

Elsődleges genetikai vizsgálat Prader–Willi-szindróma igazolására

Ács Orsolya Dóra dr.¹ ■ Péterfia Bálint dr.² ■ Hollósi Péter dr.^{2, 3}
Haltrich Irén dr.¹ ■ Sallai Ágnes dr.¹ ■ Luczay Andrea dr.¹
Karin Buiting dr.⁴ ■ Bernhard Horsthemke dr.⁴ ■ Török Dóra dr.¹
Szabó András dr.¹ ■ Fekete György dr.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹II. Gyermekgyógyászati Klinika,
²I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

³Magyar Tudományos Akadémia, Daganatprogresszió Kutatócsoport, Budapest

⁴Institut für Humangenetik, Universität Duisburg-Essen, Essen, Germany

Bevezetés: A nemzetközi szakirodalmi adatok alapján az *SNRPN* génlocus promoter régiójának DNS-metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb kezdeti lépés a Prader–Willi-szindróma-gyanús betegek genetikai vizsgálatakor.

Célkitűzés: Célunk egy egyszerű, megbízható, könnyen hozzáférhető, elsődlegesen diagnosztikus, DNS-metiláción alapuló eljárás kidolgozása volt Prader–Willi-szindróma igazolására.

Módszer: Vizsgálatunk során az általunk módosított, költséghatékony, metilációszenzitív, nagy felbontású olvadáspont-elemzéses technikát hasonlítottuk össze a leginkább elterjedt, költséges metilációs-specifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikációs technikával. Klinikailag a Prader–Willi-szindróma több tünetét mutató 17 gyermek DNS-metilációs vizsgálatát végeztük el saját tervezésű primerekkel: biszulfitszekvenáló polimeráz-láncreakció, metilációszenzitív nagy felbontású olvadáspont-elemzés és kontrollként metilációs-specifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció történt.

Eredmények: A metilációszenzitív nagy felbontású olvadáspont-elemzés és a metilációs-specifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció eredményei minden esetben megegyeztek. A 17 esetből 6 esetben igazolódott a Prader–Willi-szindróma.

Következtetés: Az általunk használt DNS-metiláción alapuló módszer, amelyben együttesen alkalmaztunk egyedi tervezésű primereket és módosított biszulfitszekvenáló polimeráz-láncreakciót, egyszerű, gyors, megbízható és hatékony vizsgálatnak bizonyult a Prader–Willi-szindróma elsődleges igazolására.

Orv Hetil. 2018; 159(2): 64–69.

Kulcsszavak: Prader–Willi-szindróma, molekuláris genetika, DNS-metiláció

Rapid first-tier genetic diagnosis in patients with Prader–Willi syndrome

Introduction: According to the international literature, DNA methylation analysis of the promoter region of *SNRPN* locus is the most efficient way to start genetic investigation in patients with suspected Prader–Willi syndrome.

Aim: Our aim was to develop a simple, reliable first-tier diagnosis to confirm Prader–Willi syndrome, therefore to compare our self-designed simple, cost-efficient high-resolution melting analysis and the most commonly used methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification to confirm Prader–Willi syndrome.

Method: We studied 17 clinically suspected Prader–Willi syndrome children and their DNA samples. With self-designed primers, bisulfite-sensitive polymerase chain reaction, high-resolution melting analysis and, as a control, methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification were performed.

Results: Prader–Willi syndrome was genetically confirmed in 6 out of 17 clinically suspected Prader–Willi syndrome patients. The results of high-resolution melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification were equivalent in each case.

Conclusion: Using our self-designed primers and altered bisulfite-specific PCR conditions, high-resolution melting analysis appears to be a simple, fast, reliable and effective method for primarily proving or excluding clinically suspected Prader–Willi syndrome cases.

Keywords: Prader–Willi syndrome, molecular genetics, DNA methylation

Ács OD, Péterfia B, Hollósi P, Haltrich I, Sallai Á, Luczay A, Buiting K, Horsthemke B, Török D, Szabó A, Fekete Gy. [Rapid first-tier genetic diagnosis in patients with Prader–Willi syndrome]. *Orv Hetil.* 2018; 159(2): 64–69.

