electroforesi a 100 V durant aproximadament 4 h
- 5) Fotografiar el gel i tallar-lo a nivell dels pous i en una cantonada per a identificar la seva orientació
- 6) Hidrolitzar el DNA per immersió del gel en una solució 0,25 M HCl durant 30 min

- 7) Rentar el gel amb aigua destil·lada i desnaturalitzar el DNA per immersió del gel en una solució 0,25M NaOH/0,6 M NaCl durant 30 min en agitació. Tornar a rentar amb aigua destil·lada
- 8) Neutralitzar amb una solució 1 M Tris-HCl pH 8/1,5 M NaCl durant 30 min en agitació
- 9) Amb el tampó de transferència 10XSSC, transferir el DNA a una membrana de Nylon que ha estat prèviament humida en el mateix tampó
- 10) Separar la membrana del gel, assecar deixant-la en paper Whatman i fixar el DNA amb llum UV durant 2 min

Condicions d'hibridació, detecció i exposició:

- 1) Es realitza una prehibridació del DNA fixat a la membrana durant 2 h a 65°C amb la solució d'hibridació en una bossa de plàstic ben segellada o en un tub d'hibridació
- 2) Realitzar la hibridació a 65°C tota la nit afegint a la solució anterior 16 ng de la sonda prèviament marcada per *random oligonucleotide priming* amb α -[³²P] dCTP (NEN Dupont). El marcatge i manipulació de la sonda va ser realitzat per un tècnic de laboratori en condicions de treball d'estricta protecció
- 3) Fer tres rentats seguits de la membrana amb una solució 2XSSC a Ta
- 4) Fer rentats successius en 2XSSC i 0,1XSSC de 20 min cadascun a 65°C
- 5) Deixar assecar la membrana i fer la exposició a una pel·lícula autoradiogràfica XAR tota la nit a -80°C

Solucions:

Hibridació: 4XSSPE
 6% polietilen glicol (Sigma)
 2X Solució *Denhardt's*
 0,5% SDS
 100 mg/mL d'esperma de salmó

2.2.6.2. PCR quantitativa

Per l'anàlisi de deleccions s'ha emprat la tècnica de PCR a temps real que permet quantificar el nombre de còpies d'una regió cromosòmica respecte a una regió control (control endogen). Aquesta tècnica ha estat desenvolupada per Applied Biosystems i es basa en la quantificació de fluorescència emesa per una sonda TaqMan[®] quan aquesta és degradada per la polimerasa durant la extensió del fragment amplificat. Les sondes TaqMan[®] emprades estan marcades a l'extrem 5' amb VIC[®] o FAM[™] i a l'extrem 3' amb TAMRA[™]. Mentre la sonda està intacta, el marcatge de l'extrem 3' emmascara la fluorescència de l'extrem 5'. Durant l'extensió del fragment amplificat, la polimerasa degrada la sonda en sentit 5'-3' alliberant-se la fluorescència emesa per VIC[®] o FAM[™]. Aquesta tècnica requereix l'ús de plaques i tapes òptiques de PCR (ABI Prism[™] Optical 96-Well Reaction Plates/ABI Prism[™] Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems), una barreja de reactius TaqMan[®] (Applied Biosystems), així com el sistema ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Una bateria de dilucions de concentracions conegudes de DNA de la mostra control generen corbes estàndard per a cada regió problema i cada control endogen (gen Rb), per tal d'extrapolar el nombre inicial de còpies de cada regió en una mostra problema. Aquestes corbes estàndard relacionen el logaritme del nombre inicial de còpies amb el cicle de PCR en el que se supera el llindar de detecció de fluorescència. Aquests valors s'obtenen de forma automàtica amb el programari acoblat al sistema.

A la Taula 6 s'especifiquen les seqüències dels encebadors i sondes TaqMan[®] emprades, així com la mida del fragment amplificat.

1) Preparar dilucions de 125, 62,5, 25, 12,5 i 6,25 ng/μL de DNA genòmic control per obtenir les corbes estàndard. És necessària una corba estàndard per a cada sonda

- 2) Preparar dilucions de 25 ng/μL dels DNA problema, control normal i control de deleció del CI
- 3) Preparar una barreja dels següents reactius per a cada sonda:

	Concentració inicial	Concentració final
2,5 μL encebador F	3 μM	0,3 μM
2,5 μL encebador R	3 μM	0,3 μM
2,5 μL sonda	2,5 μM	0,25 μM
12,5 μL Taqman [®] mix	2X	1X
3 μL H ₂ O		

Les quantitats especificades són per una única reacció pel que s'han de multiplicar pel nombre de reaccions necessàries considerant que totes les amplificacions es fan per duplicat

- 4) Repartir 23 μL de la barreja en cada pou, afegir 2 μL de DNA i col·locar la tapa adhesiva
- 5) Introduir la concentració de DNA, el codi de mostra i la sonda que conté cada pou al programari del sistema indicant els que seran emprats per realitzar les corbes estàndard
- 6) Col·locar la placa i iniciar el sistema seguint les condicions d'amplificació recomanades:

2 min a 50°C
 10 min a 95°C
 40 cicles de:
 15 seg a 95°C
 1 min a 60°C

Taula 6. Seqüències dels encebadors i sondes utilitzats en la quantificació del nombre de còpies de les regions especificades. A les sondes s'especifiquen el tipus de molècula fluorescent dels extrems 5' i 3'.

Seqüències dels encebadors i sondes (5'-3')	Regió
^a F GCTCCATCCCAGGGTTTCTAAT	
^a Sonda FAM TM -TCAGGGTTTGGTTTGCAGCAGAA-TAMRA TM	SA-SRO1
^a R GCACTTGTTCGAAATGCAGATT	70 pb
^a F AGCGAAGCTCAGACATCATTTG	
^a Sonda FAM TM -ATAGCTATTGCTTTGTGTCTGTGT-TAMRA TM	SA-SRO2
^a R CAAACCTTTAACAGCAGCTGACCTA	74 pb
^a F ATCTGTCTGAGGAGCGGTCACT	
^a Sonda FAM TM -CGCGATGGAGCGGCAAGG-TAMRA TM	Exó1 SNRPN (SPW-SRO1)
^a R TCCCCAGGCTGTCTCTTGAG	84 pb
^a F CTTTTGCCTGGAAGGAATGG	
^a Sonda FAM TM -AGCCCTCCCCTTCACCTGGCTG-TAMRA TM	Intró1 SNRPN (SPW-SRO2)
^a R CCACAACCGGAAAGGAACAG	78 pb
^a F CATGTTGCTCAAAGAACCATATAGTAAGT	
^a Sonda FAM TM -TTTAATTTATGCCCTTTTACTTTCTCATTACAGCAGT-TAMRA TM	Exó 7 Rb
^a R TGGTACCCACTAGACATTCAATAAGC	94 pb
^b F ACAATCAAAGGACCGAGAAGGA	
^b Sonda VIC [®] -CAACTGATCACCTTGAATC-TAMRA TM	Exó 18 Rb
^b R TGGAGAGGAAGATTAAGAGGACAAG	69 pb

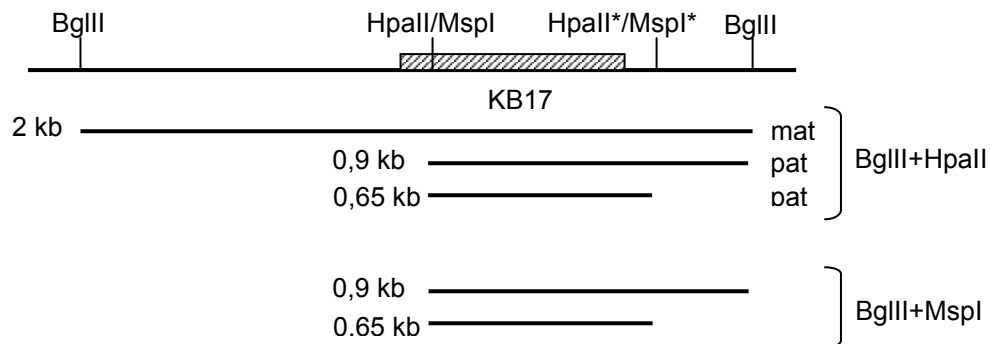
^a Buiting (comunicació personal); ^b Lohmann (comunicació personal)

2.2.7. Estudi de l'origen familiar del cromosoma portador del defecte d'impressió per *Southern blot*

L'anàlisi consisteix en realitzar una anàlisi de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilitzant enzims de restricció sensibles a metilació. En l'intró 1 del gen SNRPN ha estat descrit un polimorfisme de restricció pels enzims HpaII i MspI (Saitoh i col·l., 1997). Aquests enzims són específics per a la mateixa seqüència (CCGG) essent HpaII sensible a metilació. El DNA genòmic dels pacients i dels seus pares es va digerir amb la combinació dels enzims BglII + HpaII i BglII + MspI i es va emprar la sonda KB17 marcada amb ³²P. En famílies informatives l'origen matern (metilat) ve determinat pel fragment de 2 kb no digerit per HpaII i el patern (no metilat) pel fragment de 0,9 o 0,65 kb digerit per HpaII. La digestió amb MspI proporciona la informació de l'absència o presència del polimorfisme en l'al·lel matern a través de l'obtenció del fragment de 0,9 ó 0,65, respectivament, a més de la mateixa banda d'origen patern que s'ha obtingut amb la digestió anterior amb HpaII (Figura 8).

Atès que el tampó de digestió pels enzims BglII i MspI és el mateix, fou possible realitzar una doble digestió. En el cas dels enzims BglII i HpaII el tampó de digestió és diferent i es va disminuir la concentració de l'enzim a la segona digestió, de manera que fou necessari realitzar les dues digestions per separat.

Figura 8. Esquema de l'anàlisi del polimorfisme de restricció pels enzims HpaII i MspI (marcat amb un asterisc) en el locus SNRPN. S'indica la sonda KB17 amb un requadre ratllat i els fragments resultants, tant de la digestió amb BglII i HpaII (sensibile a metilació) com amb BglII i MspI.



Condicions de digestió:

- 1) Calcular el volum de DNA per a digerir 2 µg
- 2) Preparar en un tub eppendorf les barreges de digestió:

2 µL BSA	}	x núm. mostres
2 µL Tampó M 10X		
2 µL BglII (20 unitats)		
2 µL MspI (20 unitats)		
2 µL aigua destil·lada		

10 µL (2 µg DNA+ x µL aigua destil·lada)

2 µL BSA	}	x núm. mostres
2 µL Tampó L 10X		
2 µL HpaII (20 unitats)		
4 µL aigua destil·lada		

10 µL (2 µg DNA+ x µL aigua destil·lada)

- 3) Incubar tota la nit a 37°C

4) Preparar la segona barreja de digestió per l'enzim BglII:

4 µL Tampó M 10X	}	x núm. mostres
2 µL BglII (20 unitats)		
14 µL aigua destil·lada		
10 µL producte 1a digestió		

5) Incubar tota la nit a 37°C

Les condicions per a realitzar el *Southern blot* són les mateixes que les descrites a l'apartat 2.2.6.1.

2.2.8. Seqüenciació del centre de impressió

Per descartar delecions o mutacions puntuals en el CI, que no es considerin polimorfismes, es va realitzar la seqüenciació de la regió SA-SRO i de l'exó 1 i de l'intró 1 del gen SNRPN (*PWS-SRO*).

Per l'amplificació dels diferents fragments es van emprar els encebadors descrits per Buiting i col·l., (2003), i les condicions especificades a la Taula 7.

Per a la seqüenciació automàtica dels productes resultants es va emprar el protocol descrit a l'apartat 2.2.4.2.

Taula 7. Seqüències dels encebadors utilitzats, mida dels fragments resultants, concentració de clorur de magnesi i temperatures d'*annealing*.

Seqüències dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T ^a Annealing	MgCl ₂ (mM)
SA-SROF GCTCAAGCCGTGTTTCATTTT	1185	50°C	2
SA-SROR TTGGCTTCCTTTATATGAAC			
eSNRPNF TCTAGAGGCCCCCTCTCATT	344	62°C	2
eSNRPNR GCTCCCCAGGCTGTCTCTTG			
iSNRPNF GGTGCAGTGGTAAGGAGAGG	409	62°C	2
iSNRPNR AAAGCAGTAGCCCAGTGCAG			

3.1. Estudi del patró de metilació

Es va estudiar el patró de metilació de la regió 15q11-q13 en un total de 299 pacients SA i de 282 pacients SPW (Taula 8), dels quals es van seleccionar 36 pacients: 34 corresponen a pacients SA i 2 a pacients SPW (Taules 1 i 2, pàgines 34 a 37).

3.1.1. Pacients SPW

Les dues mostres de pacients SPW havien estat analitzades per *Southern blot*, amb el resultat d'absència de l'al·lel no metilat. Una d'aquestes mostres (SPW-1401) es va tornar a analitzar amb la tècnica M-PCR i es confirmà el patró de metilació característic de SPW, amb l'absència del fragment de 221 pb corresponent a l'al·lel no metilat. L'aplicació de les tècniques de FISH i d'anàlisi de microsatèl·lits, descartaren la presència de deleció i confirmaren l'herència biparental en ambdós individus, és a dir diagnosticaren un DI (Taula 8).

Taula 8. Grup de pacients SPW i SA. Freqüències de les diferents etiologies associades a un patró de metilació característic de SPW i SA a la nostra sèrie, i total de casos amb patró de metilació normal.

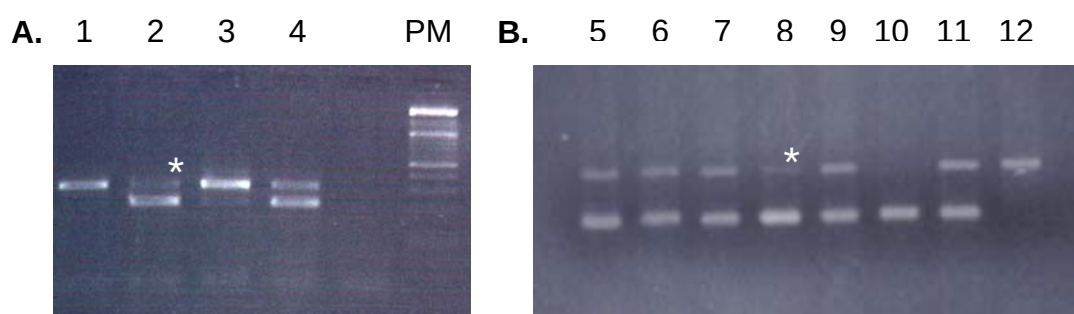
		SPW	SA
Patró de metilació característic	Deleció 15q11-q13	46 (73%)	52 (76%)
	DUP	8 (12,7%)	6 (8,8%)
	DI	2 (3,17%)	4 (5,8%)
	Desconeguda	7 (11,1%)	6 (8,8%)
	Total	63 (22,3%)	68 (22,7%)
Patró de metilació normal		219	231
Total casos analitzats		282	299

3.1.2. Pacients SA

Dels 34 pacients SA seleccionats, 30 van presentar un patró de metilació normal amb la tècnica de *Southern blot* i/o M-PCR. Dos pacients (SA-

1781 i SA-2301) van presentar un patró de metilació característic de SA amb M-PCR, observant-se la presència del fragment de 221 pb corresponent a l'al·lel no metilat i l'absència del de 313 pb corresponent a l'al·lel metilat. En els altres dos pacients (SA-1771 i SA-1921), mitjançant la tècnica de M-PCR es va obtenir amplificació del fragment corresponent a l'al·lel no metilat, mentre que l'amplificació del metilat va ser molt feble respecte els controls de patró de metilació normal, dades compatibles amb un mosaicisme (Figura 9). En aquests 4 casos SA amb patró de metilació compatible amb la síndrome, es va descartar la presència de deleció o de DUP emprant les tècniques de FISH i d'anàlisi de microsatèl·lits, confirmant un DI (Taula 8).

Figura 9. M-PCR dels casos SA-1771 (A) i SA-1921 (B) en els que s'indica amb un asterisc la banda feble de 313 pb corresponent a l'al·lel matern metilat. Carrils 1, 3 i 12: patró SPW (221 pb); carril 10: patró SA (313 pb); carrils 4-7, 9 i 11: patró normal (313 pb + 221 pb); carril 2: SA-1771; carril 8: SA-1921.



3.2. Estudi de mutacions en el gen UBE3A en pacients SA

L'estudi de mutacions en els exons 15 i 16 del gen UBE3A es va realitzar per SSCP i seqüenciació automàtica del DNA. Els exons 8-14 van ser estudiats per seqüenciació automàtica del DNA. A les taules 9 i 10

s'indiquen els pacients estudiats per cadascuna d'aquestes dues tècniques.

3.2.1. Tècnica SSCP i posterior seqüenciació

3.2.1.1. Anàlisi de l'exó 15

L'anàlisi de l'exó 15 es va realitzar amb la tècnica de SSCP en 15 individus (Taula 9):

- 12 pacients amb clínica característica de SA i patró de metilació normal
- 1 mostra corresponent al pacient SA-1761, amb mutació en l'exó 15 detectada en aquest treball, per valorar les condicions d'electroforesi
- els pares del pacient SA-1761 amb mutació en l'exó 15

Taula 9. Individus analitzats per SSCP dels exons 15 i 16.

Mostra	SSCP Exó 15	SSCP Exó 16
1091	+	+
1201	+	+
1331	+	+
1341	+	+
1361	+	+
1391	+	+
1411	+	+
1461	+	+
1491	+	+
1661	+	+
1671	+	+
1711	+	+
^f 1761 (pacient)	+	
^f 1762 (pare)	+	
^f 1763 (mare)	+	

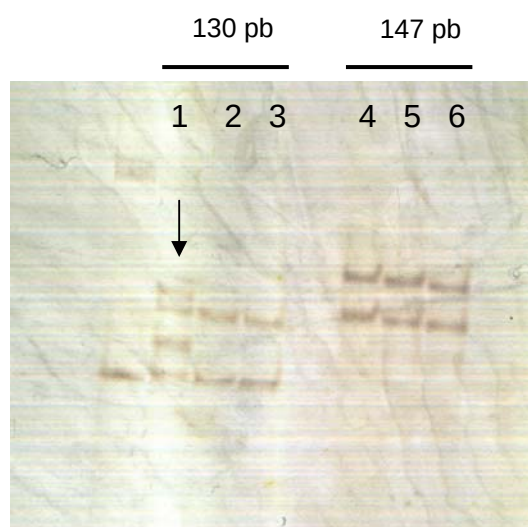
^fFamília

+: Indica patró electroforètic anòmal

Es va confirmar el resultat esperat en el pacient SA-1761 detectant-se un patró electroforètic alterat (Figura 10). En la resta de pacients SA

analitzats, així com en els pares de SA-1761 el patró electroforètic va ser uniforme.

Figura 10. Gel de SSCP de la família 1761. Els carrils 1, 2 i 3 corresponen al fragment de 130 pb de l'exó 15 del pacient, del pare i de la mare, respectivament. Els carrils 4, 5 i 6 corresponen al fragment de 147 pb de l'exó 15 del pacient, del pare i de la mare, respectivament. Amb una fletxa s'indica el patró de migració anòmal del pacient.



3.2.1.2. Anàlisi de l'exó 16

L'anàlisi de l'exó 16 es va realitzar amb la tècnica de SSCP en 12 pacients amb clínica característica de SA i patró de metilació normal (Taula 9).

En un cas (SA-1201) es va obtenir un patró electroforètic alterat en els gels de SSCP (Figura 11). En la seqüenciació es va detectar una deleció en heterozigosi dels nucleòtids AAGA en posició 2507_2510. Aquesta deleció ha estat descrita per Fang i col·l., (1999) i provoca un *stop* prematur en el codó 839 (Figura 12; Taula 11).

Figura 11. Gel de SSCP on s'observa el patró de migració anòmal de la mostra SA-1201 indicat amb una fletxa.