(Beérkezett: 2017. augusztus 27.; elfogadva: 2017. szeptember 28.)

Rövidítések

CpG = citozin-guanin dinukleotid; *HhaI* enzim = *HhaI* restrikciós enzim; HRM = (high-resolution melting) nagy felbontású olvadáspont-elemzés; *MAGEL2* = MAGE Family Member L2 fehérjét kódoló gén; *MRKN3* gén = Macro Ring-Finger Protein 3-at kódoló gén; MSA = mikroszatellita-analízis; MS-MLPA = metilációspecifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció; MS-PCR = metilációspecifikus polimeráz-lánreakció; MS-SB = metilációspecifikus Southern-blottolás; *NDN* = necdin fehérjét kódoló gén; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-lánreakció; PWLS = Prader–Willi-like-szindróma; PWS = Prader–Willi-szindróma; *SNORD116* gén = small nucleolar RNA, C/D box 116 cluster; snoRNS = nukleáris RNS; *SNRPN* gén = small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N gén; *SNURF* = *SNRPN* upstream reading frame; upd(15) mat = maternális uniparentális disómia; Tm = (melting temperature) olvadási hőmérséklet

A Prader–Willi-szindróma (PWS) egy ritka (incidencia 1 : 30 000 élve születés), komplex genetikai betegség, amelynek klinikai tünetei az életkorral változnak. Újszülöttkorban az izomhipotónia és a táplálási nehézségek, míg az idő előrehaladtával a csillapíthatatlan étvágy, az elhízás, a viselkedési zavarok és az egyre inkább elmaraadó szellemi fejlődés válik dominánssá [1, 2]. A betegség hátterében a 15. kromoszóma hosszú karján található apai eredetű 15q11q13 régióban található gének expressziójának hiánya áll. Ezen a szakaszon több, összetett funkciójú gén található (például *IMRKN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN* gén, valamint különböző C/D box snoRNS-ek) [2–4]. A PWS minimális kritikus régiója a *SNORD116* snoRNS-génklaszter, amelynek funkciója a hiperfágiás fenotípussal helyezhető összefüggésbe [5, 6]. A PWS különböző mechanizmusok folytán alakulhat ki, amelyek típusa egyes megfigyelések szerint szoros összefüggést mutat a betegség lefolyásával és annak súlyosságával. A pontos genetikai diagnózis tehát igen fontos a korai fejlesztéshez és a gyógyszeres terápiához. Az esetek mintegy 70%-ában a legsúlyosabb formát okozó paternális deletio, 20–30%-ában anyai uniparentális disómia, 4–5%-ában imprinting defektus, 1–2%-ában pedig kiegyensúlyozott, illetve kiegyensúlyozatlan transzlokáció a betegség oka [7–9].

Az *SNRPN* génlocus promoter régiójának DNS-metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb kezdeti lépés a PWS-gyanús betegek genetikai

vizsgálatakor [10]. Erre a célra a metilációspecifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció (MS-MLPA) módszere terjedt el a leginkább. Ezzel a technikával mind a target 15q11q13 régió kópiaszáma, mind pedig a metilációs status megállapítható, az ehhez szükséges DNS-szekvenáló teszt azonban igen komplex, időigényes, és jelentős költséggel jár. Az uniparentális disómia, illetve az imprinting defektus további elkülönítésére a mikroszatellita-analízis (MSA) alkalmas. A DNS-metilációs status vizsgálatára további alternatív módszerek is rendelkezésre állnak, mint például a metilációspecifikus polimeráz-lánreakció (MS-PCR), a metilációspecifikus Southern-blot (MS-SB) vagy a nagy felbontású olvadáspont-elemzés (HRM) [11–13]. A DNS-metilációs vizsgálat eredménye a Prader–Willi-szindrómás esetek 99%-ában pozitív, alkalmazásával mind a deletiós, mind az anyai uniparentális disómia, illetve az imprinting defektus detektálható, míg a leginkább hozzáférhető FISH (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) csupán a deletiós forma kimutatására alkalmas (ez kb. a betegek 70%-át fedile). Az MSA, amely az UPD, illetve a deletiós forma kimutatására felel meg, kevésbé szenzitív, elsődleges szűrésre csak korlátozottan alkalmas [8]. Hazánkban *Varjas Tímea és mtsai* RNS-izolálás után cDNS-t szintetizáltak, majd PCR-t végeztek a teljes cDNS-mennyiséggel. A PCR-terméket agarózgélelben futtatták, és a 15. kromoszóma 15q11-13 régiójára specifikus gén expresszióját vizsgálták. A gén expresszióját mindegyik egészséges egyénnél ki tudták mutatni, míg a klinikailag Prader–Willi-szindrómás betegeknél nem. Ez a módszer mindenképpen hatékony, ám kivitelezése nem egyszerű, időigényes [14].

A PWS-diagnózis lehetősége a klinikai tünetek alapján merül fel, és igazolásához elengedhetetlen a genetikai vizsgálat. A klinikai diagnózis felállításához *Holm és mtsai* kritériumrendszert dolgoztak ki, amely életkor-specifikusan segíti a PWS felismerését. Ez a módszer elsősorban szűrésre alkalmas: segítséget nyújt a klinikusnak, hogy mely betegnél indokolt a genetikai vizsgálat. Azokban az esetekben, amikor a fenotípus PWS-re utal, genetikai eltérés azonban nem mutatható ki, Prader–Willi-like-szindrómáról van szó [2, 3]. A PWS kezelésében a megfelelően alkalmazott növekedéshormon-terápia nyújthat segítséget, mivel jótékony hatást gyakorolhat a testösszetételre, a növekedésre, a metabolikus statusra és a pszichokognitív teljesítményre is [15].

Célkitűzés

Vizsgálatunk célja egy egyszerű, megbízható, elsődleges PWS-diagnosztikára alkalmas, DNS-metiláción alapuló, de DNS-szekvenáló készüléket nem igénylő eljárás kidolgozása volt. Ennek során az általunk módosított, költséghatékony, metilációszenzitív, nagy felbontású olvadáspont-elemzési (MS-HRM-) technika hatékonyságát hasonlítottuk össze a leginkább elterjedt, ám igen költséges metilációs-specifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikációs (MS-MLPA-) technika hatékonyságával.

Módszer

Betegek és adatgyűjtés

Az összehasonlításhoz 17, a klinikai tünetek alapján PWS-gyanús gyermek és 6 szülő vérmintáját vizsgáltuk. Kontrollként két egészséges egyéntől származó DNS-mintát használtunk. Minden esetben, az egészséges kontrollokban is, részletes tájékoztatáson alapuló, írásos, szülői beleegyezést kértünk a vizsgálathoz. A vizsgálat nem sérti a Helsinki Deklaráció emberi DNS-vizsgálatokra vonatkozó előírásait. Az anamnesztikus adatgyűjtés kiterjedt a perinatalis anamnézisére, a fejlődési adatokra, az antropometriai paraméterekre, illetve a Holmszerinti maior és minor kritériumok regisztrálására [1, 2].

Molekuláris genetikai vizsgálatok

A perifériás teljes vérmintából történő genomiális-DNS-izolálás High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Roche Biomedical Laboratories, Burlington, NC, USA), az ezt követő biszulfítkonverzió EZ DNA Methylation™ Kit-tel (Zymo Research, Irvine, CA, USA) történt. Egy mikrogramm perifériás vérből izolált DNS került konverzióra, majd a biszulfítkonvertált mintákat 10 µl-re hígítottuk a gyártó utasítása alapján. A biszulfítkonvertált minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg, 'ssDNA' beállítást használva.

Biszulfitszekvenáló PCR (BS-PCR)

In silico CpG-sziget-azonosításhoz a CpG Plot EMBOSS Application (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) programot használtuk. A biszulfitszekvenáló PCR-ek a PyroMark Assay Design szoftver (SW 2.0, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével tervezett, a metilációs mintázatot leginkább mutató CpG-régiókra fókuszáló primerekkel zajlottak (primer F: 5'-GAGGGAGTTGGGATTTTTGT-3'; primer R: 5'-AATAACCCCTCCCCAACTATCTCTT-3'). A primerek specificitását *in silico* BiSearch szoftverrel (<http://bisearch.enzim.hu>) teszteltük.