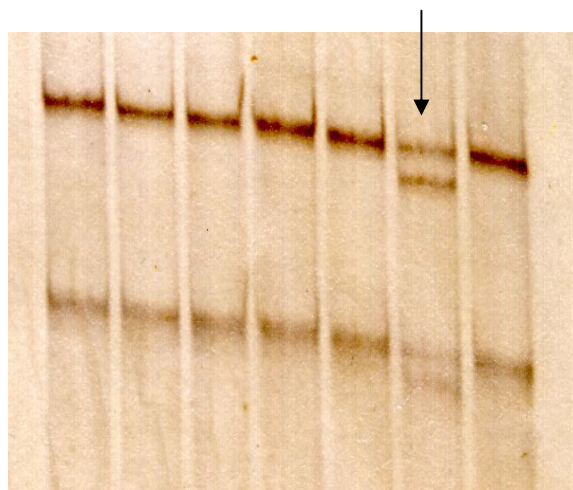
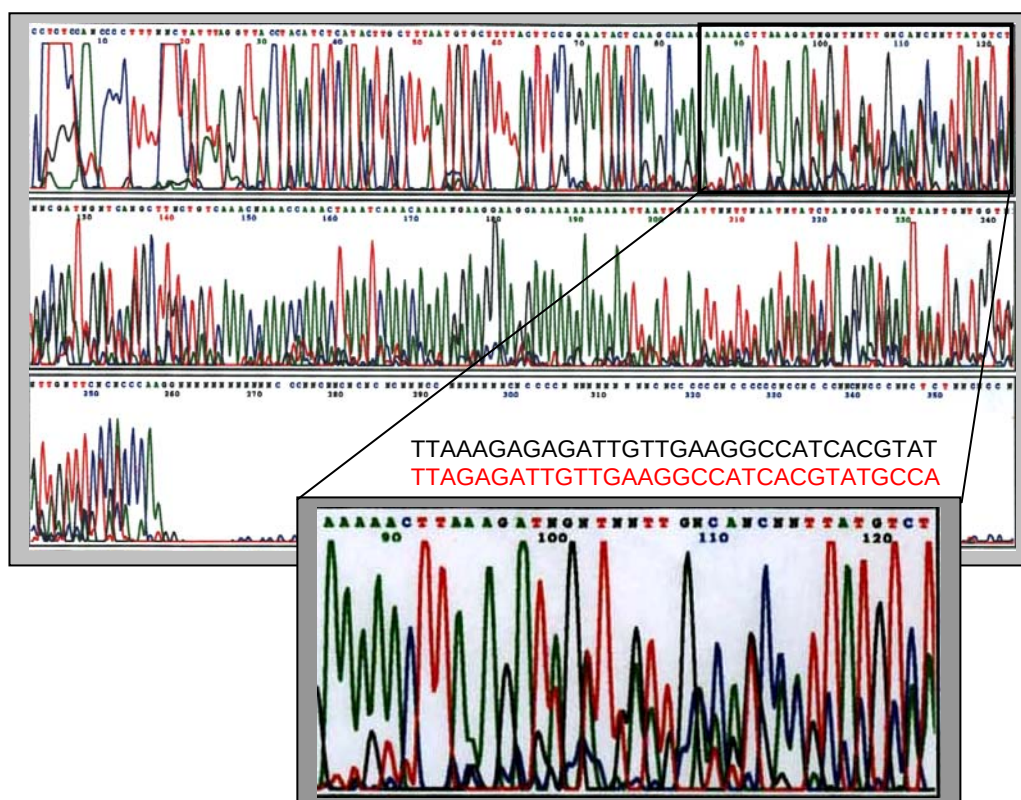
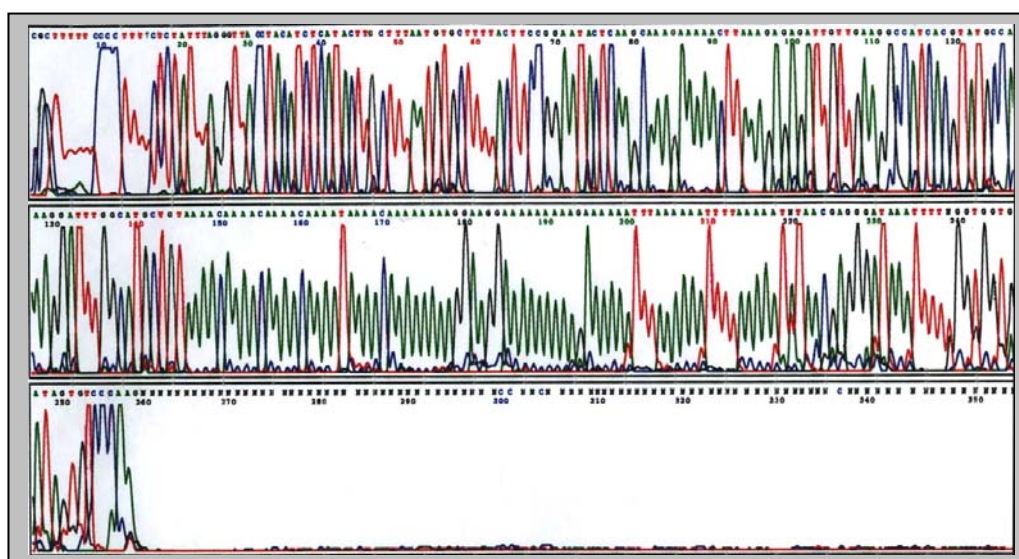


Figura 12. Cromatogrames de la seqüenciació *Forward* de l'exó 16 a la mostra SA-1201 amb mutació (A) i la mostra SA-1341 normal (B). A la part A de la figura s'ha ampliat la regió corresponent a la deleció dels nucleòtids AAGA i es detalla la seqüència de l'al·lel normal en negre i de l'al·lel mutat en vermell.

A.



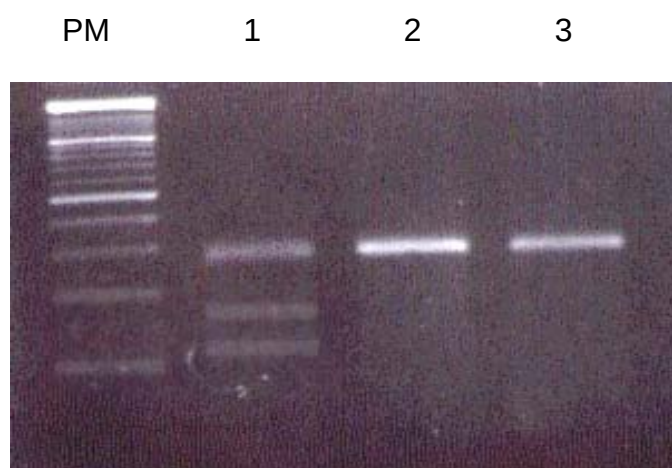
B.



La mutació esmentada del pacient SA-1201 crea una diana de restricció per l'enzim Ddel, que genera tres fragments de 276, 161 i 111 pb, corresponents a l'al·lel normal i a l'al·lel mutat digerit. Per a comprovar la mutació en el pacient i estudiar els pares, el producte d'amplificació de l'exó 16 es va digerir amb Ddel i els fragments resultants es van resoldre en un gel d'agarosa al 2% (Figura 13).

Figura 13. Anàlisi per digestió amb l'enzim de restricció Ddel. En el pacient 1201 (carril 1) s'observen tres bandes corresponents a l'al·lel normal (276 pb) i a l'al·lel mutat digerit (161 i 111 pb). En els pares (carrils 2 i 3), homozigots per l'al·lel normal, s'observa la banda de 276 pb.

PM: marcador de 100 pb.



3.2.2. Seqüenciació automàtica del DNA

L'anàlisi dels exons 8-16 del gen UBE3A es va realitzar per seqüenciació automàtica del DNA en 35 individus (Taula 10):

- 30 pacients amb clínica característica de SA i patró de metilació normal
- 1 mostra de líquid amniòtic (SA-1714)
- 3 mares i 2 pares dels pacients SA-1341, SA-1344, SA-1411 i SA-1711

Taula 10. Individus SA analitzats per seqüenciació automàtica dels exons 8-16.

Mostra	Seqüenciació							
	E8	E9	E10	E11	E12	E1314	E15	E16
491	+	+	+	+	+	+	+	+
^a 731 (pacient)	+	+	+	+	+	+	+	+
^b 734 (pacient)	+	+	+	+	+	+	+	+
821	+	+	+	+	+	+	+	+
1091	+	+	+	+	+	+	+	+
1201								+
1221	+	+	+	+	+	+	+	+
1331	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1341 (pacient)	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1344 (pacient)	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1343 (mare)		+						
1361	+	+	+	+	+	+	+	+
1391	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1411 (pacient)	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1412 (pare)		+						
^f 1413 (mare)		+						
1461	+	+	+	+	+	+	+	+
1491	+	+	+	+	+	+	+	+
1661	+	+	+	+	+	+	+	+
1671	+	+	+	+	+	+	+	+
^f 1711 (pacient)		+		+		+	+	+
^f 1712 (pare)				+				
^f 1713 (mare)				+				
^f 1714 (prenatal)				+				
1721	+	+	+	+	+	+	+	+
1751	+	+	+	+	+	+	+	+
1761						+	+	+
1861	+	+	+	+	+	+	+	+
1901	+	+	+	+	+	+	+	+
1981	+	+	+	+	+	+	+	+
2041	+	+	+	+	+	+	+	+
2051	+	+	+	+	+	+	+	+
2061	+	+	+	+	+	+	+	+
2101	+	+	+	+	+	+	+	+
2111	+	+	+	+	+	+	+	+
2161	+	+	+	+	+	+	+	+

^{ab} Germans

^f Família

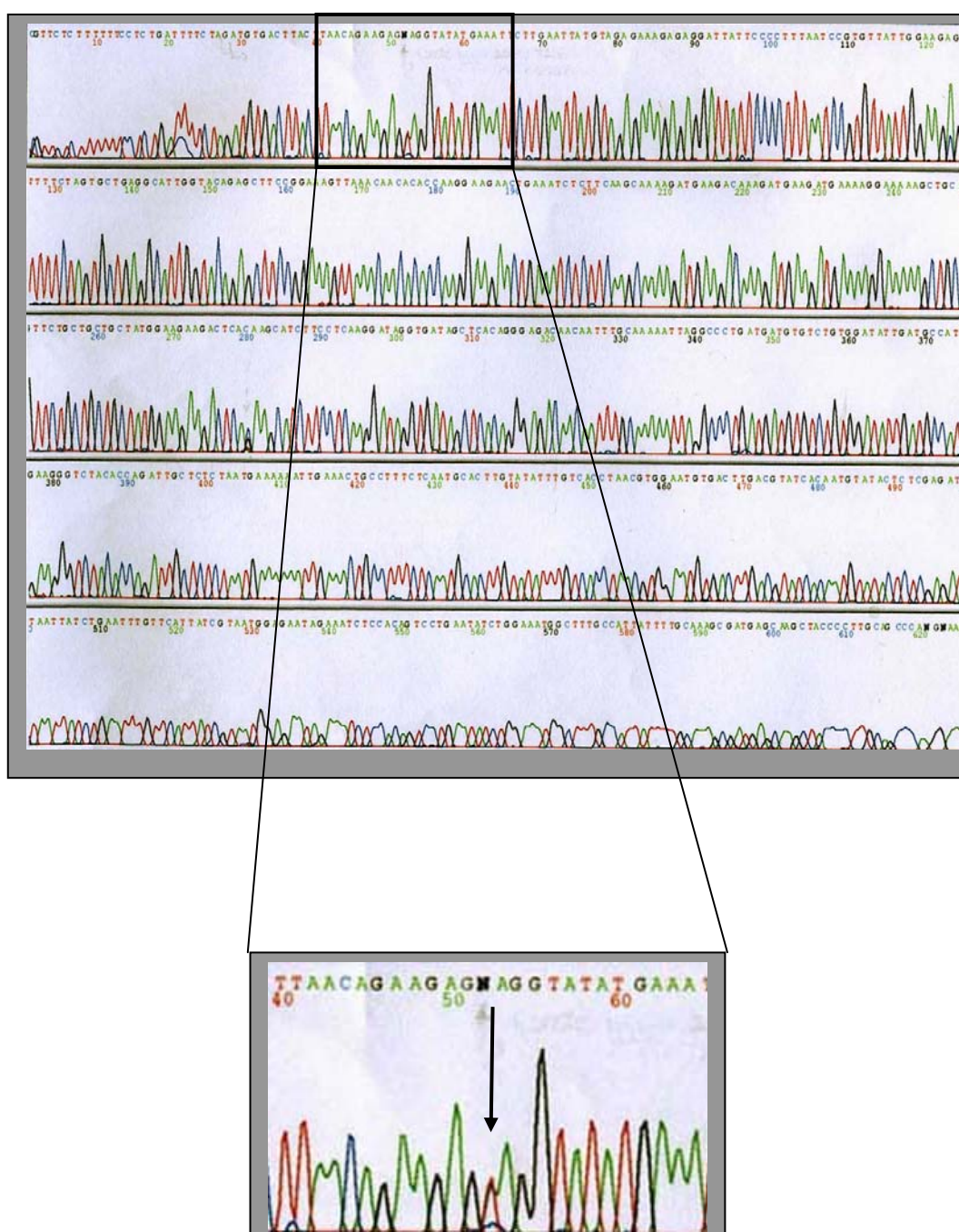
+: Indica presència de mutació

En els cromatogrames obtinguts de l'exó 9 dels casos SA-1341 i SA-1344 es va detectar una transició de A a T en heterozigosi. Aquesta transició, no descrita anteriorment, canvia la seqüència AAG del codó 109 corresponent a l'aminoàcid lisina pel triplet d'*stop* TAG (Figura 14; Taula

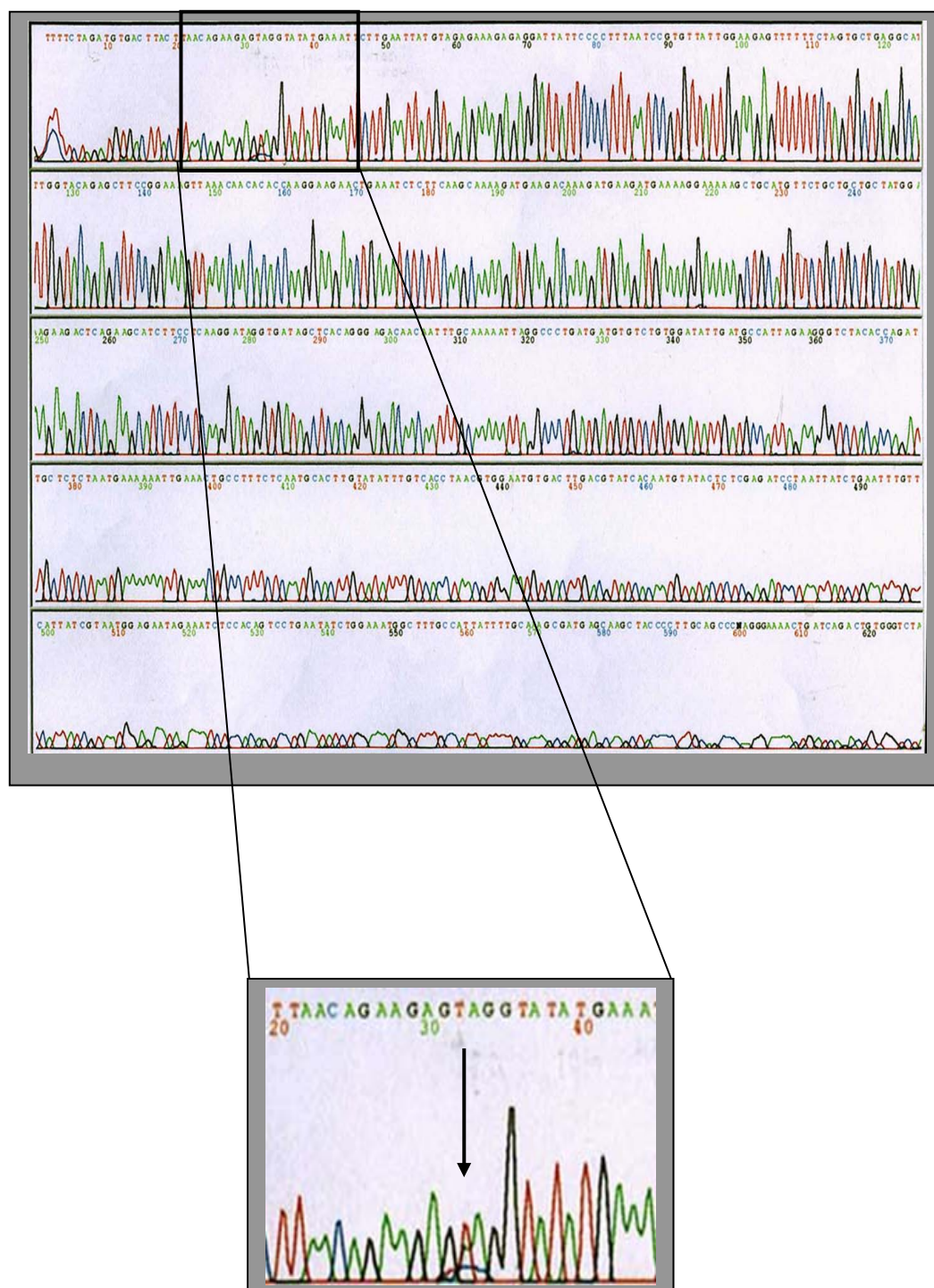
11). En l'estudi familiar es va obtenir el mateix canvi en la mostra de la mare (Figura 14).

Figura 14. Cromatogrames de la seqüenciació *Forward* del fragment de 717 pb de l'exó 9 de les mostres SA-1341 (A), SA-1344 (B) i SA-1343 (C). La transició s'ha ampliat i s'indica amb una fletxa. L'apartat D de la figura correspon a un cromatograma normal, obtingut de la seqüenciació de la mostra SA-1751.

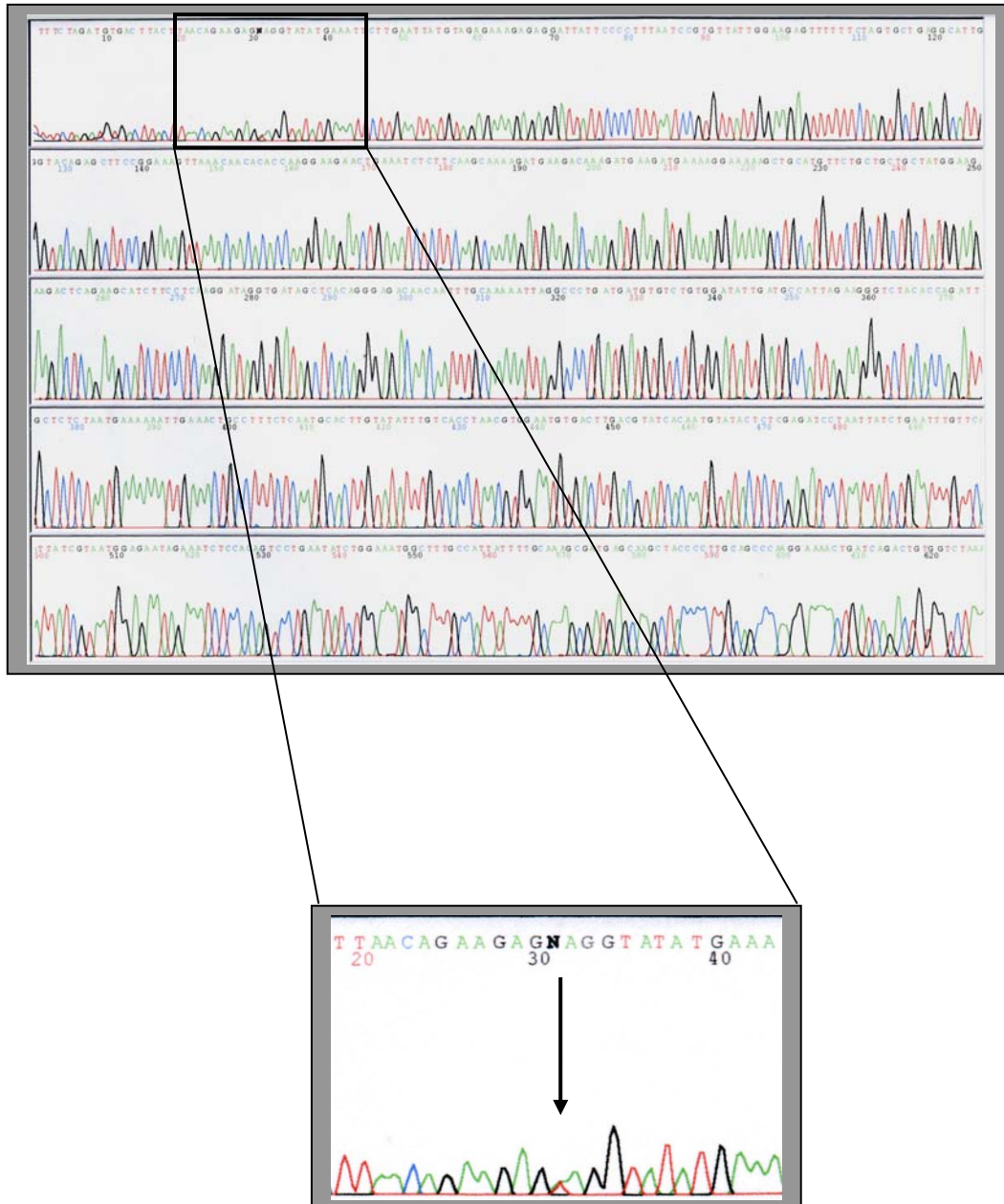
A.



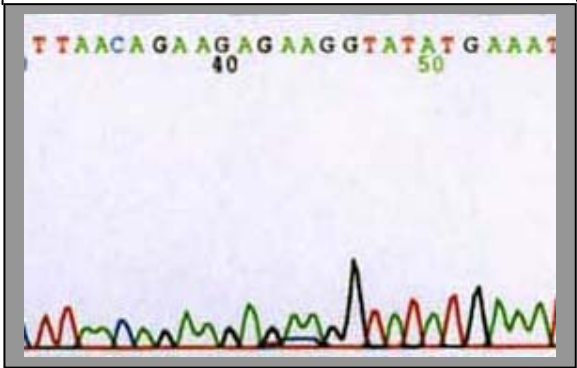
B.



C.



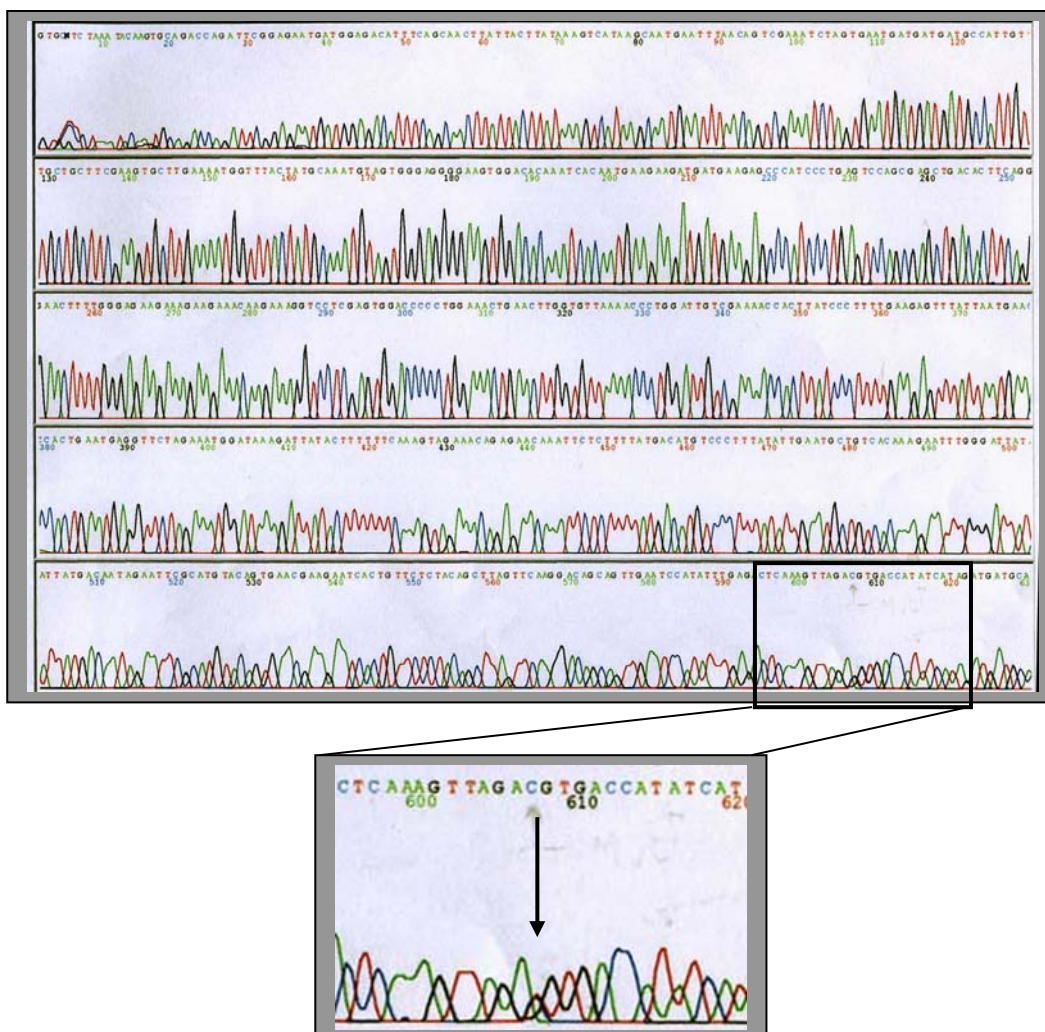
7



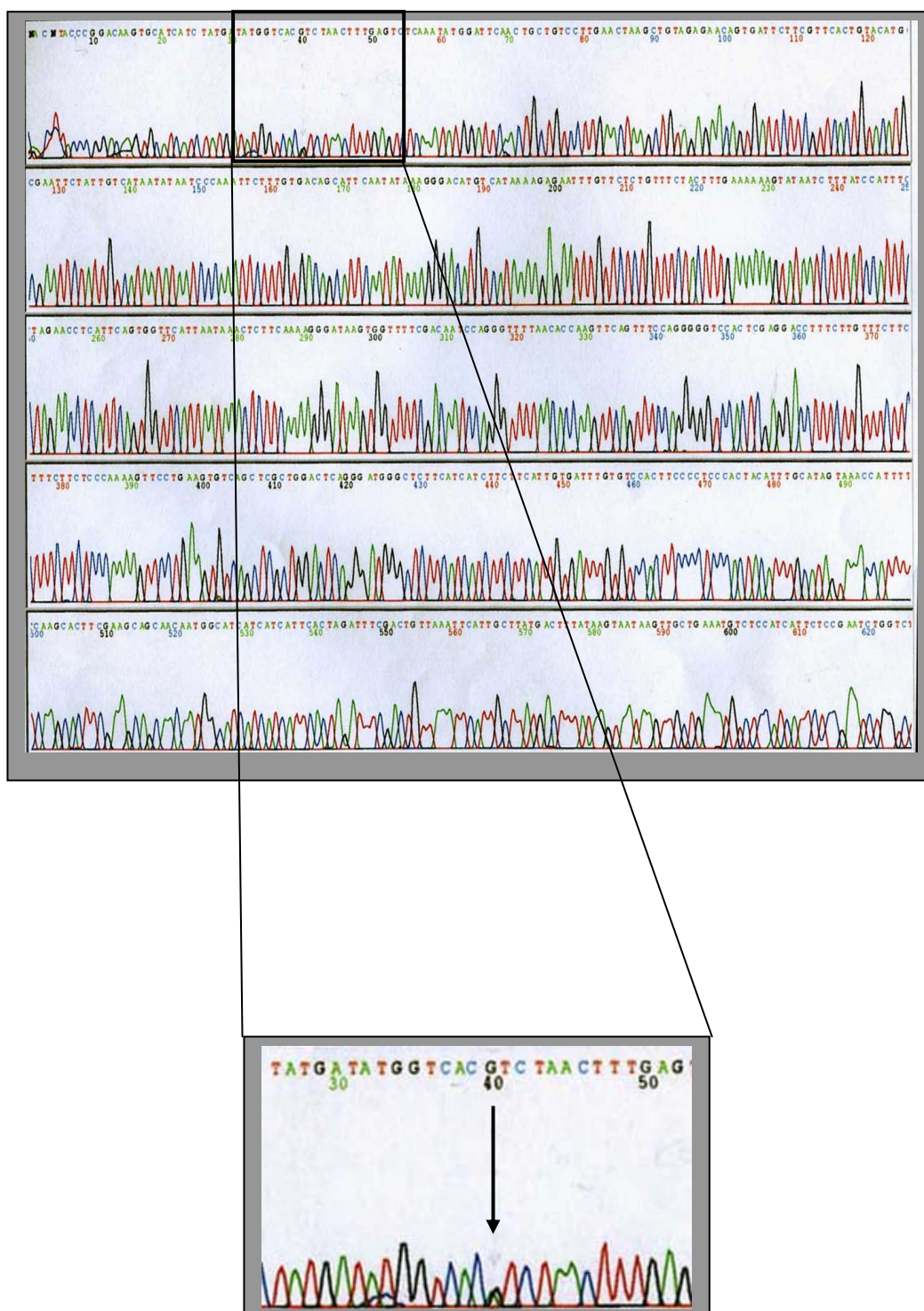
En el cas SA-1411 es va detectar una transició de C a T en heterozigosi en el cromatograma de l'exó 9. Aquesta transició ha estat descrita per Baumer i col·l., (1999) i canvia la seqüència CGT del codó 506 corresponent a l'aminoàcid arginina pel triplet TGT corresponent a l'aminoàcid cisteïna (Figura 15; Taula 11). En l'estudi familiar es va obtenir el mateix canvi en la mostra de la mare (Figura 15).

Figura 15. Cromatogrames de la seqüenciació *Forward* i *Reverse* del fragment de 750 pb de l'exó 9 de la mostra SA-1411 (A), i de la seqüenciació *Reverse* de la mateixa regió de les mostres SA-1412 (B) i SA-1413 (C). S'ha ampliat la regió de la transició i s'indica amb una fletxa.

A. Forward

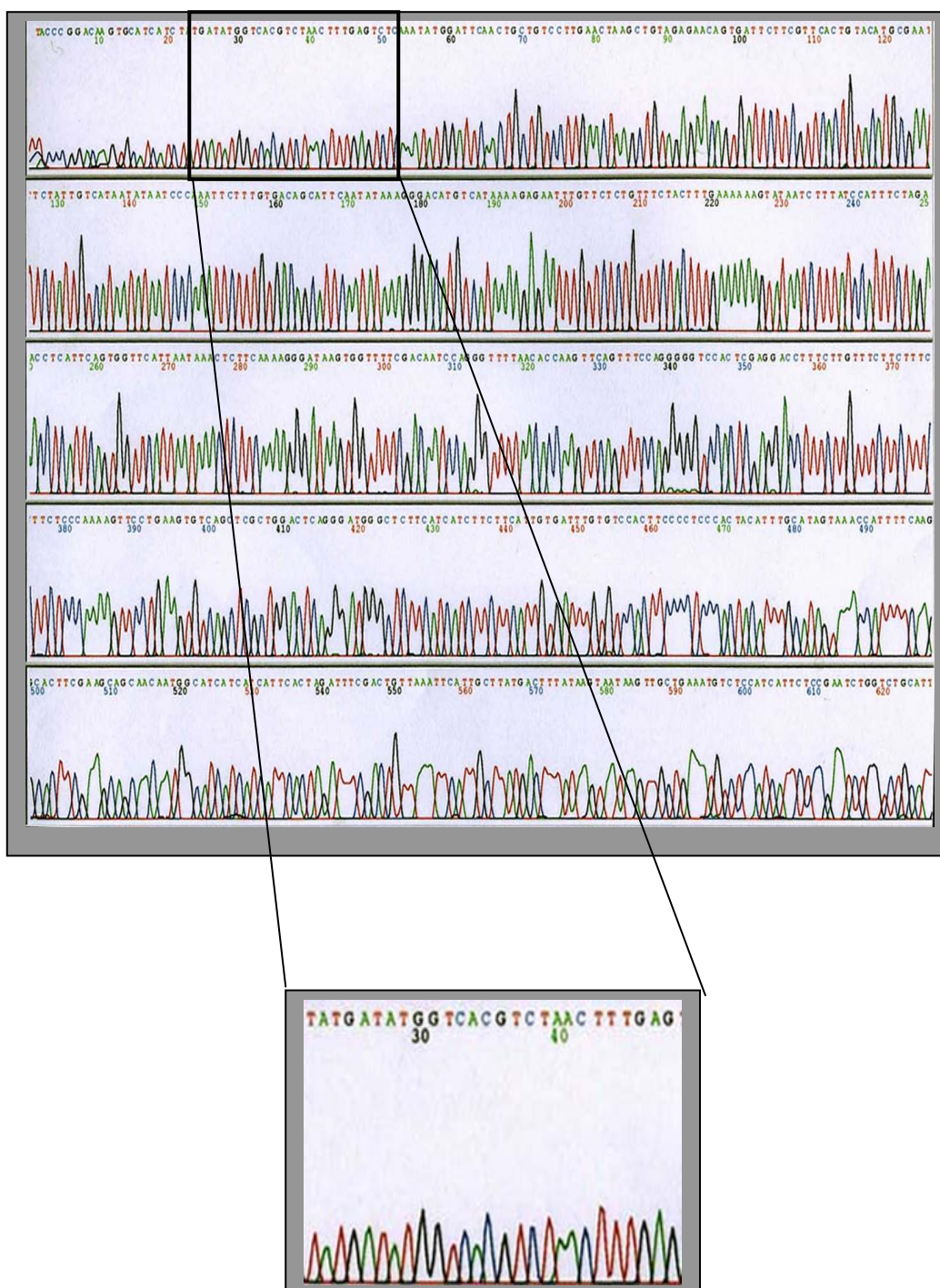


A. Reverse

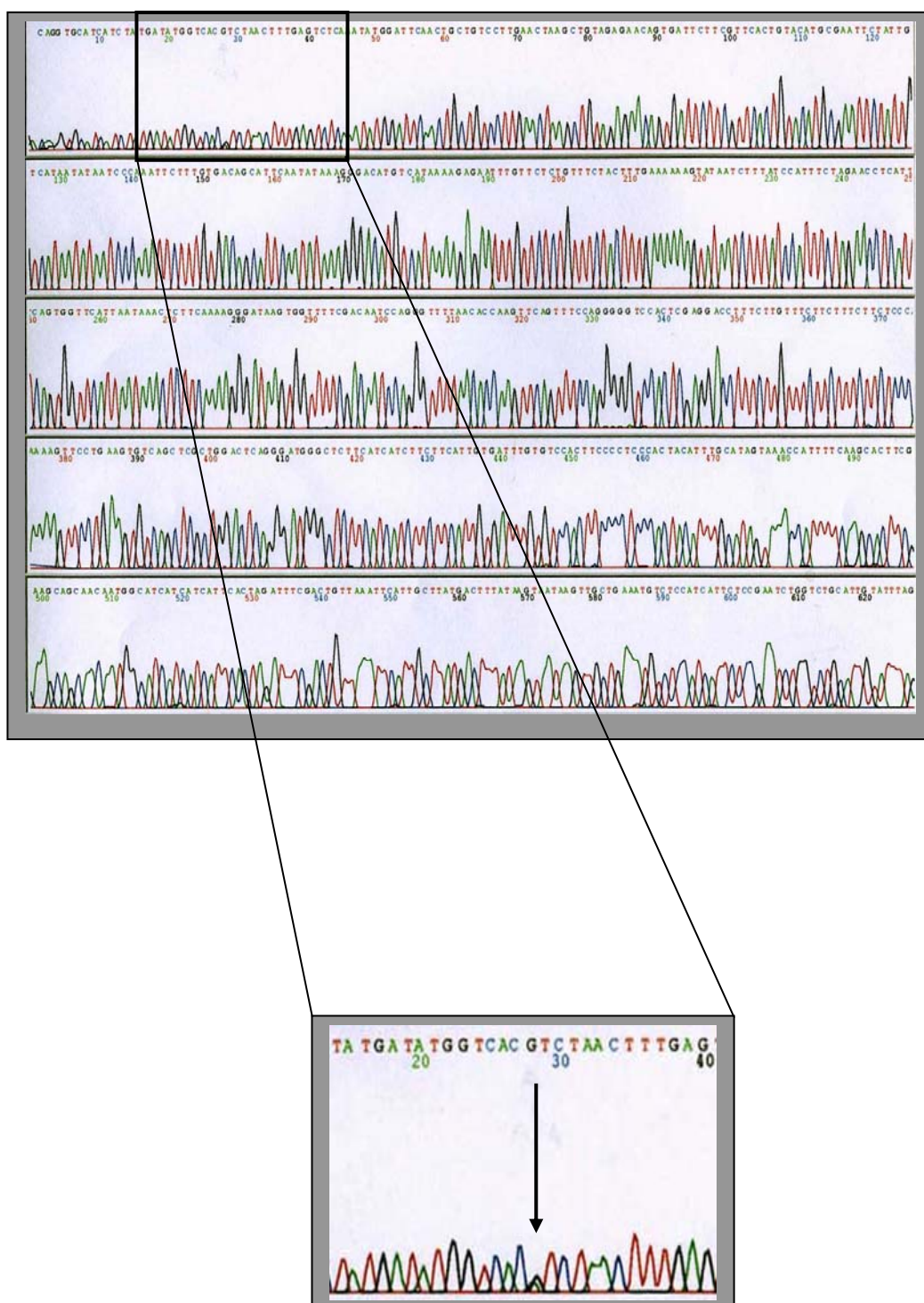


Resultats

B.



C.



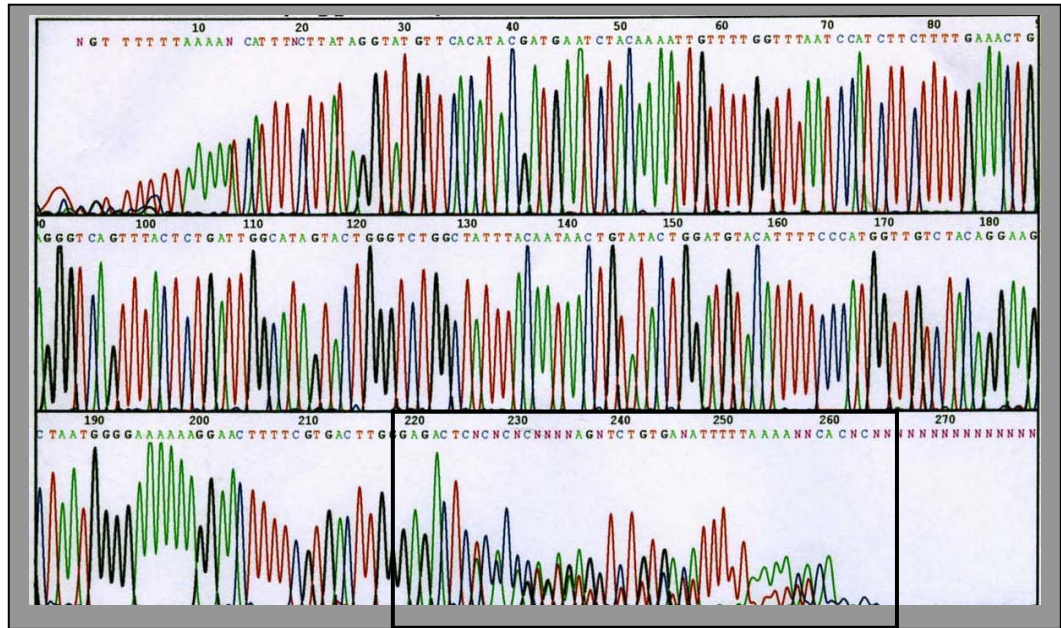
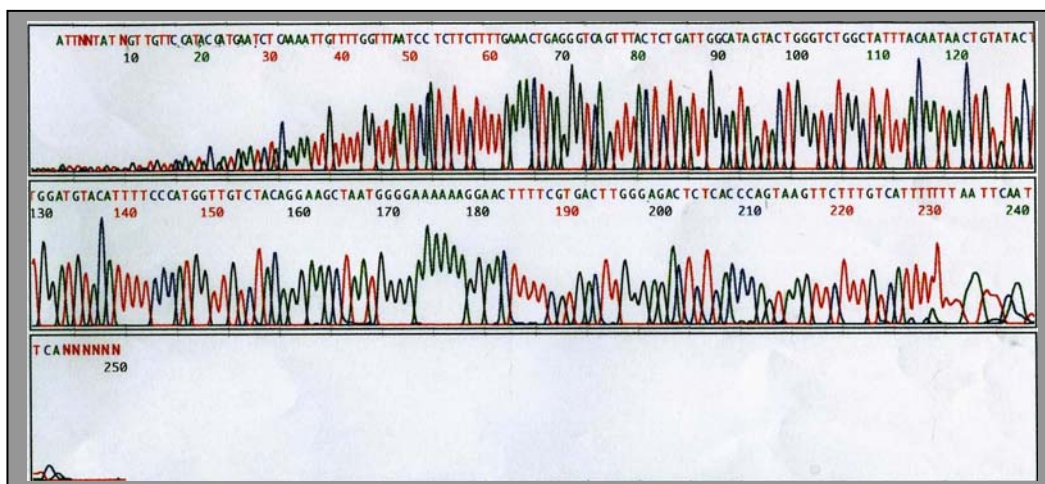
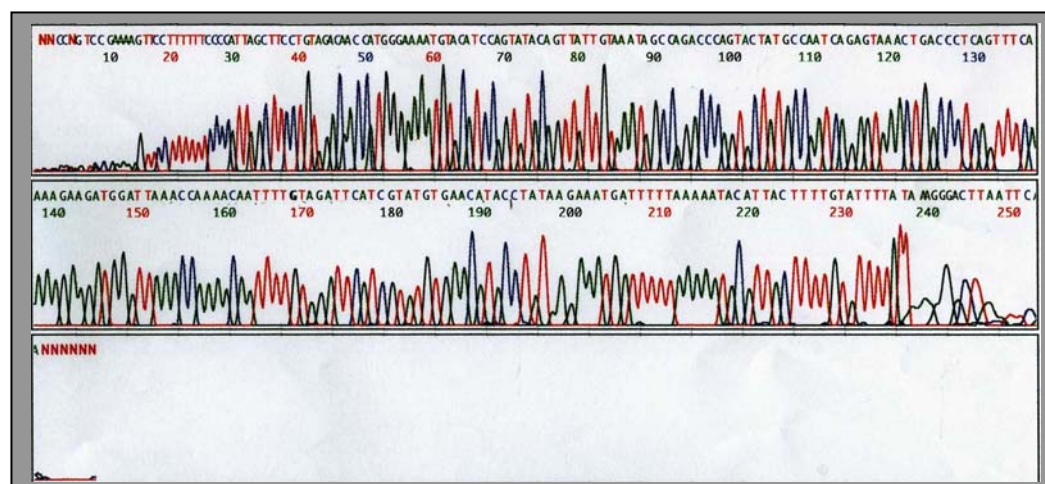


Figura 17. Cromatogrames de la seqüenciació *Forward* i *Reverse* de la mostra SA-1714.

Forward



Reverse



En el cromatograma de l'individu SA-1761, obtingut de la seqüenciació de l'exó 15 amb l'encebador *Reverse*, es va detectar una inserció en heterozigosi dels nucleòtids TCTT complementaris a la seqüència AAGA en sentit 5'-3' no descrita amb anterioritat (Figura 18; Taula 11). Es va clonar el fragment amplificat en un vector per a aïllar ambdós al·lels i poder analitzar les seqüències per separat (Figura 19). Es va confirmar la inserció dels nucleòtids AAGA que provoca un *stop* prematur en el codó 824. No va ser possible concretar si el lloc d'inserció es troba entre els nucleòtids 2336 i 2337, o bé entre els nucleòtids 2340 i 2341. L'estudi familiar es va realitzar mitjançant l'anàlisi del patró d'heterodúplex (Figura 20) i comprovació per SSCP (Figura 10).

Figura 18. Cromatograma obtingut de la seqüenciació *Reverse* de l'exó 15 de l'individu SA-1761. S'ha ampliat la regió corresponent a la inserció dels nucleòtids TCTT (3'-5') i es detalla l'al·lel normal en negre i l'al·lel mutat en vermell.