A BS-PCR-ekhez AmpliTaq Gold 360 Master Mix-et (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), LightCycler®

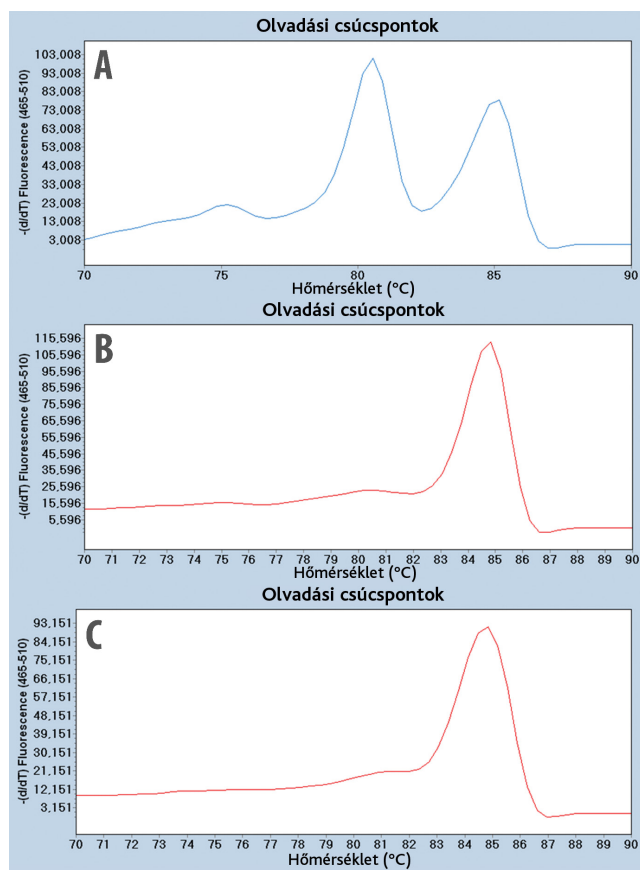
480 ResoLight Dye (Roche, Bazel, Svájc) festéket használtunk, a primerek végkoncentrációja 0,2 µmol volt. Reakciónként 20–40 ng biszulfítkonvertált DNS került a 15 µl-es végtérfogatba. A MgCl₂ végkoncentrációja 3,5 mmol volt. A valós idejű PCR során a következő LightCycler® 480 System beállításokat alkalmaztuk: 95 °C 10 percig, utána 95 °C 30 másodpercig, 60 °C 0,4 °C-os ciklusonkénti csökkenéssel 30 másodpercig, 72 °C 30 másodpercig 10 touchdown ciklus alatt, ezt követően amplifikáció: 95 °C 30 másodpercig, 56 °C 30 másodpercig és 72 °C 30 másodpercig 50 cikluson keresztül. A PCR-ciklusok befejeztével, a nagy felbontású olvadáspont-elemzés a következőképpen zajlott: denaturáció 95 °C-on 1 percig, 40 °C-ra hűtés után a hőmérsékletet tartva 1 percig, utána folyamatos melegítés 95 °C-ra. Az olvadáspontmérés során folyamatos melegítés közben fokként 20 alkalommal detektáltuk a fluoreszcens jeleket.

A metiláltsági értékek becsléséhez a normalizált MS-HRM-görbék negatív deriváltját vettük alapul, ezekhez a LightCycler® 480 szoftver (verzió: 1.5.0) és a LightCycler® Gene Scanning szoftver segítségével jutottunk hozzá.

Az MS-HRM-assay-k kalibrálása *in vitro* biszulfítkonverzióon átesett teljesen metilált (100%) és metilálatlan (0%) standard DNS-ek keverékéből származó, különböző metiláltságú (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) mintákkal történt, amelyek az MS-HRM-vizsgálat során jelentették a viszonyítási pontokat. A metiláltsági szint megállapítása minden vérminta esetében, a beteg- és a standard minták vizuális összehasonlításával történt, két szakértő bevonásával.