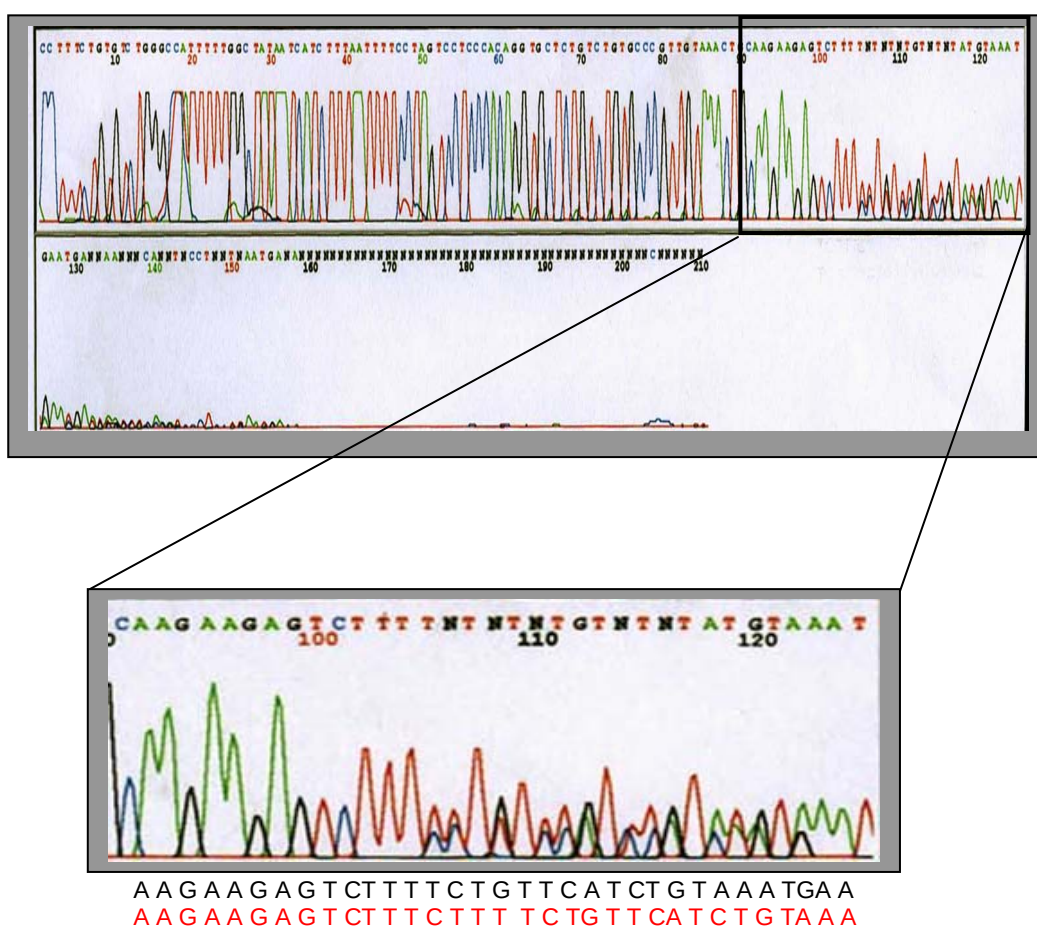
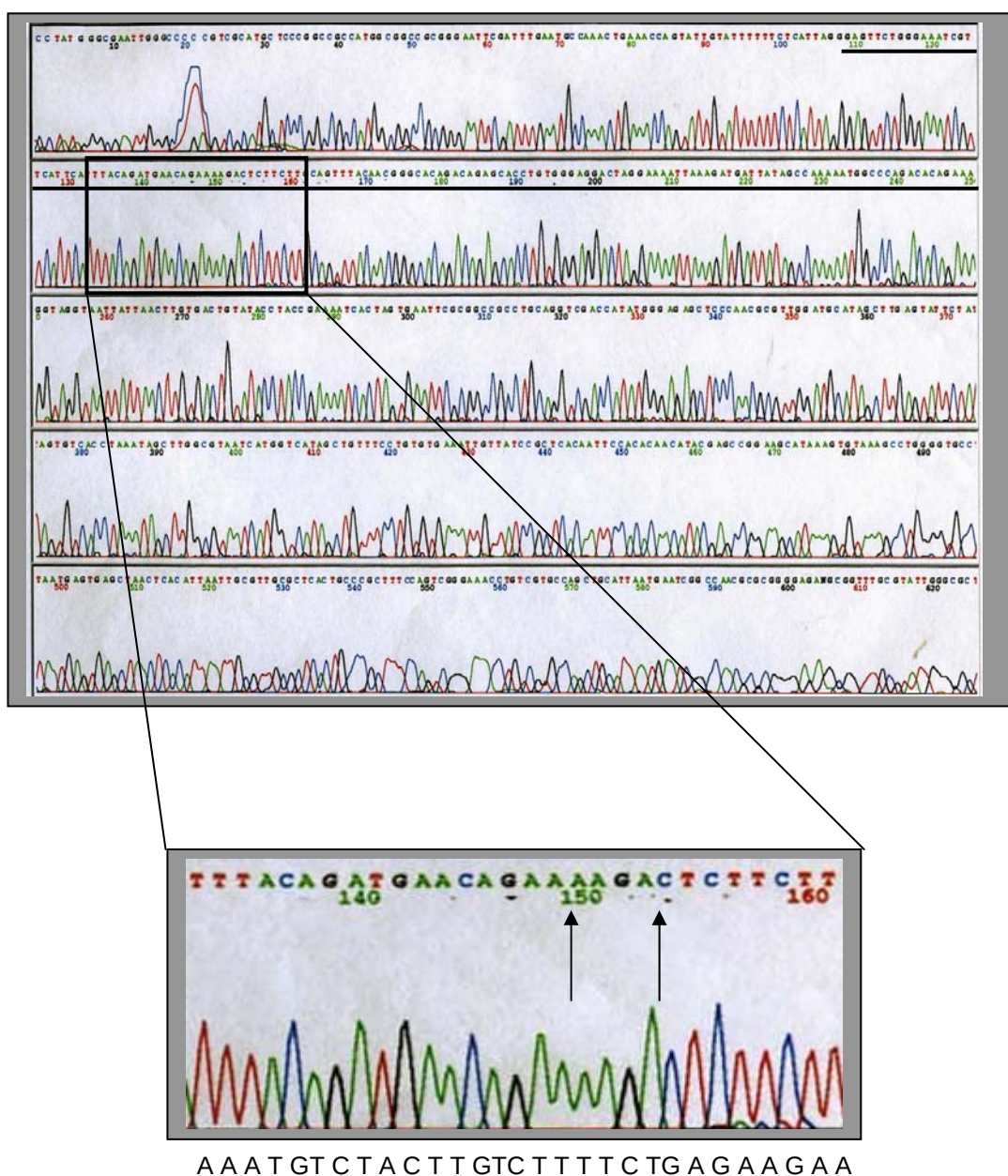


Figura 19. Cromatogrames de la seqüenciació de l'exó 15 (subratllat) de l'al·lel normal (A) i l'al·lel mutat (B) a la mostra SA-1761, a partir del vector pGEM-T emprant l'encebador universal M13 *Forward*. En ambdós cromatogrames s'ha ampliat la regió d'interès i s'especifica la seqüència complementària (3'-5'). S'indica amb fletxes els dos possibles punts d'inserció en l'al·lel normal, i en l'al·lel mutat se subratllen les dues possibles insercions dels nucleòtids AAGA.

A. Al·lel normal



B. Al·lel mutat

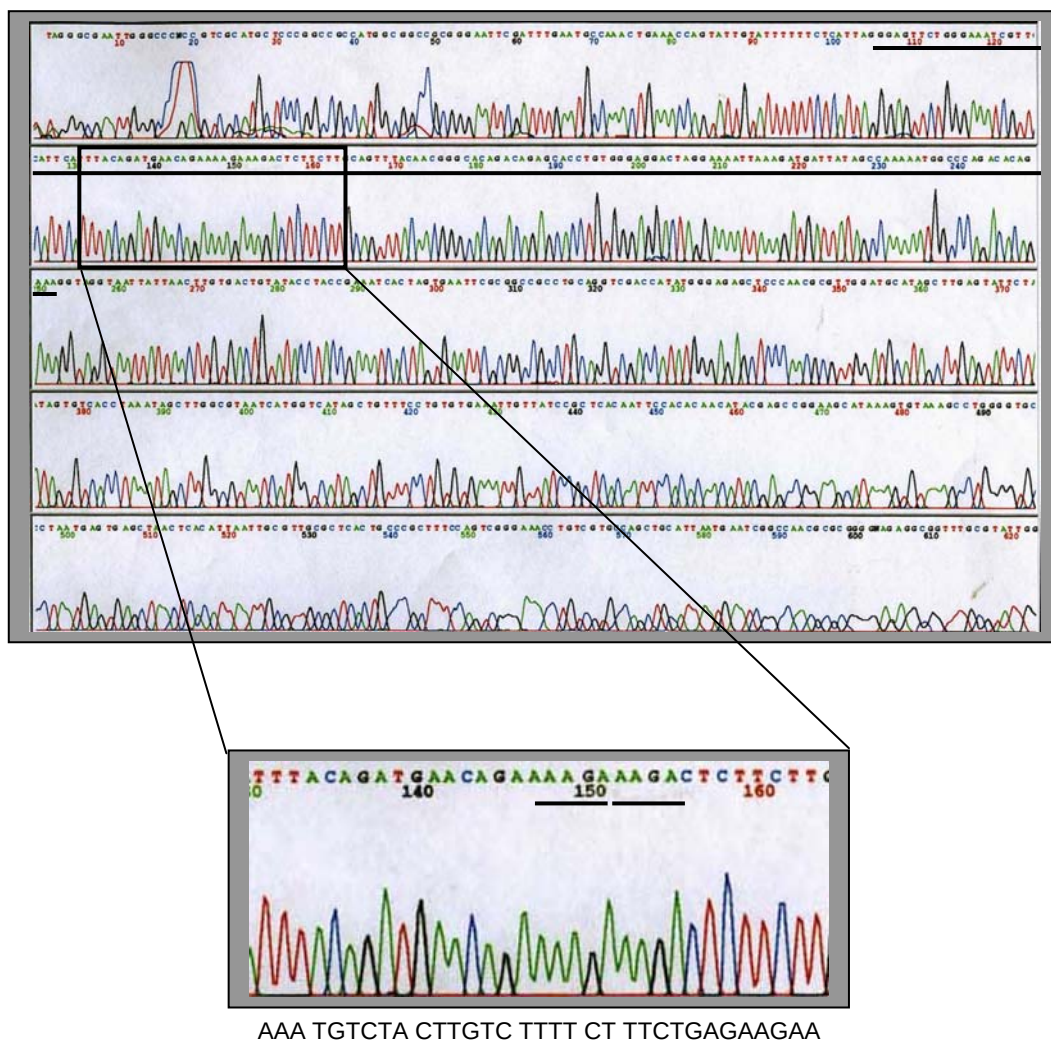
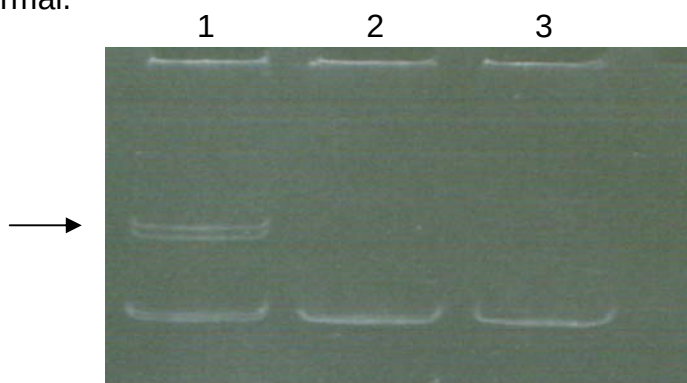


Figura 20. Anàlisi del patró d'heterodúplex de l'exó 15 en un gel d'acrilamida-bisacrilamida 29:1 de la mostra SA-1761 (carril 1) i els seus pares (carrils 2 i 3). Amb una fletxa s'indica la presència de dues bandes addicionals en el pacient, corresponents a l'al·lel mutat, i a l'al·lel mutat-al·lel normal.



Taula 11. Mutacions trobades en el gen UBE3A en sis individus SA.

Pacient	Exó	Canvi en la seqüència*	Tipus de mutació	Conseqüència	Origen
SA-1201	16	2507_2510delAAGA ^A	<i>Frameshift</i>	Proteïna truncada	<i>De novo</i>
SA-1341	9	325A>T	<i>Nonsense</i>	K109X	Matern
SA-1344	9	325A>T	<i>Nonsense</i>	K109X	Matern
SA-1411	9	1516C>T ^B	<i>Missense</i>	R506C	Matern
SA-1711	11	1893_1894delTC	<i>Frameshift</i>	Proteïna truncada	<i>De novo</i>
SA-1761	15	InsAAGA ⁺	<i>Frameshift</i>	Proteïna truncada	<i>De novo</i>

* Nucleòtids i aminoàcids numerats segons el núm. d'accés al GenBank X98032

⁺ Canvi en la seqüència amb dos possibles punts d'inserció: 2336_2337insAAGA/2340_2341insAAGA

^A Descrita per Fang i col·l., (1999)

^B Descrita per Baumer i col·l., (1999)

3.3. Estudi del centre d'impressió en pacients SPW i SA

L'estudi del CI es va realitzar per *Southern blot*, per a detectar delecions del CI i analitzar l'origen familiar del cromosoma portador del DI, i per PCR quantitativa, que també permet detectar delecions del mateix. També es va seqüenciar el CI per a estudiar la presència de mutacions puntuals.

A la Taula 12 s'indiquen les tècniques emprades en l'estudi del CI dels sis pacients amb DI.

Taula 12. Estudis moleculars realitzats per a l'anàlisi del CI dels pacients amb DI. No Del CI: absència de delecio del CI; Del CI: delecio del CI; NI: no informatiu; Inf: informatiu.

Pacient	<i>Southern</i> quantitatiu	<i>Southern</i> origen	PCR quantitativa	Seqüenciació CI
SPW-851	No Del CI	NI	-	Normal
SPW-1401	Del CI	Inf	-	Normal
SA-1771	-	-	No Del CI	Normal
SA-1781	No Del CI	-	-	Normal
SA-1921	-	-	No Del CI	Normal
SA-2301	-	-	No Del CI	Normal

3.3.1. Tècnica *Southern blot*

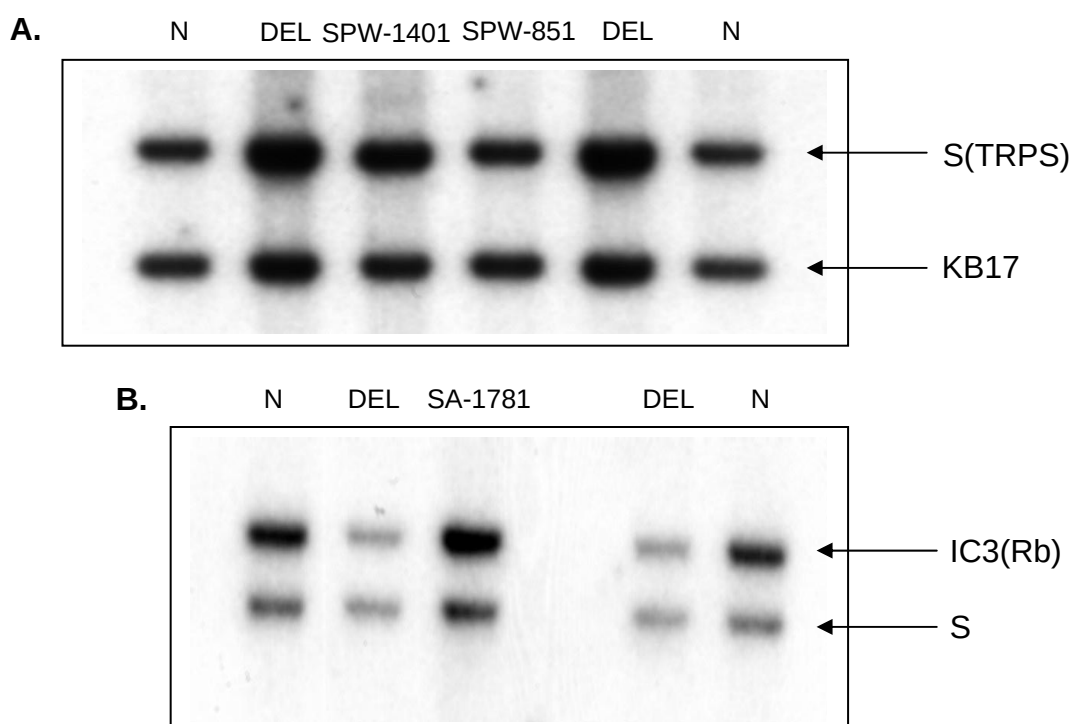
La tècnica de *Southern blot* es va realitzar per:

- L'anàlisi de delecions del CI en 3 individus:
 - 2 individus (SPW-851 i SPW-1401) amb patró de metilació característic de SPW
 - 1 individu (SA-1781) amb patró de metilació característic de SA

En estudis per FISH i d'anàlisi de microsatèl·lits, els tres individus van presentar absència de deleció de la regió 15q11-q13 i herència biparental del cromosoma 15, confirmant-se el diagnòstic de DI (Taula 8).

Els casos SPW-851 i SA-1781 van presentar el mateix patró de *Southern blot* que els controls normals, mentre que en el cas SPW-1401 es va detectar el mateix patró de *Southern blot* que el control amb deleció del CI (Figura 21)

Figura 21. Anàlisi de *Southern blot* dels casos SPW (A) i de l'individu SA 1781 (B). N: control normal; DEL: control de deleció del CI. S'indiquen les bandes corresponents a les sondes específiques i als estàndards interns (S).



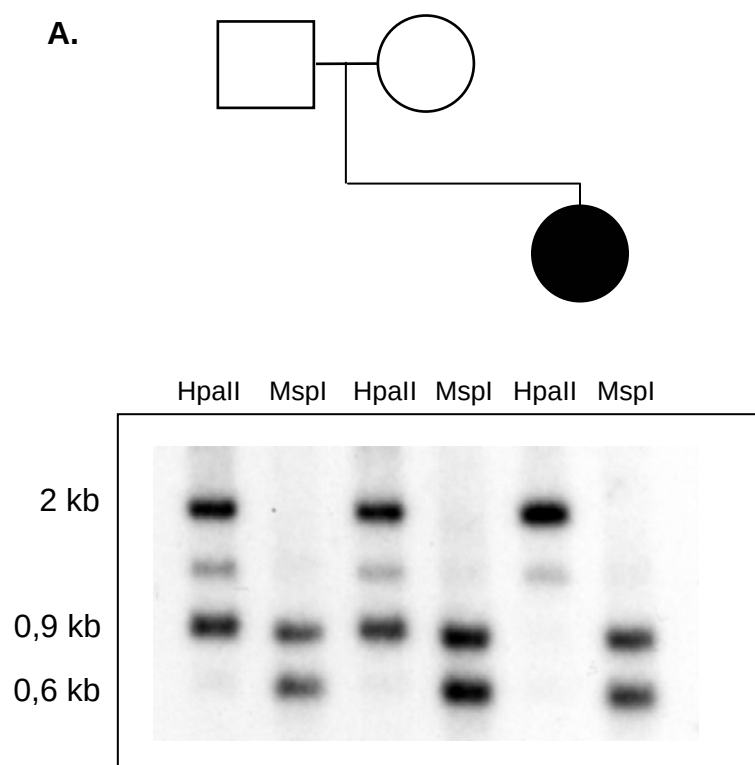
- L'estudi de l'origen familiar del cromosoma portador de la impressió incorrecta en els dos pacients SPW i en els seus pares.

En l'anàlisi de l'origen del cromosoma portador del DI, tant el pacient SPW-851 com els seus pares van ser heterozigots pel polimorfisme de restricció analitzat, pel que l'estudi va ser no informatiu (Figura 22). Els

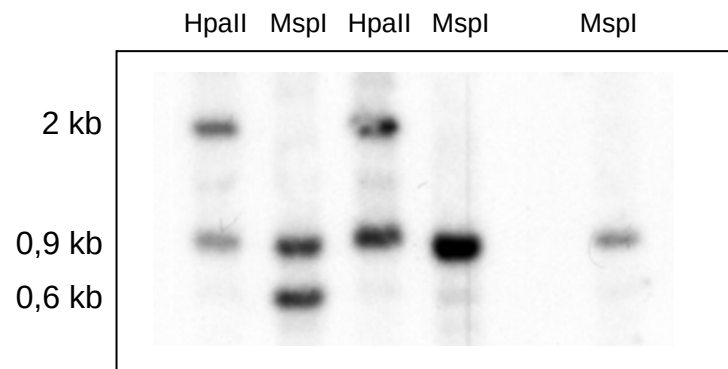
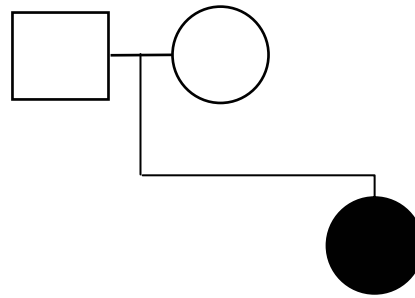
resultats d'aquest anàlisi, en el cas de la digestió amb BglII i HpaII (sensible a metilació), van confirmar el patró de metilació característic de SPW en el pacient, amb l'absència de l'al·lel no metilat i la presència de l'al·lel metilat.

La quantitat de DNA disponible del pacient SPW-1401 no va ser suficient per ambdues digestions en l'estudi familiar del cromosoma portador del DI, pel que només es va obtenir resultat de la digestió amb BglII i MspI en el pacient. En els pares es van dur a terme les digestions amb BglII i HpaII i amb BglII i MspI (Figura 22). La presència única d'una banda de 0,9 kb en el pacient és compatible amb una deleció del CI en el cromosoma patern. Aquesta anàlisi demostra que el pare no és portador de la deleció del CI detectada en el fill atès que presenta les bandes corresponents a l'al·lel patern (no metilat) i a l'al·lel matern (metilat) en la digestió amb BglII i HpaII.

Figura 22. Estudi de l'origen del cromosoma portador del DI per *Southern blot* de les famílies SPW-850 (A) i SPW-1400 (B) emprant els enzims de restricció BglII i MspI/BglII i HpaII.



B.



3.3.2. Tècnica PCR quantitativa

L'estudi de possibles delecions del CI es va realitzar per PCR quantitativa en tres individus (Taula 12; pàgina 80):

- 2 individus SA (SA-1771 i SA-1921) amb DI en mosaic
- 1 individu SA (SA-2301) amb DI

El nombre de còpies de les regions crítiques del CI va ser equivalent al nombre de còpies de les regions control en els tres pacients estudiats així com en els controls normals, fet que indica absència de delecio en el CI. En els controls de delecio es va obtenir una relacio aproximada de 0,5. Els resultats d'aquesta analisi s'especifiquen a les Taules 13 a 16.

Taula 13. Mitjanes i desviacions estàndards en l'anàlisi de deleccions del CI per PCR quantitativa del pacient SA-1771. C del 15q11-q13: control amb deleció de la regió 15q11-q13; C del CI: control amb deleció del CI; C Normal: control normal; RB 7: intró 7 del gen retinoblastoma.

Regió	Mostra			
	C del 15q11-q13	C del CI	C Normal	SA-1771
AS-SRO1	32,55(±1,15)	36,11(±0,044)	44,96(±0,074)	82,1(±1,069)
AS-SRO2	36,08(±1,838)	40,13(±2,54)	40,18(±0,057)	87,08(±6,793)
PWS-SRO1	31,6(±3,136)	36,44(±1,15)	41,6(±2,02)	83,21(±1,245)
RB 7	64,24(±0,073)	87,12(±12,5)	36,07(±0,094)	83,29(±2,764)

Taula 14. Quantitat de DNA de les regions crítiques del CI en relació a la quantitat de DNA de la regió control en el pacient SA-1771.

Regió	Raó ^a			
	C del 15q11-q13	C del CI	C Normal	SA 1771
AS-SRO1	0,50	0,41	1,2	0,98
AS-SRO2	0,56	0,46	1,11	1,04
PWS-SRO1	0,49	0,41	1,15	0,99

^aRelació entre el nombre de còpies de diferents regions del CI respecte al nombre de còpies de l'intró 7 del gen Retinoblastoma.

Taula 15. Mitjanes i desviacions estàndards en l'anàlisi de deleccions del CI per PCR quantitativa dels pacients SA-1921 i SA-2301. C del CI: control amb deleció del CI; C Normal: control normal; RB 18: exó 18 del gen retinoblastoma.

Regió	Mostra			
	C del CI	C Normal	SA-1921	SA-2301
AS-SRO1	34,8(±1,38)	69,88(±7,48)	80,61(±2,6)	64,09(±7,12)
AS-SRO2	35,33(±1,26)	-	82,74(±0,13)	70,41(±7)
PWS-SRO1	28,23(±1,65)	54,23(±1,42)	64,21(±3,7)	57,94(±1,09)
PWS-SRO2	29,56(±0,56)	-	65,12(±0,15)	58,13(±0,4)
RB 18	55,14(±1,09)	58,69(±1,8)	62,58(±2,3)	51,79(±0,6)

Taula 16. Quantitat de DNA de les regions crítiques del CI en relació a la quantitat de DNA de les regions control en els pacients SA-1921 i SA-2301.

Regió	Raó ^b			
	C del CI	C Normal	SA-1921	SA-2301
AS-SRO1	0,63	1,19	1,29	1,24
AS-SRO2	0,64	-	1,32	1,36
PWS-SRO1	0,51	0,92	1,03	1,12
PWS-SRO2	0,54	-	1,04	1,12

^bRelació entre el nombre de còpies de diferents regions del CI respecte al nombre de còpies de l'exó 18 del gen Retinoblastoma.

3.3.3. Seqüenciació del CI

L'anàlisi es va realitzar en tots els individus amb DI.

En cap cas es van detectar variacions anòmales en les seqüències de les regions crítiques analitzades.

Els polimorfismes existents descrits per Buiting i col·l., (2003) a les regions AS-SRO i PWS-SRO del CI, s'especifiquen a la taula 17, així com els resultats obtinguts en els sis pacients amb DI.

En els individus SA-1771 i SA-1781 es va analitzar la regió AS-SRO, i ambdós casos van ser homozigots per a totes les variants polimòrfiques descrites en aquesta regió.

La regió PWS-SRO es va analitzar en els dos casos SPW i varen ser homozigots per totes les variants polimòrfiques.

El cas SA-2301 va ser homozigot per a totes les variants polimòrfiques tant de la regió AS-SRO com PWS-SRO, mentre que el cas SA-1921, va presentar heterozigosi en tres de les vuit variants de la regió AS-SRO i en una variant de les 4 que han estat descrites en l'intró 1 del gen SNRPN, inclòs en la regió PWS-SRO.

Taula 17. Polimorfismes de les regions AS-SRO, exó 1 i intró 1 del gen SNRPN i genotip de les mostres analitzades. S'han ressaltat en verd les variants al·lèliques més freqüents (> 0,8).

Regió	Posició (pb)	Variant	Mostra					
			SPW 851	SPW 1401	SA 1771	SA 1781	SA 1921	SA 2301
AS-SRO	6152 ^a	A/G	-	-	A	A	A	A
	6219 ^a	G/A	-	-	G	G	G/A	G
	6284 ^a	A/C	-	-	A	A	A	A
	6311-6314 ^a	Ins/del TAT	-	-	Ins	Ins	Ins	Ins
	6464 ^a	C/G	-	-	C	C	C/G	C
	6525-6526 ^a	Ins/del T	-	-	Del	Del	Del	Del
	6558 ^a	G/T	-	-	G	G	G	G
PWS-SRO (Exó 1 SNRPN)	6830 ^a	C/T	-	-	C	C	C/T	C
	15006 ^b	G/C	G	G	-	-	G	G
	15082-15085 ^b	Ins/del GGAG	Ins	Ins	-	-	Ins	Ins
	15138 ^b	G/C	G	G	-	-	G	G
	15198 ^b	G/A	G	G	-	-	G	G
PWS-SRO (Intró 1 SNRPN)	15233 ^b	G/C	G	G	-	-	G	G
	16726 ^b	A/T ^d	A	T	-	-	A/T	A
	16792 ^b	Ins/del 14pb ^c	Ins	Ins	-	-	Ins	Ins
	16884 ^b	A/T	A	A	-	-	A	A
	16915 ^b	G/C	G	G	-	-	G	G

^a Núm. accés al GenBank AF148319

^b Núm. accés al GenBank AC009696

^c [GTGGGGCGAGAC]

^d Freqüències dels al·lèls A/T descrites per Buiting i col (2003): 0,42/0,58

4.1. Estudi del patró de metilació

L'estudi del patró de metilació de la regió 15q11-q13 permet el diagnòstic, tant de la SPW com de la SA, en aquells casos en què la causa genètica és una deleció de la regió 15q11-q13, una DUP del cromosoma 15 o un DI, però no permet diferenciar entre aquestes etiologies. Per a conèixer la causa genètica és necessari aplicar altres tècniques. La tècnica de FISH, emprant sondes específiques de la regió crítica, permet detectar si la causa del patró de metilació anòmal és una deleció. Amb la tècnica d'anàlisi de microsatèl·lits es poden diferenciar els casos de DUP dels d'herència biparental. Els casos d'herència biparental i patró de metilació anòmal corresponen a DI.

4.1.1. Valoració de la tècnica M-PCR

Per la posta a punt i validació de la tècnica M-PCR (condicions i encebadors descrits per Zeschnigk i col·l., 1997b) en el diagnòstic de les SPW i SA, s'analitzaren casos SPW i SA d'etiologia coneguda a través d'altres tècniques moleculars: *Southern blot*, FISH i anàlisi de microsatèl·lits. Els resultats obtinguts mitjançant *Southern blot* i M-PCR van ser coincidents.

Ambdues tècniques, *Southern blot* i M-PCR, són aplicables al diagnòstic de la SPW i SA així com al diagnòstic prenatal. No obstant, cal remarcar que es recomana l'elecció de la regió promotora del gen SNURF-SNRPN per l'estudi del patró de metilació, especialment en el diagnòstic prenatal. La regió promotora i l'exó 1 de la unitat de transcripció SNURF-SNRPN i el locus D15S63, anomenat PW71/PWCFOA, són dues regions amb dinucleòtids CpG diferencialment metilats segons l'origen parental. La metilació en la regió promotora del gen SNURF-SNRPN en l'al·lel matern és molt uniforme i s'estableix durant o després de la fecundació (El-Maarri i col·l., 2001). La freqüència de metilació a la regió PW71/PWCFOA és considerablement inferior i menys uniforme que la trobada en la regió promotora de SNURF-SNRPN. A més la regió PW71/PWCFOA es troba

hipometilada en teixits extraembrionaris i les delecions que inclouen aquesta regió han estat considerades polimorfismes neutres que podrien generar falsos positius (Kubota i col·l., 1996; Zeschnigk i col·l., 1997a; Buiting i col·l., 2000; Silverstein i col·l., 2001).

La tècnica M-PCR presenta certes avantatges en relació a la tècnica de *Southern blot*. La tècnica M-PCR requereix menys quantitat de DNA, és menys costosa, més ràpida i més específica i assegura millor la detecció d'ambdós al·lels, fet que permet detectar DI en mosaic d'acord amb Horsthemke i col·l., (2003a). En canvi amb el *Southern blot* poden aparèixer variants en la longitud dels fragments de restricció, o bé digestions parcials, que podrien comportar errors diagnòstics. També és possible detectar mosaics amb marcatge radioactiu, però hi ha una limitació amb la detecció quimioluminiscent en el cas que hi hagi un baix nombre de cèl·lules normals.

4.1.2. Resultats globals

En el nostre laboratori s'han estudiat 282 mostres de pacients amb sospita clínica de SPW i 299 mostres de pacients amb sospita clínica de SA, obtenint-se un patró de metilació característic de la SPW en 63 (22,3%) individus i un patró de metilació característic de la SA en 68 (22,7%) individus (Taula 8; pàgina 59).

Les freqüències de les diverses etiologies (deleció de la regió 15q11-q13, DUP i DI) s'han calculat tenint en compte únicament el total de casos amb patró de metilació característic de la síndrome (Taula 8; pàgina 59). En la SPW aquestes freqüències poden considerar-se definitives i estan d'acord amb les descrites a la literatura ja que un patró de metilació normal descarta la SPW (Cassidy i Schwartz, 1998; Cassidy i col·l., 2000). En la SA aquestes freqüències estarien sobrevalorades en no incloure els casos amb mutació en el gen UBE3A, ni aquells casos que mostren clínica consistent de SA amb etiologia desconeguda, dues etiologies en les que el patró de metilació és normal.

Del total de pacients SA amb patró de metilació normal (231) es van seleccionar 30 casos amb clínica consistent de SA per l'estudi del gen UBE3A. El fet de tenir un patró de metilació normal, descarta la deleció de la regió 15q11-q13, DUP o DI, i són pacients susceptibles a presentar una mutació en el gen UBE3A.

4.2. Estudi de mutacions en el gen UBE3A en pacients SA

Els 30 pacients seleccionats per l'estudi del gen UBE3A compleixen la majoria dels criteris clínics consistents de la SA. En aquesta sèrie estan inclosos dos casos familiars.

Es van analitzar els exons 8-16 del gen UBE3A, atès que són els constituents del ORF de la isoforma I de la proteïna (Yamamoto i col·l., 1997; Kishino i Wagstaff al 1998). Han estat descrites mutacions molt heterogènies en la majoria dels exons. No obstant el major nombre de mutacions descrites es localitzen a l'exó 9 a causa de la seva mida, ja que ocupa aproximadament el 50% del ORF, i no pas per tractar-se d'una possible *hot spot*. També és considerable el número de mutacions descrites als exons 15 i 16, els quals ocupen el 10% de la seqüència codificant del gen UBE3A (Kishino i col·l., 1997; Matsuura i col·l., 1997; Malzac i col·l., 1998; Fung i col·l., 1998; Tsai i col·l., 1998; Baumer i col·l., 1999; Fang i col·l., 1999; Moncla i col·l., 1999b; Russo i col·l., 2000; Bercovich i Beaudet 2003; Molfetta i col·l., 2004; Rapakko i col·l., 2004). Aquests exons codifiquen l'extrem carboxi-terminal de la proteïna i a la part final de l'anomenat domini *hect*, important per a la seva activitat E3 *ubiquitin-protein* lligasa (Huibregtse i col·l., 1995; Scheffner i col·l., 1995; Huang i col·l., 1999; Salvat i col·l., 2004; Cooper i col·l., 2004). No es va considerar necessari incloure l'exó 7 en l'estudi, així com els exons alternatius 5'-UTR, ja que no n'hi ha mutacions descrites (Malzac i col·l., 1998; Fang i col·l., 1999). A més, l'exó 7 tan sols aporta els seus dos últims nucleòtids (AT) al codó d'inici de traducció (AUG), quan aquest

realitza l'*splicing* amb l'exó 8 (Yamamoto i col·l., 1997; Kishino i Wagstaff 1998).

4.2.1. Consideracions de les tècniques emprades

Es va realitzar la posta a punt de la tècnica de SSCP i seqüenciació dels patrons anòmals de migració dels exons 15 i 16 amb les condicions descrites per Malzac i col·l., (1998). L'exó 15 es va amplificar amb dues reaccions de PCR, mentre que de l'exó 16 es va digerir el fragment amplificat amb *MspI*, obtenint-se fragments de longitud òptima per l'aplicació de la tècnica de SSCP (Sheffield i col·l., 1993). A més de la mida dels fragments, les condicions electroforètiques poden influir en la sensibilitat de la tècnica de SSCP per detectar canvis en la seqüència del DNA (Teschauer i col·l., 1996). Atesa l'àmplia varietat de mutacions en el gen UBE3A, es van triar les condicions electroforètiques millor reproduïbles i de més àmplia aplicabilitat.

Per l'anàlisi de la resta d'exons (8-14), es va optar per la seqüenciació directa de DNA en comptes de la tècnica de SSCP. L'ús de la tècnica de SSCP per l'anàlisi de l'exó 9 no és recomanable ja que caldria realitzar diferents reaccions de PCR per obtenir fragments de menys de 300 pb (Sheffield i col·l., 1993). Tenint en compte aquesta limitació es va considerar òptim realitzar l'anàlisi d'aquest exó, de més de 1000 pb, per seqüenciació directa dels fragments resultants de dues úniques amplificacions, emprant els encebadors (sense cues d'M13) i les condicions d'amplificació descrites per Fang i col·l., (1999). Pels exons 15 i 16, si bé s'havien posat a punt les condicions de la tècnica de SSCP i la seqüenciació posterior en els casos de patró de migració anòmals, es va decidir aplicar la seqüenciació directa perquè és una tècnica menys costosa. Cal remarcar que tots els encebadors emprats (Malzac i col·l., 1998; Fang i col·l., 1999) són intrònics fet imprescindible per l'anàlisi de les regions d'*splicing*, i en especial per l'estudi del gen UBE3A, per tal d'evitar l'amplificació dels pseudogens UBE3AP1 i UBE3AP2 d'elevada homologia amb el gen UBE3A (Kishino i Wagstaff 1998).

4.2.2. Valoració de les mutacions detectades

4.2.2.1. Exó 9

Es va detectar, per seqüenciació directa del DNA, una transició d'A a T en heterozigosi en dues germanes (SA-1341 i SA-1344). Aquesta transició, no descrita amb anterioritat, és una mutació sense sentit ja que canvia la seqüència AAG del codó 109 corresponent a l'aminoàcid lisina (Lys;K) pel triplet d'*stop* TAG (K109X) que causa la terminació prematura de la proteïna. La proteïna E6-AP codificada pel gen UBE3A està constituïda per 865 aminoàcids. Indubtablement la mutació 109A→T comporta l'absència de la seva funcionalitat en les regions del cervell i cerebel si és present en la còpia materna del gen.

Les dues germanes van ser diagnosticades clínicament a l'edat de 3 i 2 anys, respectivament. Ambdues presenten el 100% de les característiques clíniques consistents de la SA, així com microcefàlia i un patró de EEG característic. La menor ha desenvolupat crisis d'epilèpsia. A més ambdues presenten més del 50% de les característiques associades incloent hipopigmentació (Taula 1; pàgina 34). La nostra experiència ens ha portat a considerar que la valoració de la hipopigmentació ha estat subjectiva en molts casos. S'ha de considerar que presenten hipopigmentació aquells casos amb una coloració de la pell i dels ulls molt més clara respecta a la família. Aquestes dues germanes no han estat valorades pels nostres especialistes clínics i no ha estat possible confirmar si la hipopigmentació està realment present en elles ja que és una característica associada als casos de deleció de la regió 15q11-q13 (Moncla i col·l., 1999a; Saitoh i col·l., 2000; Fridman i col·l., 2003; Clayton-Smith i Laan, 2003).

L'estudi familiar es va realitzar per seqüenciació automàtica del DNA, detectant-se la mutació en la mare. El risc de recurrència en aquesta família és del 50%. Està pendent l'estudi de dues germanes de la mare.

Una altra mutació en l'exó 9 es va observar en l'individu SA-1411. Es va detectar una transició de C a T en heterozigosi per seqüenciació directa del DNA. Aquesta transició canvia la seqüència CGT del codó 506, corresponent a l'aminoàcid arginina (Arg; R), pel triplet TGT corresponent a l'aminoàcid cisteïna (Cys; C) (R506C). La possibilitat que aquesta variació en la seqüència del gen UBE3A correspongui a un polimorfisme s'ha descartat, ja que s'ha descrit *de novo* en un pacient amb clínica consistent de SA i amb afecte en un aminoàcid molt conservat de l'extrem 5' del domini *hect* (Baumer i col·l., 1999). Aquesta descripció ens va portar a concloure que aquesta mutació és la causant de la SA en el nostre pacient amb un fenotip clàssic.

El pacient va ser diagnosticat clínicament als 9 anys de retard mental i motor sever, absència de parla, atàxia, un fenotip conductual característic, microcefalia, epilèpsia, amb edat d'inici a l'any, aparença facial característica, sense prognatisme ni hipopigmentació, trastorn del son i atracció per l'aigua. El pacient presenta el 100% de les característiques clíniques consistents i la majoria de les característiques freqüents i associades, però no disposem de les dades de l'anàlisi del EEG del pacient, pel que no s'ha pogut incloure aquesta característica (Taula 1; pàgina 34).

L'estudi dels pares es va realitzar per seqüenciació automàtica del DNA, i es detectà la mutació en la mare. El risc de recurrència en aquesta família és del 50%.

4.2.2.2. Exó 11

En l'individu SA-1711 es va detectar una deleció de dos nucleòtids en l'exó 11 per seqüenciació directa del DNA amb l'encebador *Forward*. Consisteix en una deleció dels nucleòtids TC en posició 1893_1894, no descrita amb anterioritat. És una mutació *frameshift* que crea un *stop* prematur en el codó 646 i per tant, la terminació prematura de la proteïna de 865 aminoàcids.

El pacient ha estat diagnosticat clínicament a l'edat de 3 anys i 8 mesos de retard mental i motor sever, marxa atàxica i conducta típica. També presentava microcefàlia, un EEG característic, crisis d'epilèpsia i més del 50% de les característiques associades incloent-hi la hipopigmentació. Atès que aquest pacient no ha estat avaluat pels nostres especialistes clínics, i tal i com s'ha discutit en els dos casos anteriors, no s'ha pogut confirmar la hipopigmentació (Taula 1; pàgina 35).

L'estudi familiar per seqüenciació automàtica del DNA va confirmar que aquesta mutació ha estat *de novo*. Tenint en compte la possibilitat d'un mosaïcisme germinal en la mare (Malzac i col·l., 1998; Stalker i col·l., 1998b; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan 2003), es va realitzar un diagnòstic prenatal d'una mostra d'amniòcits d'un embaràs posterior, i obtingué un cromatograma normal.

4.2.2.3. Exó 15

En l'individu SA-1761 es va detectar en heterozigosi una inserció/duplicació dels nucleòtids AAGA a l'exó 15. Aquesta mutació *frameshift*, no descrita amb anterioritat, es va detectar per seqüenciació directa del DNA amb l'encebador *Reverse*. No va ser possible obtenir un cromatograma òptim a partir de la seqüenciació del DNA genòmic amb l'encebador *Forward*. Per a poder concretar el punt d'inserció es va realitzar la clonació en un plasmidi del fragment amplificat, per tal de poder analitzar els dos al·lels per separat. La clonació va permetre comprovar la duplicació dels nucleòtids AAGA sospitada. Tot i amb això, no fou possible establir el punt exacte d'inserció, que quedà entre els nucleòtids 2336 i 2337, o bé entre els 2340 i 2341. La variació en la seqüència és la mateixa per ambdues delecions, i comporta la pèrdua de la pauta de lectura que crea un *stop* prematur en el codó 824.

Aquesta mutació es considera responsable de la clínica del pacient: nen diagnosticat a l'edat de 18 mesos per presentar retard mental sever, absència de parla, hiperactivitat i moviments mal coordinats dels braços, microcefalia lleu, patró de EEG característic i conducta típica de SA. Cal

fer esment que no presentava una aparença facial característica de la SA. A l'edat de 3 anys i 3 mesos el pacient no havia desenvolupat crisis d'epilèpsia. Tanmateix, l'absència de l'aparença facial típica en aquest cas podria deure's a la seva edat ja que es coneix que aquesta s'esdevé més evident a partir de l'adolescència (Clayton-Smith i Laan, 2003).

L'estudi familiar es va realitzar analitzant el patró d'heterodúplex en un gel d'acrilamida-bisacrilamida. Els resultats d'aquesta anàlisi varen confirmar que la mutació era *de novo*, atès que els pares van presentar una única banda i el pacient tres bandes, corresponents a l'al·lel normal, l'al·lel mutat i l'al·lel mutat-al·lel normal. Tal i com s'estableix en el consell genètic en els casos *de novo*, es va tenir en compte la possibilitat que la mare presenti la mutació en mosaic a la línia germinal, fet que estableix un risc de recurrència variable (0-50%) i permet oferir un diagnòstic prenatal per a posteriors embarassos (Malzac i col·l., 1998; Stalker i col·l., 1998b; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan 2003).

El fet de trobar-se una mutació en l'exó 15 va permetre comprovar que les condicions electroforètiques emprades en l'estudi d'aquest exó mitjançant SSCP eren les correctes per la detecció de petits canvis en el nombre de bases.

4.2.2.4. Exó 16

A l'individu SA-1201 es va detectar, en heterozigosi, la deleció dels nucleòtids AAGA a l'exó 16. Aquesta mutació *frameshift* crea un *stop* prematur en el codó 839. Aquesta mostra va ser analitzada per SSCP i posterior seqüenciació amb l'encebador *Forward*, validant les condicions emprades en l'electroforesi, si més no per a la detecció de petits canvis en el número de bases. Aquesta mutació va ser descrita inicialment per Fang i col·l., (1999) i ha estat novament trobada per diferents autors (Lossie i col·l., 2001; Rapakko i col·l., 2004). En tots els casos descrits la mutació ha estat *de novo*. El fet que aquesta mutació s'hagi descrit en diverses sèries de pacients suggereix que aquesta regió del gen UBE3A és més susceptible de presentar petites delecions (Rapakko i col·l., 2004). Aquest

canvi es troba al final de la seqüència de l'exó 16 pel que no va ser possible obtenir un cromatograma òptim amb l'encebador *Reverse* que permetés confirmar la mutació. La mutació crea una diana de restricció per l'enzim *Ddel* que provoca tres fragments de 276, 161 i 111, que corresponen a l'al·lel normal i l'al·lel mutat digerit, respectivament. La creació d'aquesta diana va ser l'estratègia emprada en l'estudi familiar. Es va realitzar amplificació de l'exó 16 de l'individu afecte i dels seus pares i es va digerir el fragment amplificat amb l'enzim *Ddel*. Els resultats obtinguts varen confirmar la presència de la mutació 2507_2510delAAGA en heterozigosi en el pacient i la seva absència en els pares. Tenint en compte totes les observacions, es va concloure que aquesta mutació era *de novo*. En el consell genètic, es va considerar la possibilitat que la mutació fos en mosaic a la línia germinal materna, i s'establí un risc de recurrència variable (0-50%) i s'oferí un diagnòstic prenatal per a posteriors embarassos (Malzac i col·l., 1998; Stalker i col·l., 1998b; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan 2003).

La pacient va ser diagnosticada clínicament a l'edat de 3 anys i 4 mesos per presentar el 100% de característiques clíniques consistents i microcefàlia. No havia desenvolupat convulsions i no presentava ni un patró característic en el EEG ni hipopigmentació (Taula 1; pàgina 34). Els casos SA deguts a mutacions en el gen *UBE3A* han estat associats a fenotips relativament severos en els que s'ha observat una major incidència de crisis d'epilèpsia que en els casos amb DUP o DI (Clayton-Smith i Laan, 2003). Tot i amb això l'edat d'aparició pot ser variable atès que l'epilèpsia és una característica multifactorial (Lossie i col·l., 2001). Basant-nos en les dades clíniques de què disposem, podríem suggerir que l'absència de crisis d'epilèpsia en la pacient podria associar-se al fet que aquesta hagués estat clínicament avaluada a l'edat de poc més de 3 anys.

4.2.3. Valoració global de la sèrie SA amb anàlisi del gen UBE3A

S'ha identificat una mutació en el gen UBE3A en 6 del casos, dada que representa el 6% i que ha estat calculat tenint en compte els 68 pacients en els que s'ha obtingut un patró de metilació característic de la SA (Taula 8; pàgina 59) i els 30 pacients inclosos per l'anàlisi del gen UBE3A. Aquesta freqüència és inferior al 10% descrit (Cassidy i Schwartz 1998; Cassidy i col·l., 2000; Clayton-Smith i Laan 2003).

Aquests 6 pacients corresponen a dos casos familiars i 4 casos esporàdics. Es consideren esporàdics quan existeix un únic individu afecte. Tenint en compte els 30 individus del grup UBE3A, s'ha identificat una mutació en el gen UBE3A en una de les dues famílies (2/4) i en el 15% (4/26) dels casos esporàdics. Aquests percentatges estan d'acord amb els de la literatura, considerant els rangs del 50-80% per casos familiars i del 5-55% per casos esporàdics. La variabilitat en el número de mutacions identificades en diferents sèries ve determinada pel número de casos estudiats i pels criteris clínics d'inclusió (Malzac i col·l., 1998; Fang i col·l., 1999; Baumer i col·l., 1999; Lossie i col·l., 2001; Rapakko i col·l., 2004).

Les mutacions en el gen UBE3A de la nostra sèrie afecten al domini *hect* de la proteïna ja sigui perquè generen una proteïna truncada o bé, en el cas de la mutació R506C, perquè afecten a un aminoàcid altament conservat. Es coneix que mutacions que impliquen a aquest domini alteren la proteïna E6AP impeding la unió d'ubiquitina o bé la seva transferència al substrat. Altres mutacions de tipus *missense*, ja siguin incloses o no en el domini *hect*, produeixen inestabilitat de la proteïna en la cèl·lula (Cooper i col·l., 2004; Salvat i col·l., 2004). Davant aquestes observacions podem concloure que en els 6 pacients SA amb mutació en el gen UBE3A la proteïna E6AP en regions del cervell i cerebel és no-funcional.

Els 6 pacients amb mutació i les seves característiques clíniques s'han agrupat a una nova taula (Taula 18; pàgina 97). La clínica d'aquests pacients tendeix a estar d'acord amb la descrita a la literatura. Els estudis de correlació fenotip-genotip, demostren que els casos SA deguts a mutacions en el gen UBE3A són més severes que les DUP o els DI, principalment per la major incidència de crisis d'epilèpsia i microcefàlia (Saitoh i col·l., 1997; Stalker i Williams 1998; Moncla i col·l., 1999; Ohta i col·l., 1999b; Gillesen-Kaesbach i col·l., 1999; Cassidy i col·l., 2000; Clayton-Smith i Laan, 2003).

Taula 18. Característiques clíniques dels pacients SA amb mutació en el gen UBE3A.

	Característiques clíniques	1201	1341	1344	1411	1711	1761
	Edat diagnòstic clínic (anys)	3	3	2	9	3	1.5
Consistents (100%)	Retard mental/motor sever	+	+	+	+	+	+
	Absència de parla	+	+	+	+	+/-	+
	Ataxia	+	+	+	+	+	+/-
	Conducta típica ⁺	+	+	+	+	+	+
Freqüents (>80%)	Microcefàlia	+	+	+	+	+	+
	Epilèpsia	-	-	+	+	+	-
	EEG característic	-	+	+	NA	+	+
Associades (20-80%)	Occipuci pla	-	+	+	+	+	-
	Protusió de la llengua	+	+	+	+	+	-
	Problemes alimentació a la infància	-	-	-	+	+	+
	Prognatisme	-	+	+	-	+	-
	Macrostomia	+	+	+	+	-	-
	Baveig freqüent	+	+	+	+	+	+
	Estrabisme	-	-	-	-	-	-
	Hipopigmentació	-	+	+	-	+	-
	Flexió dels braços durant deambulació	+	+	+	-	+	+
	Hipersensibilitat a la calor	NA	NA	NA	NA	+	NA
	Trastorn del son	+	+	-	+	-	+
	Atracció/fascinació per l'aigua	+	+	+	+	+	+

⁺somriure, conducta feliç, personalitat fàcilment excitable, conducta hipermotòrica
NA: no avaluat

Els 6 pacients presenten totes les característiques consistents, així com microcefàlia, baveig freqüent i atracció per l'aigua. Referent al desenvolupament de crisis d'epilèpsia, en tenim confirmació en 3 dels 6 casos amb mutació. En els 3 casos restants hem considerat que l'absència d'epilèpsia pot relacionar-se amb l'edat dels pacients ja que en casos deguts a mutació en UBE3A el desenvolupament de crisis d'epilèpsia pot ser més tardà (Lossie i col·l., 2001). Respecte a la

hipopigmentació, aquesta s'associa als casos de deleció de la regió 15q11-q13 per l'haploinsuficiència del gen OCA2/P (Moncla i col·l., 1999a; Saitoh i col·l., 2000; Fridman i col·l., 2003; Clayton-Smith i Laan, 2003). Considerem que aquesta característica hauria de ser revisada en els casos SA-1341, SA-1344 i SA-1711.

Tenint en compte les correlacions fenotip-genotip descrites a la literatura així com les nostres observacions, hem considerat com a clínica SA associada a mutacions en el gen UBE3A, aquella en la que el pacient presenti tots els criteris clínics consistents, a més a més de microcefàlia i un mínim del 40% de les característiques associades. És important disposar de totes les dades clíniques i realitzar un seguiment dels individus, per a poder confirmar aquesta tendència, així com tenir en compte l'elevada variabilitat inter-individual en el fenotip dels individus, que s'esdevé més evident en sèries curtes.

Malgrat que es consideri el gen UBE3A el responsable de la SA, encara es desconeix si el desenvolupament de la malaltia és conseqüència de la disfunció general en la via de degradació proteica depenent d'ubiquitina *per se* o de la no degradació d'alguna de les proteïnes diana d'E6AP. Existeix la hipòtesi de què la disfunció d'UBE3A/E6AP pugui estar implicada en anomalies en la formació dels circuits neuronals i de desenvolupament de sinapsis (Murphey i Godenschwege 2002; Hegde i DiAntonio 2002). A més la via de degradació proteica depenent d'ubiquitina està implicada en altres esdeveniments cel·lulars a part de la degradació de proteïnes marcades amb ubiquitina. Recentment ha estat descrit que la ubiquitinització pot estar implicada en la regulació de l'activitat proteica o fins i tot de l'expressió gènica (Weissman 2001; Hicke 2001). El coneixement de les proteïnes diana d'UBE3A/E6AP és encara pobre, de manera que encara no s'ha pogut relacionar aquestes proteïnes amb la patogènia neuronal de la SA. Anomalies en els gens que codifiquen aquestes proteïnes diana podrien ser responsables del desenvolupament de la SA i explicarien aquells casos que no presenten alteracions en el gen UBE3A però sí un fenotip molt consistent de la

síndrome. En el mateix context, mutacions en gens que codifiquen factors que influeixin en l'expressió del gen UBE3A, també poden donar una explicació en els casos d'etiologia desconeguda. Estudis molt recents en ratolí deficient per al gen MECP2 i en teixit neuronal humà d'individus amb Síndrome de Rett, Angelman i autisme, han posat de manifest nivells d'expressió molt baixos tant del gen UBE3A com del gen GABRB3 (Samaco i col·l., 2005). El gen MECP2 codifica una proteïna d'unió a illes CpG metilades. La unió d'aquest factor comporta el reclutament de deacetilases d'histones i metiltransferases provocant inactivació gènica. Aquest fet porta a pensar que alteracions en MECP2 podrien produir l'activació de SNURF-SNRPN i de l'*antisense* de UBE3A en l'al·lel matern en el cervell i per tant la no-expressió d'UBE3A. Recentment, Samaco i col·l. (2005) han demostrat que els patrons en la impressió de l'al·lel matern no canvien, ja que no s'observen canvis significatius en l'expressió de *SNURF-SNRPN* ni de l'*antisense* d'UBE3A, i així conclouen que l'efecte de la unió d'MECP2 al CI és més complexa que la simple repressió en *cis* d'aquests gens.

Els estudis de correlació fenotip-genotip associen una major severitat de la SA als casos de delecions, seguida de les mutacions en el gen UBE3A i els de causa desconeguda, i menys severitat associada als casos deguts a una DUP o un DI (Bürger i col·l., 1996; Cassidy i Schwartz 1998; Moncla i col·l., 1999; Cassidy i col·l., 2000; Lossie i col 2001; Clayton-Smith i Laan, 2003). Si considerem una clínica SA associada a mutacions en el gen UBE3A, aquella en la que el pacient presenti tots els criteris clínics consistents, a més a més de microcefàlia i un mínim del 40% dels criteris clínics associats, podríem extrapolar un fenotip similar als casos d'etiologia desconeguda. Aquestes característiques són presents únicament en 6 dels 24 individus amb absència de mutació de la nostra sèrie (Taula 1; pàgines 34 a 36). Si exclouem els 18 individus restants obtindríem un grup SA de 80 individus, i llavors la freqüència de delecions de la regió 15q11-q13 seria del 65%, la de DUP paterna seria del 7,5%, la de DI seria del 5%, la de mutació en el gen UBE3A seria del 7,5% i finalment un 7,5% dels casos serien d'etiologia desconeguda. Si bé

aquests percentatges s'aproximen als esperats, cal tenir en compte que les freqüències de delecions de la regió 15q11-q13, les de DUP paterna o les de DI poden estar lleugerament infravalorades ja que en 6 casos es va obtenir un patró de metilació característic però no fou possible confirmar-ne l'etiologia. D'altra banda, es considerarà necessari sotmetre aquests 18 individus a revisió clínica i a altres estudis genètics ja que la clínica presenta característiques comuns a altres anomalies genètiques, cromosòmiques i de simptomatologia complexa (Arn i col·l., 1998; Williams i col·l., 2001; Imessaoudene i col·l., 2001; Watson i col·l., 2001; Tao i col·l., 2004). Aquest és un fet que pot explicar l'elevat nombre de casos SA amb diagnòstic molecular normal i la variabilitat en les freqüències de les diferents etiologies existents entre diferents sèries de pacients.

4.3. Estudi del centre d'impressió en pacients SPW i SA amb defecte d'impressió

Es va realitzar l'estudi del CI en els 2 casos SPW i 4 SA que s'havien diagnosticat de DI per presentar un patró de metilació anòmal, mitjançant *Southern blot* i/o M-PCR, absència de delecio de la regió 15q11-q13 aplicant la tècnica de FISH, i herència biparental, per l'anàlisi de microsatèl·lits. En dos dels casos SA (SA-1771 i SA-1921) es va obtenir un patró de M-PCR compatible amb un possible DI en mosaic (Gillissen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupond i col·l., 1999; Molfetta i col·l., 2002; Horsthemke i col·l., 2003a; Buiting i col·l., 2003).

El consell genètic en els casos de DI depèn de l'existència de mutacions que afectin al CI. La majoria de casos tenen un risc de recurrència baix (<1%) ja que són causats per errors epigenètics. Però amb una freqüència aproximada al 15%, aquests són produïts per delecions en el CI, que majoritàriament són familiars i amb un risc de recurrència del 50% (Buiting i col·l., 2003). Per tant, en els casos de DI és imprescindible l'estudi del CI per a poder oferir un consell genètic acurat.

4.3.1. Tècniques moleculars aplicades a l'estudi del centre d'impressió

***Southern blot* i PCR quantitativa**

Per l'estudi de delecions del CI es van emprar dues tècniques diferents que han estat vàlides per a identificar diferències en la quantitat de DNA entre regions específiques i regions control, i en les que és imprescindible l'ús de controls normals i controls amb deleció, ja sigui de la regió 15q11-q13 o del CI.

La tècnica de *Southern blot* requereix l'ús de sondes marcades radioactivament per tal d'obtenir la màxima sensibilitat encara que és una tècnica més costosa. La intensitat de les bandes resultants de *Southern blot* és variable a cada experiment depenent de múltiples factors com són, la concentració de la sonda, la quantitat de DNA de les mostres problema i control i la concentració de sals en els tampons emprats. Tot i mantenint aquestes condicions el més estables possible, la intensitat de les bandes pot variar a cada experiment en funció de l'eficiència d'hibridació amb cadascuna de les sondes, la control intern i l'específica. És necessari incloure mostres control normal i control de deleció per duplicat per confirmar el patró en cada experiment.

La interpretació dels resultats de la PCR quantitativa és molt més directe. Una mostra amb absència de deleció presentarà la mateixa quantitat de DNA en la regió control i problema, mentre que una amb deleció del CI presentarà la meitat de DNA respecte la control. Tanmateix, la PCR quantitativa és molt sensible, ràpida i els factors que influencien en la reacció són controlables. Aquesta però, requereix l'ús d'un termociclador específic amb un sistema de programari acoblat.

Considerant ambdues metodologies òptimes per a l'estudi de delecions del CI, l'elecció de la tècnica a emprar dependrà de la infraestructura del laboratori.

Seqüenciació del CI

Es va realitzar la seqüenciació automàtica de l'intró 1 i de l'exó 1 del gen SNRPN, inclosos en la regió crítica *PWS-SRO* del CI, en els dos casos SPW, i la seqüenciació automàtica de la regió crítica *AS-SRO* del CI en els casos SA. La finalitat d'aquesta anàlisi és valorar la presència de mutacions puntuals en aquestes regions que puguin afectar la impressió de la regió 15q11-q13. Fins a l'actualitat no han estat descrites mutacions puntuals en el CI en sèries llargues de pacients SPW i SA amb DI, alguns dels quals comparteixen el mateix haplotip amb germans sans, fet que es considera error epigenètic. La seqüenciació del CI ha permès identificar diversos *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*) i en casos de no-delecció del CI, la presència en heterozigosi d'aquests *SNPs* confirmaria el resultat (Buiting i col·l., 2003).

Origen del cromosoma portador del DI

Es va estudiar l'origen, mitjançant *Southern blot*, en les mostres dels dos individus SPW i dels seus pares. Consisteix en combinar una anàlisi de *RFLP* amb un test de metilació (apartat 2.2.7.), per l'estudi d'un polimorfisme de restricció pels enzims HpaII i MspI que es troba en l'intró 1 del gen SNRPN (Saitoh i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998). En els casos que no presenten deleccions en el CI, els resultats d'aquesta anàlisi han permès conèixer que en la SPW, l'origen del cromosoma portador del DI és sempre el matern del pare, suggerint que aquests casos SPW han estat conseqüència de la incapacitat d'esborrar la impressió materna a la línia germinal.

En els casos SA, l'origen pot ser tant el patern com el matern de la mare, suggerint que a línia germinal femenina no s'ha pogut establir la impressió en el cromosoma patern (possiblement per manca del factor *trans*), o bé s'ha esborrat en el matern (Horsthemke i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Buiting i col·l., 2003). En el cas d'existir una delecció en el CI en un pacient SPW, la digestió amb HpaII (sensible a metilació) en el pare informa de si aquest és o no portador. Aquesta informació també es pot obtenir amb la tècnica de M-PCR.

4.3.2. Valoració dels resultats obtinguts en els pacients SPW

Dels 2 casos SPW estudiats, un es considera un error epigenètic, ja que no s'ha identificat cap mutació en el CI, i en l'altre s'ha identificat una deleció del CI.

En la mostra SPW-851, es va obtenir el mateix patró en el *Southern blot* que en el duplicat de les mostres control normal, fet que indica l'absència de deleció del CI (Figura 21; pàgina 81). La seqüenciació de l'intró 1 i de l'exó 1 del gen SNRPN inclosos en la regió *PWS-SRO* no va suggerir la presència de cap variació en la seqüència d'aquesta regió i no es va observar heterozigosi en cap dels *SNPs* de la regió (Taula 17; pàgina 86). Per altra banda, l'estudi del cromosoma portador del DI no va ser informatiu ja que la pacient i els seus progenitors varen ser heterozigots pel polimorfisme de restricció (Figura 22; pàgina 82).

L'absència de deleció del CI en aquesta pacient també s'ha confirmat per la presència d'heterozigosi pel polimorfisme de restricció. L'obtenció d'una seqüència normal del CI indica l'absència de mutacions puntuals en aquesta regió en el seu cromosoma patern, confirmant que la SPW ha estat conseqüència d'un error epigenètic. El risc de recurrència estimat en aquest cas és <1%.

La pacient va ser diagnosticada clínicament a l'edat de 2 anys de retard mental moderat, hipotonia, problemes d'alimentació, guany de pes ràpid després dels 12 mesos, peus i mans petites, aparença facial característica i l'absència d'hipopigmentació esperada en casos deguts a DI. Aquesta pacient no presentava hipogonadisme possiblement per la seva edat, ja que aquest tret és menys evident, sobretot en nenes, abans dels 13 anys (Gunay-Aygun i col·l., 2001) (Taula 2; pàgina 37).

En l'estudi de la mostra SPW-1401 mitjançant *Southern blot* es va obtenir un patró compatible amb la presència de deleció en el CI (Figura 21; pàgina 81). La intensitat de les bandes va ser la mateixa que el control

positiu. La seqüència de l'intró 1 i l'exó 1 del gen SNRPN va ser normal i no va presentar heterozigosi en cap dels *SNPs* de la regió (Taula 17; pàgina 86). Aquest resultat és l'esperat, en casos amb deleció del CI. Paral·lelament a l'anàlisi de deleció del CI es va realitzar l'estudi de l'origen del DI confirmant la deleció. En aquesta última anàlisi la quantitat de DNA disponible de la pacient no va ser suficient per realitzar ambdues digestions. El resultat va ser informatiu realitzant només la digestió única amb l'enzim *MspI* del DNA genòmic del pacient (Figura 22; pàgina 82). L'obtenció de la banda de 2 kb, corresponent a l'al·lel matern metilat en la digestió amb *HpaII* del DNA genòmic del pare, així com la heterozigositat obtinguda amb la digestió amb *MspI*, confirma que el pare té els dos al·lels del locus analitzat, i per tant, no és portador de la deleció observada en la filla. Les digestions del DNA genòmic de la mare confirmaren que aquesta és homozigota pel fragment de 0,9 kb, és a dir, als dos al·lels els hi manca la diana de restricció per *HpaII/MspI*. En la individua afecta es va obtenir una banda única de 0,9 kb amb la digestió amb *MspI*. Aquest resultat és l'esperat ja que aquesta és hemizigot, és a dir que el fragment de 0,9 kb observat correspon a l'al·lel matern. Així, varem concloure que aquesta pacient presenta una deleció del CI *de novo*. La majoria de casos amb DI deguts a delecions en el CI són familiars. Pel nostre coneixement només s'ha descrit un altre cas SPW amb deleció del CI *de novo* (Buiting i col·l., 1998). En els casos *de novo* no es pot descartar que el pare sigui portador de la deleció en línia germinal, tenint en compte que en les sèries SA s'han descrit casos de mosaïcisme germinal (Saitoh i col·l., 1996; Gilbert i col·l., 1997; Buiting i col·l., 1998; Buiting i col·l., 2003). En aquests casos el risc de recurrència estaria en el rang 0-50%, i s'ha de recomanar un diagnòstic prenatal per a posteriors embarassos.

La pacient va ser avaluada pels nostres especialistes a l'edat de 29 anys. Les característiques clíniques que suggerien SPW eren retard mental, hipotonia muscular, amenorrea i peus i mans petits. Es coneix però que no ha desenvolupat obesitat ni hiperfàgia i l'aparença física no és molt característica de la SPW (Taula 2; pàgina 37). Pel que fa al fenotip

conductual, la pacient ha desenvolupat certa hiperactivitat i agressivitat. A l'edat de 14 anys va ser diagnosticada de trastorn psiquiàtric i va ser internada en un centre, pel que hem considerat que l'absència d'hiperfàgia en el moment del diagnòstic és conseqüència del seu ingrés i d'haver estat sotmesa a rigorosos controls. Recentment ha estat descrita una possible vulnerabilitat psiquiàtrica en individus SPW joves-adults quan la causa és una DUP o un DI (Boer i col·l., 2002; Clarke i col·l., 2002; Vogels i col·l., 2004).

Encara que els nostres 2 casos de SPW difereixen en la causa del DI i en el fenotip no hi ha dades a la literatura per correlacionar aquestes diferències.

4.3.3. Valoració dels resultats obtinguts en els pacients SA

En els 4 casos SA amb DI s'ha considerat que en tots ells ha estat causat per un error epigenètic ja que no s'han identificat mutacions en el CI (Buiting i col·l., 2003).

En l'estudi del CI en la pacient SA-1781 mitjançant *Southern blot* es va obtenir un resultat compatible amb absència de deleció del CI, ja que va presentar el mateix patró de bandes que els controls normals (Figura 21; pàgina 81). L'absència de deleció del CI suggereix que l'error en la impressió genètica és degut a una epimutació, de manera que el risc de recurrència s'estima en aquests casos <1%. També es va realitzar la seqüenciació de la regió AS-SRO per a descartar mutacions puntuals en aquesta regió. El resultat d'aquest estudi no va suggerir cap canvi en la seqüència de la regió crítica i va presentar homozigosi per tots els SNPs més freqüents descrits a la regió (Taula 17; pàgina 86).

Aquesta pacient presenta retard mental sever, absència de parla, atàxia i fenotip conductual característic de la SA (Taula 1; pàgina 36). Atès que no ha estat avaluada pels nostres especialistes clínics, no ens consta si la pacient ha iniciat crisis d'epilèpsia, ni si presenta microcefàlia o millor

comunicació, de manera que no ha estat possible establir una correlació fenotip-genotip.

En el pacient SA-2301 l'estudi del CI es realitzà amb la tècnica de PCR quantitativa i s'observà absència de deleció de la regió AS-SRO (Taules 15 i 16; pàgines 84 i 85) suggerint que l'error en la impressió genètica és degut a una epimutació, de manera que el risc de recurrència s'estimà <1%. Es va realitzar la seqüenciació de la regió AS-SRO i de l'intró 1 i de l'exó 1 del gen SNRPN. El resultat de la seqüenciació automàtica no va suggerir la presència de mutacions puntuals en la regió (Taula 17; pàgina 86).

El pacient SA-2301 presenta un fenotip característic de la SA amb retard mental i motor sever, absència de parla, conducta típica, i va desenvolupar crisis d'epilèpsia a l'edat de 6 anys durant un període febril. En canvi no presenta atàxia, característica considerada consistent de la síndrome, ni microcefalia, i el patró de EEG és normal (Taula 1; pàgina 36). Aquests resultats estan d'acord amb els descrits, ja que els casos amb DI s'han associat a absència de microcefàlia i de crisis, o bé l'epilèpsia s'inicia en edats molt més avançades respecte als casos amb deleció de la regió 15q11-q13 (Saitoh i col·l., 1997; Ohta i col·l., 1999a; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan, 2003).

Dos pacients (SA-1771 i SA-1921) han mostrat un patró de M-PCR compatible amb un DI matern en mosaic (Figura 9; pàgina 60). La presència de la banda materna de menys intensitat que la dels controls normals ha estat associada a DI en mosaïcisme (Gillissen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupond i col·l., 1999; Molfetta i col·l., 2002; Horsthemke i col·l., 2003a; Buiting i col·l., 2003). Aquest fet suggereix que el DI ha estat postzigòtic, i per tant *de novo*. Aquests dos pacients van ser analitzats amb la tècnica de PCR quantitativa per estudiar delecions del CI. Els dos casos van presentar d'absència de deleció de la regió AS-SRO (Taules 13-16; pàgines 84 i 85).

Es va realitzar la seqüenciació de la regió *AS-SRO* en els dos casos. A més es va seqüenciar l'intró 1 i l'exó 1 del gen *SNRPN* en la mostra SA-1921. El resultat de la seqüenciació de la regió *AS-SRO* no va suggerir en cap cas la presència de mutacions puntuals en la regió. Alguns dels *SNPs* de la regió van resultar informatius en el cas SA-1921, ja que aquest individu presenta heterozigosi per tres dels polimorfismes descrits a la regió *AS-SRO*, i per un dels inclosos a l'intró 1 del gen *SNRPN* (Taula 17; pàgina 86). Aquestes observacions reafirmen l'absència de deleció de la regió. Tenint en compte tots els resultats es considera que el DI en els dos pacients és degut a un error epigenètic, i per tant, el risc de recurrència <1%.

Un dels pacients amb DI en mosaic (SA-1921) presenta retard mental i motor sever, marxa atàxica i és capaç de dir algunes paraules. Si bé presenta dèficit d'atenció la conducta és atípica ja que presenta un nivell de comunicació superior a l'esperat i és capaç de treballar en un taller. Pel que fa a les característiques freqüents, presenta microcefàlia i va desenvolupar convulsions a l'edat de 5 anys. L'aparença facial del pacient no és la típica de la SA ja que la macrostomia i prognatisme són molt lleus (Taula 1; pàgina 36). El pacient no té tots els criteris consistents, i en canvi sí que presenta microcefàlia i epilèpsia, pel que s'ha considerat un fenotip SA atípic no concordant amb els fenotips associats a DI (Saitoh i col·l., 1997; Ohta i col·l., 1999a; Moncla i col·l., 1999b; Clayton-Smith i Laan, 2003).

La pacient SA-1771 amb DI en mosaic, va ser referida a l'edat de 2 anys i 5 mesos per sospita clínica de SPW per hipotonia, poc guany de pes i problemes en l'alimentació i retard mental moderat. Als 3 anys i 4 mesos la pacient presentava una millora progressiva del desenvolupament psicomotor, una connexió adequada amb el medi, i era capaç d'entendre el que se li deia i de respondre ordres senzilles, malgrat que presentava un llenguatge limitat i bàsicament gestual. A l'edat de 4 anys la pacient no havia desenvolupat cap de les característiques clíniques associades a la SA (Taula 1; pàgina 36) i per tant es considera que presenta el fenotip

PWS-like associat a casos amb DI en mosaic (Gillesen-Kaesbach i col·l., 1999; Dupond i col·l., 1999; Molfetta i col·l., 2002; Horsthemke i col·l., 2003a; Buiting i col·l., 2003).

En l'estudi de Buiting i col·l., (2003), els autors estimen que el 27% de casos SA amb DI poden presentar-se en mosaic i estar associats a un ample rang de severitat clínica inclòs el fenotip *PWS-like* (Buiting i col·l., 2003). Les diferències observades en els fenotips dels 2 casos SA amb DI en mosaic es pot explicar pel grau de mosaïcisme de cada individu (Nazlican i col·l., 2004). Aquest paràmetre però, no és possible d'avaluar únicament comparant els patrons en la M-PCR.

Tenint en compte les dades de la literatura i les nostres observacions respecte la SA causada per un DI, considerem que la SA podria estar infravalorada degut a la presència de fenotips molt lleus i atípics que poden presentar els pacients amb DI en mosaic.

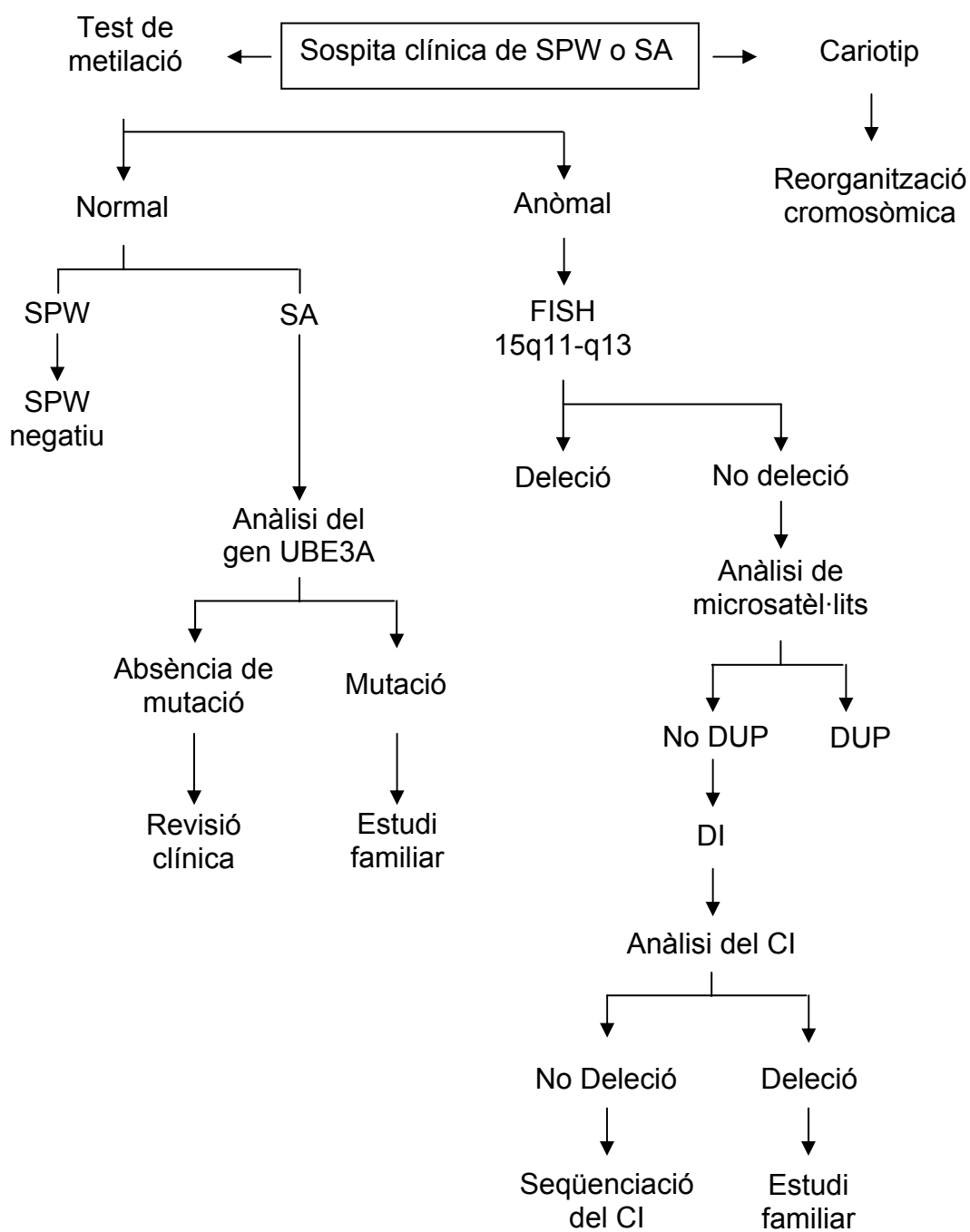
4.4. Algoritme diagnòstic de la SPW i la SA

Les correlacions fenotip-genotip permeten establir un valor pronòstic de la SPW i SA pel que és necessari l'estudi molecular que permeti valorar l'etiologia de la malaltia. El coneixement de la causa genètica és imprescindible per a poder oferir un consell genètic i un diagnòstic prenatal de cara a posteriors embarassos. La comunicació i el treball interdisciplinari entre els clínics i el laboratori permetrà aprofundir en el coneixement clínic-genètic de les síndromes.

És necessari establir protocols de diagnòstic genètic de fàcil desenvolupament i de cost-benefici òptim, ja que els criteris clínics que motiven un estudi són bastant amplis. Així, la hipotonia neonatal és un possible indicador de la SPW, mentre que les característiques clíniques de la SA són complexes i comuns a altres síndromes. Per tant, l'obtenció de resultats moleculars positius és inferior al 50% dels casos tal com hem observat a la nostra sèrie (Monaghan i col·l., 1997).

Previ al coneixement del gen causant de la SA, l'*American Society of Human Genetics* (ASHG), conjuntament amb l'*American College of Medical Genetics*, van proposar les aproximacions convenientes pel diagnòstic de la SPW i la SA (ASHG/ACMG, 1996). El coneixement actual d'ambdues síndromes ha permès completar l'algoritme diagnòstic considerant la freqüència de les diferents etiologies (Figura 23; pàgina 109). No obstant, cal remarcar que l'estudi del gen UBE3A no forma part de la rutina diagnòstica de la SA en molts laboratoris, i que l'estudi del CI només s'aplica en laboratoris de recerca.

Figura 23. Algoritme diagnòstic de les SPW i SA.



1. L'estudi del patró de metilació en pacients amb sospita clínica de les Síndromes de Prader-Willi i d'Angelman mitjançant la tècnica M-PCR ha permès optimitzar el protocol diagnòstic de les síndromes i incorporar-lo a la rutina clínica.

2. L'anàlisi del gen UBE3A mitjançant les tècniques de seqüenciació i de SSCP i posterior seqüenciació, ha permès:

2.1. Identificar cinc mutacions en pacients SA amb patró de metilació normal:

- K109X en dues germanes i la seva mare no descrita amb anterioritat.
- R506C en un pacient i en la seva mare.
- La deleció 1893_1894delTC *de novo* que crea un *stop* prematur en el codó 646 no descrita amb anterioritat.
- La inserció/duplicació 2336_2337insAAGA/2340_2341insAAGA *de novo* que crea un *stop* prematur en el codó 824 no descrita anteriorment.
- La deleció 2507_2510delAAGA *de novo* que crea un *stop* prematur en el codó 839.

2.2. Determinar que la freqüència de casos SA causats per mutacions és del 6%. Aquest percentatge és inferior al 10% descrit a la literatura i es considera que és degut a la inclusió de pacients amb altres malalties genètiques amb característiques clíniques comunes a la SA.

2.3. Recomanar la tècnica de seqüenciació del gen UBE3A degut a la heterogeneïtat de les mutacions identificades i per assegurar la detecció de canvis en un únic nucleòtid.

3. L'estudi del centre regulador de la impressió de la regió 15q11-q13 ha permès identificar una deleció *de novo* en el centre d'impressió en un pacient SPW. En l'altre pacient SPW i en els pacients SA s'ha descartat la presència de deleció i de mutacions puntuals pel que el defecte d'impressió ha estat causat per un error epigenètic. La freqüència de defecte d'impressió en la Síndrome d'Angelman i de Prader-Willi és del 6% i 3%, respectivament d'acord amb la literatura.

4. El diagnòstic genètic dels sis pacients SA amb mutació en el gen UBE3A i dels sis pacients amb defecte d'impressió, ha permès l'assessorament genètic als familiars de risc i oferir un diagnòstic prenatal.

5. Les correlacions fenotip-genotip han estat:

5.1. Pacients Síndrome d'Angelman amb mutació en el gen UBE3A presenten totes les característiques consistentes i microcefàlia. Considerem aquest fenotip un bon marcador de la síndrome causada per mutació.

5.2. Els pacients Síndrome d'Angelman amb defecte d'impressió presenten un fenotip d'expressivitat variable que inclou el característic de la síndrome i el fenotip *PWS-like* associat a pacients amb mosaïcisme.

5.3. El fenotip de la Síndrome de Prader-Willi associat a defecte d'impressió és similar al característic de la resta d'etiologies però els pacients no presenten hipopigmentació i poden manifestar-se trastorns psiquiàtrics en joves i adults.

A

Aapola U, Liiv I, Peterson P. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* (2002) 30(16):3602-8.

Akefeldt A, Tornhage CJ, Gillberg C. A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a healthy baby girl. *Dev Med Child Neurol* (1999) 41(11):789-90.

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* (1997) 17:75-78.

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* (1999) 65:370-386.

Angelman H. "Puppet children". A report of three cases. *Dev Med Child Neurol* (1965) 7:681-688.

Arn PH, Williams CA, Zori RT, Driscoll DJ, Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in a patient with phenotypic finding of Angelman syndrome. *Am J Med Genet* (1998) 77:198-200.

American Society of Human Genetics (ASHG)/American College of Medical Genetics (ACMG) Report. Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: report of the ASHC/ACMG test and technology transfer committee. *Am J Hum Genet* (1996) 58:1085-1088.

B

Battaglia A and Gurrieri F. Case of apparent Gurrieri syndrome showing molecular findings of Angelman syndrome. *Am J Med Genet* (1999) 82:100.

Baumer A, Balmer D, Schinzel A. Screening for UBE3A gene mutations in a group of Angelman syndrome patients selected according to non-stringent clinical criteria. *Hum Genet* (1999) 105:598-602.

Bercovich D, Beaudet AL. Denaturing high-performance liquid chromatography for the detection of mutations and polymorphisms in UBE3A. *Genet Test* (2003) 7(3):189-94.

Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI. De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* (2000) 25:74-78.

Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalande M, Muscatelli F. The human MAGEL2 gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* (1999) 8(13):2497-505.

Boer H, Holland A, Whittington J, Butler J, Webb T, Clarke D. Psychotic illness in people with Prader-Willi syndrome due to chromosome 15 maternal uniparental disomy. *Lancet* (2002) 359:135-136.

Brockmann K, Bohm R, Burger J. Exceptionally mild Angelman syndrome phenotype associated with an incomplete imprinting defect. *J Med Genet* (2002) 39(9):e51.

Buckley RH, Dinno N, Weber P. Angelman syndrome: are the estimates too low? *Am J Med Genet* (1998) 80(4):385-90.

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* (1995) 9(4):395-400.

Buiting K, Dittrich B, Ende S, Horsthemke B. Identification of novel exons 3' to the human SNRPN gene. *Genomics* (1997) 40(1):132-7.

Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J, Nothen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AM, Halley DJ, Schrandt-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls RD, Friend K, Horsthemke B, et al. Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counselling and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* (1998) 63:170-180.

Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B. A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* (1999) 105:665-666.

Buiting K, Farber C, Kroisel P, Wagner K, Brueton L, Robertson ME, Lich C, Horsthemke B. Imprinting center deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counselling. *Clin Genet* (2000) 58:284-290.

Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcolm S, Horsthemke B. Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* (2001) 68:1290-1294.

Buiting K, Gross S, Lich C, Gillesen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* (2003) 72:571-577.

Bürger J, Kunze J, Sperling K, Reis A. Phenotypic differences in Angelman syndrome patients: imprinting mutations show less frequently microcephaly and hypopigmentation than deletions. *Am J Med Genet* (1996) 66(2):221-226.

Bürger J, Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, Reis A. Different mechanisms and recurrence risk of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* (1997) 61:88-93.

Bürger J, Horn D, Tonnes H, Neitzel H, Reis A. Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* (2002) 111:233-237.

Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* (2004) 113(3 Pt 1):565-73.

C

Cassidy SB, Forsythe M, Heeger S, Nicholls RD, Schork N, Benn P, Schwartz S. Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* (1997) 68(4):433-40.

Cassidy SB, Schwartz S. Prader-Willi and Angelman syndromes. Disorders of genomic imprinting. *Medicine* (1998) 77:140-151.

Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *A J Med Genet* (2000) 97(2):136-146.

Cavaillé J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Nat Acad Sci* (2000) 97(26):14311-14316.

Chamberlain SJ, Brannan CI. The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* (2001) 73:316-322.

Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* (1999) 8(6):1025-1037.

Clarke DJ, Boer H, Whittington J, Holland A, Butler J, Webb T. Prader-Willi syndrome, compulsive and ritualistic behaviours: the first population-based survey. *Br J Psychiatry* (2002) 180:358-362.

Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* (2003) 40(2):87-95.

Cooper EM, Hudson AW, Amos J, Wagstaff J, Howley PM. Biochemical analysis of Angelman syndrome-associated mutations in the E3 ubiquitin ligase E6-associated protein. *J Biol Chem* (2004) 279(39):41208-17.

Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* (2002) 71:162-164.

D

DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* (2003) 72(1):156-60.

Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* (1996) 14:163-170.

Dupont JM, Le Tessier D, Rabineau D, Cuisset L, Vasseur C, Jeanpierre M, Delpech M, Pinton F, Ponsot G, Denavit MF. Unexpected Angelman syndrome molecular defect in a girl displaying clinical features of Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* (1999) 36(8): 652-654.

Dykens EM, Cassidy SB, King BH. Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion versus maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard* (1999) 104(1):67-77.

E

El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* (2001) 27:341-344.

F

Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham JM Jr, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL. The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* (1999) 8(1):129-135.

Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B. The chromosome 15 imprinting center (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum Mol Genet* (1999) 8(2):337-343.

Färber C, Gross S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B. Identification of a testis-specific gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* (2000) 65(2):174-83.

Fernandez-Novoa MC, Vargas MT, Vizmanos JL, Garnacho C, Martinez JJ, Sanz P, Lluch D. Prader-Willi syndrome large deletion on two brothers. Is this the exception that confirm the rule? *Rev Neurol* (2001) 32(10):935-8.

Fridman C, Hosomi N, Varela MC, Souza AH, Fukai K, Koiffmann CP. Angelman syndrome associated with oculocutaneous albinism due to an intragenic deletion of the P gene. *Am J Med Genet* (2003) 119A(2):180-3.

Fulmer-Smentek SB, Francke U. Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader-Willi deletion region. *Hum Mol Genet* (2001) 10(6):645-652.

Fung DC, Yu B, Cheong KF, Smith A, Trent RJ. UBE3A "mutations" in two unrelated and phenotypically different Angelman syndrome patients. *Hum Genet* (1998) 102:487-492.

G

Gérard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* (1999) 23(2):199-202.

Gilbert HL, Buxton JL, Chan CT, McKay T, Cottrell S, Ramsden S, Winter RM, Pembrey ME, Malcolm S. Counselling dilemmas associated with the molecular characterisation of two Angelman syndrome families. *J Med Genet* (1997) 34(8):651-5.

Gillissen-Kaesbach G, Robinson W, Lohmann D, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion patients with Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* (1995) 96(6):638-43.

Gillessen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B. A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* (1999) 7:638-644.

Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X, Zuffardi O. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet.* (2003) 12(8):849-58.

Glenn CC, Saitoh S, Jong MT, Filbrandt MM, Surti U, Driscoll DJ, Nicholls RD. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet* (1996) 58:335-346.

Glenn CC, Deng G, Michaelis RC, Tarleton J, Phelan MC, Surh L, Yang TP, Driscoll DJ. DNA methylation analysis with respect to prenatal diagnosis of the Angelman and Prader-Willi syndromes and imprinting. *Prenat Diagn* (2000) 20(4):300-6.

Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *The Lancet* (2003) 361:1975-1977.

Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD. An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:5616-5621.

Greally JM, Gray TA, Gabriel JM, Song L, Zemel S, Nicholls RD. Conserved characteristics of heterochromatin-forming DNA at the 15q11-q13 imprinting center. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96(25):1430-14435.

Gunay-Aygun M, Heeger S, Schwartz S, Cassidy SB. Delayed diagnosis in patients with Prader-Willi syndrome due to maternal uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* (1997) 71(1):106-10.

Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* (2001) 108(5):E92

H

Hegde AN, DiAntonio A. Ubiquitin and the synapse. *Nat Rev Neurosci* (2002) 3(11):854-61.

Heisler LK, Chu HM, Tecott LH. Epilepsy and obesity in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Ann N Y Acad Sci* (1998) 861:74-78.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(18):9821-6.

Herzing LB, Kim SJ, Cook EH Jr, Ledbetter DH. The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* (2001) 68:1501-1505.

Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) 2(3):195-201.

Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* (1993) 91:398-402.

Horsthemke B, Dittrich B, Buiting K. Imprinting mutations on human chromosome 15. *Hum Mutat* (1997) 10(5):329-37.

Horsthemke B, Lich C, Buiting K, Achmann R, Aulehla-Scholz C, Baumer A, Burger J, Dworniczak B, Glaser D, Holinski-Feder E, Janssen B, Kleinle S, Kochhan L, Krasemann E, Kraus C, Kroisel P, Plendl H, Purmann S, Sander G, Skladny H, Spitzer E, Thamm-Mucke B, Varon-Mateeva R, Weinhausel A, Weirich H. Problems in detecting mosaic DNA methylation in Angelman syndrome. *Eur J Hum Genet* (2003a) 11:913-915.

Horsthemke B, Nazlican H, Husing J, Klein-Hitpass L, Claussen U, Michel S, Lich C, Gillesen-Kaesbach G, Buiting K. Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet* (2003b) 12(20):2723-32.

Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* (1999) 286 (5443):1321-6.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* (1991) 10(13):4129-4135.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* (1993) 13(2):775-84.

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92(7):2563-2567.

I

Imessaoudene B, Bonnefont JP, Royer G, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Lyon G, Munnich A, Amiel J. MECP2 mutation in non-fatal, non-progressive encephalopathy in a male. *J Med Genet* (2001) 38(3):171-4.

J

Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F. The human necdin gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* (1997) 17:357-361.

Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. Structure of the highly conserved *HERC2* gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res* (2000a) 10(3):319-29.

Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* (2000b) 10(5):597-610.

Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD. A novel imprinted gene, encoding a ring zing-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* (1999) 8(5):783-793.

K

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* (1997) 15:70-73.

Kishino T and Wagstaff J. Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes. *Genomics* (1998) 47:101-107.

Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD, Cedar H. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* (1993) 364(6436):459-63.

Knoll JH, Cheng SD, Lalande M. Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet* (1994) 6(1):41-6.

Kobayashi M, Taniura H, Yoshikawa K. Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* (2002) 277(44):42128-35.

Kokkonen H, Leisti J. An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germ-line mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family. *Hum Genet* (2000) 107(1):83-5.

Kubota T, Aradhya S, Macha M, Smith AC, Surh LC, Satish J, Verp MS, Nee HL, Johnson A, Christian SL, Ledbetter DH. Analysis of parent of origin specific DNA methylation at SNRPN and PW71 in tissues: implication for prenatal diagnosis. *J Med Genet* (1996) 33(12):1011-4.

L

Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalande M. Regulation of the large (~1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* (2004) 32(11):3480-3492.

Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R. Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* (2000) 9(12):1813-9.

Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, Dong HJ, Chen P, Theriaque D, Hutson A, Nicholls RD, Zori RT, Williams CA, Driscoll DJ. Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* (2001) 38(12):834-45.

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC 3rd, Lobanenko VV. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99(10):6806-11.

M

MacDonald HR, Wevrick R. The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* (1997) 6(11):1873-1878.

Maher ER, Afnan M, Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod* (2003) 18(12):2508-2511.

Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JM, Kukolich M, Williams C, Pagon RA, Ramsdell LA, Kishino T, Wagstaff J. Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* (1998) 62:1353-1360.

Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* (1997) 15:74-77.

Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M. A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* (2001) 28(1):19-20.

Minassian BA, DeLorey TM, Olsen RW, Philippart M, Bronstein Y, Zhang Q, Guerrini R, Van Ness P, Livet MO, Delgado-Escueta AV. Angelman syndrome: correlations between epilepsy phenotypes and genotypes. *Ann Neurol* (1998) 43:485-93.

Molfetta GA, Felix TM, Riegel M, Ferraz VE, de Pina Neto JM. A further case of a Prader-Willi syndrome phenotype in a patient with Angelman syndrome molecular defect. *Arq Neuropsiquiatr* (2002) 60(4):1011-4.

Molfetta GA, Munoz MV, Santos AC, Silva WA, Wagstaff J, Pina-Neto JM. Discordant phenotypes in first cousins with UBE3A frameshift mutation. *Am J Med Genet* (2004) 127A:258-262.

Monaghan KG, Van Dyke DL, Feldman G, Wiktor A, Weiss L. Diagnostic testing: a cost analysis for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Am J Hum Genet* (1997) 60(1):244-7.

Moncla A, Malzac P, Voelckel MA, Auquier P, Girardot L, Mattei MG, Philip N, Mattei JF, Lalande M, Livet MO. Phenotype-genotype correlation in 20 deletion and 20 non-deletion Angelman syndrome patients. *Eur J Hum Genet* (1999a) 7:131-139.

Moncla A, Malzac P, Livet MO, Voelckel MA, Mancini J, Delaroziere JC, Philip N, Mattei JF. Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling. *J Med Genet* (1999b) 36(7):554-60.

Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* (1991) 7(2):45-9.

Murphey RK, Godenschwege TA. New roles for ubiquitin in the assembly and function of neuronal circuits. *Neuron* (2002) 36(1):5-8.

Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* (2003) 25(6):577-88.

Muscatelli F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H. Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* (2000) 9(20):3101-10.

N

Nakada Y, Taniura H, Uetsuki T, Inazawa J, Yoshikawa K. The human chromosomal gene for *necdin*, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region. *Gene* (1998) 213:65-72.

Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* (1999) 19(2):1182-1189.

Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillesen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B. Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* (2004) 13(21):2547-55.

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* (1998) 14(5):194-200.

Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2001) 2:153-75.

Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* (2004) 74:599-609.

O

Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD. Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* (1999a) 64:385-396.

Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD. Imprinting mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* (1999b) 64:397-413.

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Am J Hum Genet* (2003) 72:218-219.

P

Paldi A, Gyapay G, Jami J. Imprinted chromosomal regions of the human genome display sex-specific meiotic recombination frequencies. *Curr Biol* (1995) 5(9):1030-5.

Prader A, Labhart A, Willi H. Ein syndrom von adipositas, kleinwuchs, kriptochismus und oligophrenie nach myotonisiertem zustand im neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* (1956) 86: 1260-1261.

R

Rapakko K, Kokkonen H, Leisti J. UBE3A gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by conformation sensitive gel electrophoresis. *Am J Med Genet* (2004) 126A(3):248-52.

Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* (2001) 2(1):21-32.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* (2001) 293(5532):1089-93.

Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* (2001) 293(5532):1093-8.

Robinson WP, Lalande M. Sex-specific meiotic recombination in the Prader-Willi/Angelman syndrome imprinted region. *Hum Mol Genet* (1995) 4(5):801-6.

Robinson WP, Kuchinka BD, Bernasconi F, Petersen MB, Schulze A, Brondum-Nielsen K, Christian SL, Ledbetter DH, Schinzel AA, Horsthemke B, Schuffenhauer S, Michaelis RC, Langlois S, Hassold TJ. Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* (1998) 7(6):1011-9.

Robinson WP, Christian SL, Kuchinka BD, Penaherrera MS, Das S, Schuffenhauer S, Malcolm S, Schinzel AA, Hassold TJ, Ledbetter DH. Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin Genet* (2000) 57(5):349-58.

Rougeulle C, Glatt H, Lalande M. The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* (1997) 17:12-13.

Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalande M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* (1998) 17:15-16.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* (2000) 25(3):269-77.

Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* (2001) 10(23):2687-700.

Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* (2004) 114:553-561.

Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K. Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* (2005) 116:228-230.

Russo S, Cogliati F, Viri M, Cavalleri F, Selicorni A, Turolla L, Belli S, Romeo A, Larizza L. Novel mutations of ubiquitin protein ligase 3A gene in italian patients with Angelman syndrome. *Hum Mutat* (2000) 15(4):387.

S

Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, Konig R, Malcolm S, Horsthemke B, Nicholls RD. Minimal definition of the imprinting center and fixation of a chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:7811-7815.

Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, Conroy JM, Driscoll DJ, Gabriel JM, Gillessen-Kaesbach G, Glenn CC, Greenswag LR, Horsthemke B, Kondo I, Kuwajima K, Niikawa N, Rogan PK, Schwartz S, Seip J, Williams CA, Nicholls RD. Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* (1997) 68:195-206.

Saitoh S, Oiso N, Wada T, Narazaki O, Fukai K. Oculocutaneous albinism type 2 with a P gene missense mutation in a patient with Angelman syndrome. *J Med Genet* (2000) 37(5):392-4.

Saitoh S, Wada T. Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* (2000) 66(6):1958-62.

Salvat C, Wang G, Dastur A, Lyon N, Huibregtse JM. The -4 phenylalanine is required for substrate ubiquitination catalyzed by HECT ubiquitin ligases. *J Biol Chem* (2004) 279(18):18935-43.

Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* (2005) 14(4):483-92.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* (1992) 24:104-8.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* (1990) 63(6):1129-36.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* (1993) 75(3):495-505.

Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* (1995) 373(6509):81-3.

Schulze A, Hansen C, Baekgaard P, Blichfeldt S, Petersen MB, Tommerup N, Brondum-Nielsen K. Clinical features and molecular genetic analysis of a boy with Prader-Willi syndrome caused by an imprinting defect. *Acta Paediatr* (1997) 86(8):906-10.

Schulze A, Mogensen H, Hamborg-Petersen B, Græm N, Vesterby A, Østergaard JR, Brondum-Nielsen K. A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a girl with Angelman syndrome. First world conference of the International Angelman Syndrome Organization (IASO) (Juliol, 2000) Actes del Congr s, p g 58.

Schweizer J, Zynger D, Francke U. In vivo nuclease hypersensitivity studies reveal multiple sites of parental origin-dependent differential chromatin conformation in the 150 kb SNRPN transcription unit. *Hum Mol Genet* (1999) 8(4):555-566.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* (1993) 16(2):325-32.

Silverstein S, Lerer I, Buiting K, Abeliovich D. The 28-kb deletion spanning D15S63 is a polymorphic variant in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* (2001) 68(1):261-3.

Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, Hillman D, McCarrey JR, Cedar H. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* (1999) 401(6756):929-32.

Smith A, Wiles C, Haan E, McGill J, Wallace G, Dixon J, Selby R, Colley A, Marks R, Trent RJ. Clinical features in 27 patients with Angelman syndrome resulting from DNA deletion. *J Med Genet* (1996) 33(2):107-12.

Stalker HJ, Williams CA. Genetic counselling in Angelman syndrome: the challenges of multiple causes. *Am J Med Genet* (1998a) 77:54-59.

Stalker HJ, Williams CA, Wagstaff J. Genetic counseling in Angelman syndrome: gonadal mosaicism. *Am J Med Genet* (1998b) 78(5):482.

Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* (1994) 8(1):52-8.

T

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gecz J, Ropers HH, Kalscheuer VM. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* (2004) 75(6):1149-54.

Tekin M, Jackson-Cook C, Buller A, Ferreira-Gonzalez A, Pandya A, Garrett CT, Bodurtha J. Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman syndrome with biparental methylation. *Am J Med Genet* (2000) 95(2):145-9.

Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H, Fink E. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* (1996) 34(2):125-31.

Tsai TF, Raas-Rothschild A, Ben-Neriah Z, Beaudet AL. Prenatal diagnosis and carrier detection for a point mutation in UBE3A causing Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* (1998) 63:1561-1563.

Tucker KL, Beard C, Dausmann J, Jackson-Grusby L, Laird PW, Lei H, Li E, Jaenisch R. Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. *Genes Dev* (1996) 10(8):1008-20.

V

Vogels A, De Hert M, Descheemaeker MJ, Govers V, Devriendt K, Legius E, Prinzie P, Fryns JP. Psychotic disorders in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* (2004) 127A:238-243.

Volkow ND, Wang GJ, Maynard L, Jayne M, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Gatley SJ, Ding YS, Wong C, Pappas N. Brain dopamine is associated with eating behaviors in humans. *Int J Eat Disord* (2003) 33(2):136-42.

Vu TH, Hoffman AR. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* (1997) 17:12-13.

W

Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* (2001) 38(4):224-8.

Wevrick R, Kerns JA, Francke U. Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* (1994) 3(10):1877-82.

Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) 2(3):169-78.

Williams CA, Zori RT, Hendrickson J, Stalker H, Marum T, Whidden E, Driscoll DJ. Angelman syndrome. *Curr Probl Pediatr* (1995a) 25(7):216-31.

Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, et al. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* (1995b) 56:237-238.

Williams CA, Lossie A, Driscoll D. Angelman syndrome: mimicking conditions and phenotypes. *Am J Med Genet* (2001) 101:59-64.

Williams CA. Neurological aspects of the Angelman syndrome. *Brain Dev.* (2005) 27(2):88-94.

X

Xin Z, Allis CD, Wagstaff J. Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi syndrome imprinting center. *Am J Hum Genet* (2001) 69:1389-1394.

Xin Z, Tachibana M, Guggiari M, Heard E, Shinkai Y, Wagstaff J. Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J Biol Chem* (2003) 278(17):14996-5000.

Y

Yamamoto Y, Huibregtse JM, Howley PM. The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* (1997) 41(2):263-6.

Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet* (2003) 12(8):837-847.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* (1998) 3(3):155-63.

Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* (2000) 53(2):627-48.

Z

Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* (1997a) 6(3): 387-395.

Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. 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* (1997b) 5:94-98.

Rés no seria com és sense la meva bibliografia personal. El meu passat, el meu present i el meu futur, són la meva família. Ells fan que tot sigui possible. I m'és del tot impossible trobar les paraules per expressa'ls-hi el meu agraïment.

També és realment difícil fer-ho amb vosaltres. Però ho intentaré...

Qui no recorda el seu primer dia a la Unitat? Segur que tots recordem la sensació que vàrem tenir aquell dia. Però sobretot, el que no oblidem mai, és la *impressió* que deixa en nosaltres el haver passat per aquesta casa. Perquè la gent que hi trobes sou vosaltres...

En el meu cas, les que em van obrir la porta van ser la Maria Dolors i la Miriam. I al llarg de tots aquests anys ha seguit sempre oberta per a mi. Sempre heu tingut una estoneta per intentar suavitzar el meu pessimisme (encara que jo prefereixi dir realisme), per animar-me a anar més enllà o a conèixer món. Gràcies per haver confiat sempre tant en mi. Per cert, trobaré molt a faltar les nostres reunions que sempre han inclòs algun que altre atac de riure!

I mai he trobat tancada cap de les portes de la Unitat. Com la d'en Josep Egozcue, que mai ha deixat de sorprendre'm, i de qui admiro la seva capacitat d'estar per tot (Encara creus que d'aquí sortim totes col·locades i casades? Sempre hi ha excepcions que confirmen les regles!) I la de la Fanny que té cura de tots, dels seus "nens" i dels qui no són els seus "nens" també, i molt. I la d'en Santaló que té la virtut de picar-me i fer-me riure, i m'encanta! I la de la Carme que em va ajudar a iniciar-me en la docència, amb molta paciència i dedicació. I la d'en Leo que sempre sap com fer-te sentir millor. A mi només em cal el seu somriure.

I no és la primera vegada que algú de nosaltres parla de la nostra segona família...L'Elena, l'Esther i en Mark em van cedir part del seu espai quan vaig aterrar. Elena, gràcies per tantes i tantes xerrades, per haver-me dedicat no sé quants "Què passa Cris?". Però sobretot, gràcies per escoltar la resposta. I l'Esther, que em va integrar en quant vaig arribar, després em vas cedir la teva taula, i has acabat sent el que ets, una bona amiga i companya. I una ingènua que com jo s'ho creu tot! Així que en Jose s'ho passa d'allò més bé prenent-nos el pèl!

I qui m'havia de dir que en Mark, discret i distant, acabaria acostant-se amb curiositat, portant-me al mig d'una pista de ball! (lent-lent, ràpid-ràpid!), consentint-me, cuidant-me i compartint estones, de les que ja saps que mai m'he perdut, ni em perdo, ni em perdré un segon. Un tresor, recordes?...I si no, tant se val! Ja t'ho recordo jo!

I de les abraçades i mimitos d'en Litus, què en puc dir? M'encanto escoltant-te i mirant-te. Gràcies per alegrar-me el dia un munt de vegades. Tantes vegades com estones que passem junts. L'Emma em va fer de "mami" patint PCR's i gels amb mi. Però encara hi ha molt més, i no té res a veure amb l'experimental. Has obert camí i m'has ajudat a caminar. Gràcies per ensenyar-me en infinitat d'ocasions que sempre hi ha un camí, i sobretot per fer-me sentir i saber que tu estaràs a prop caminant amb mi...L'orgull és meu...de tot cor.

I la Paqui...*Gracias Paqui por tus ánimos para afrontar lo que haga falta. Cuando me dices "tú p'alante" ¡no hay quien me pare! Eres un Sol enorme.*

Y a ti Tomás, gracias por tu cariño, y por dejarme formar parte de tu mundo, que ha aportado muchas cosas al mío.

I el meu incondicional amic Pep. Gràcies Pep per aguantar-me (per això es necessita molta paciència), per entendre'm (per això molt més que paciència), per dedicar-me in comptables bons moments...i per fer-me assaborir al poeta Sabina! A qui ara soc addicta i a qui seguirem assaborint junts. *¿Y a ti cómo voy a darte las gracias, Aurora? Una mirada nos basta. Algunas de ellas han sido de socorro, otras de complicidad, otras de comprensión. Somos capaces de leernos el pensamiento, así que sólo puedo añadir a lo que ya sabes, que un millón de gracias.* I en Joan, un bon amic que em coneix i m'endevina. Han estat moltes les estones, les xerrades, les trucades internacionals d'una hora!...i els dos sabem que ja no ens calen paraules. No tinc paraules per a la primera persona amb qui em vaig adonar del pes de la paraula amistat. I ja saps que per mi és sagrada.

I la "família" no és completa sense l'Eli i en Pep. Em van fer un lloc a les seves vides, en el que m'he sentit com a casa.

Alguns membres de la "família" em van presentar unes noies. I ara aquestes noies, Lola, Nora i Olga, viuen, no només sota el mateix sostre que jo, sinó a dins del meu cor.

La gent amb qui he viscut el dia a dia, m'han alegrat els meus bons dies, i han suportat els no tant bons.

En Marc i la Silvia que són dels primers en dir-te "bon dia!", acompanyat sempre amb un somriure, i que mantenen aquesta casa en peu!

En Cèsar, el "showman" de la casa, que des del seu primer dia va confiar en mi, m'ha fet plorar de riure, i m'ha mimat un munt. La Zaida que sempre ha respectat el meu petit espai, els meus silencis o la meua mala costum de pensar en veu alta. L'Ester que m'encomana una mica de la seva pau (ho sàbies?), i que m'ha acompanyat llargues tardes en la recta final. La Mònica i la Laia amb qui he compartit bones estones i xerrades en algun bareto de Gràcia. La Naima que sempre ens sorprèn amb la seva espontaneïtat. La Pilar que és de les persones més optimistes que mai he conegut i un trocet de pa. L'Assumpta que em fa riure moltíssim, que és tal com és, transparent, i que té remeis o receptes per tot. La Laura que és dolça i innocent. La Marta que és una molt bona companyia, que en certs moments crítics m'ha animat a tirar endavant i m'ha obert els ulls. La Laura Tusell amb qui he parlat de la vida davant de més d'un cafè. La Núria que mai s'ha queixat d'haver-se d'esperar a que jo acabés amb el que estava ocupant. La Iolanda a qui ara li dono la raó (ara m'hi poso a les fotos!) En Jonatan amb qui sempre és agradable conversar. I als meus recents companys, en Nuno, la Gema, l'Amine, la Nerea i en David, per suportar-me sense queixes, en els moments de més histèria. En Sergi que sempre m'ha dit a tot que si des del Taulí. I en David, perquè si no hagués parlat bé de mi a les jefes, potser ara jo no estaria aquí.

I encara que a vegades no ho sembla, hi ha vida fora de la Unitat de Biologia Cel·lular! Perquè aquesta aventura i moltes altres també l'han patit "les nenes" de Sant Pere. Noies, tranquil·les, ja s'ha acabat el monotema. Gràcies per un munt d'anys, els passats (que no penso comptar!), però sobretot pels futurs. No sé vosaltres, però jo ens imagino a la *pizzeta* amb el bastó i el cabell blanc!

I després d'aquells bons temps a la Facultat amb la Ruth, la Sandra i la Marta, seguim juntes. I està demostrat que juntes arribem a on s'hagi d'arribar. És més, sense vosaltres no penso anar a enlloc...Us estimo un munt.

Amb "l'excusa" d'haver de fer una tesi doctoral, he tingut la oportunitat de conèixer gent i una mica de món. La Paola i la Carmen em van acollir a casa seva, i amb això ho dic tot. La Karin ha estat una mestre exemplar i una molt grata companyia en algun congrés. A en Paki i en Silves de La Fe, els haig d'agrair haver-me ajudat en l'empenta final de l'experimental. I l'Elisabeth i la Carme que, potser sense ser conscients, m'han transmès la seva dedicació i passió pel que fan.

I si al final d'una tesi ens trobem amb tres pàgines d'agraïments (intentant ser breus), és perquè al seu darrera hi ha uns quants anys, amb tot el que això comporta. Una evolució professional i personal. És un privilegi. I per a mi, ha estat doble...*Me he sentido realmente privilegiada con este trabajo porque detrás de él siempre estareis vosotros, padres de ángeles. No exagero si digo que conoceros a vosotros y a vuestros hijos ha cambiado mi mundo. Vuestra voluntad y ganas, vuestra ilusión, son un ejemplo para todos. Vosotros sois un ejemplo para todos. Nunca os rindaís. Un montón de besos y un millón de gracias por enriquecer mi vida.*

Moltíssimes gràcies a tots per haver-me acompanyat, suportat, comprès, mimat i ajudat durant aquest camí...però sobretot, per compartir la meta amb mi.

"...Y luego, cuando ante ti se abran muchos caminos y no sepas cuál recorrer, no te metas en uno cualquiera al azar: siéntate y aguarda. Respira con la confiada profundidad con que respiraste el día en que viniste al mundo, sin permitir que nada te distraiga: aguarda y aguarda más aún. Quédate quieta, en silencio, y escucha a tu corazón. Y cuando te hable, levántate y ve donde él te lleve."

Donde el corazón te lleve
Susanna Tamaro

...Jo ja ho he fet, i em porta allà on sigui que hi sou vosaltres...

Cristina

Aquest treball ha estat finançat pels projectes 00/0711 i G03/098 de l'entitat *Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)*.

FINAL

Que el maquillaje no apague tu risa,
que el equipaje no lastre tus alas,
que el calendario no venga con prisas,
que el diccionario detenga las balas.

Que las persianas corrijan la aurora,
que gane el quiero la guerra del puedo,
que los que esperan no cuenten las horas,
que los que matan se mueran de miedo.

Que el fin del mundo te pille bailando,
que el escenario me tiña las canas,
que nunca sepas ni cómo, ni cuando,
ni ciento volando, ni ayer ni mañana.

Que el corazón no se pase de moda,
que los otoños te doren la piel,
que cada noche sea noche de bodas,
que no se ponga la luna de miel.

Que todas las noches sean noches de boda,
que todas las lunas sean lunas de miel.

Que las verdades no tengan complejos,
que las mentiras parezcan mentira,
que no te den la razón los espejos,
que te aproveche mirar lo que miras.

Que no se ocupe de ti el desamparo,
que cada cena sea tu última cena,
que ser valiente no salga tan caro,
que ser cobarde no valga la pena.

Que no te compren por menos de nada,
que no te vendan amor sin espinas,
que no te duerman con cuentos de hadas,
que no te cierren el bar de la esquina...

Noches de boda
Joaquín Sabina



Waitens.