Metilációs-specifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció (MS-MLPA)

A SALSA ME028 (lot B2-0413 és B2-0811) MS-MLPA mixet az MRC-Holland-tól (Amszterdam, Hollandia) rendeltük. A próbamix 32 specifikusan a Prader-Willi/Angelman-szindrómában érintett 15q11q13 régiót lefedő próbát tartalmazott. Ezek közül 5 MS-MLPA-próba egy imprintált szekvenciára és egyben a metilációérzékeny *HhaI* enzim felismerőhelyére volt specifikus. Tízennégy MLPA-próba a PWS/Angelman-régióon kívül helyezkedett el, és kontrollként funkcionált mind a kópiaszám-quantifikáció, mind pedig az MS-MLPA során történő *HhaI* enzim általi emésztés teljességének ellenőrzésére. Minden minta esetében 100 ng genomiális DNS került reakciónként felhasználásra. A mintákat 60°C-on történő 16 órás hibridizáció után két aliquot részre osztottuk. Az elsőt ligatiónak, míg a másodikat ligatiónak és enzimátikus emésztésnek vetettük alá. Ezek után PCR-amplifikációt hajtottunk végre a mintákon. Minden PCR-termékhez (1 µl) belső standardot (1 µl) és deionizált formamidot (20 µl) adtunk, majd ABI-3100 Genetic Analyzer DNS-szekvenáló (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével analizáltuk a kapott eredményeket.



1. ábra

Az *SNRPN* locus HRM-vizsgálat során detektált metilációs görbéi. **A:** Két olvadási csúcs (nem metilált apai: $T_m = 80,63 \pm 0,24$ °C, metilált anyai: $T_m = 84,97 \pm 0,35$ °C) detektálható egészséges emberekben. A járulékos minor olvadási csúcsok *LISI* locusra ($T_m = 76,0$ °C), illetve anyai és apai *SNRPN* heteroduplex produktumokra utalnak. **B:** Deletiós PWS ($T_m = 84,48 \pm 0,99$ °C). **C:** Nem deletiós PWS ($T_m = 84,5 \pm 0,6$ °C). Minden PWS-esetben hiányzik az apai (nem metilált) csúcs

T_m = (melting temperature) olvadási hőmérséklet

Mikroszatellita-analízis (MSA)

Az MSA során mind a gyermekek, mind pedig a szülők DNS-mintáit megvizsgáltuk. A 15q11q13 régióra specifikus 5 markert használtunk (*D15S54I*, *D15S817*, *D15S128*, *D15S1234* és *D15S822*) a multiplex PCR után, amelyet a Qiagen Multiplex PCR Kit-tel (Qiagen, Valencia, CA, USA) végeztünk. A PCR 25 μ l végvolumene 100 ng DNS-t és minden primerből 2 μ mol-t tartalmazott. Az amplifikáció első lépése denaturáció volt 95 °C-on 15 percig, amelyet 35 ciklus követett (30 másodperc 94 °C-on, 90 másodperc 58 °C-on, 90 másodperc 72 °C-on, végül 10 percig 72 °C-on, majd 4 °C-on hűtés).

Három, a PWS/Angelman-régió mellett eső locus (*D15S144*, *D15S1007* és *D15S642*) genotipizálása segített különbséget tenni a deletió és az uniparentális disómia között: az apai kritikus régió hiánya és a biparentális megjelenés a régió mellett együttesen deletiót jelentett, míg az uniparentális öröklődés – mind a kritikus régió-

ban, mind pedig azon kívül – uniparentális disómia utalt.

Az MSA során a fluoreszcensen jelölt PCR-terméket ABI 3100 Automatic Capillary Genetic Analyzer, GeneScan és Genotyper szoftver (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével detektáltuk.

Eredmények

HRM- és MS-MLPA-módszerekkel 17 PWS-gyanús beteg DNS-mintáját teszteltük. Prader-Willi-szindróma 6 esetben igazolódott. Ezekben az esetekben a további besorolás érdekében MSA-t is végeztünk, amellyel 1 betegnél deletiót, 2 betegnél pedig uniparentális disómiát igazoltunk. Egy beteg esetében az imprinting defektust nem tudtuk elkülöníteni az uniparentális disómiától, mivel a hiányzó szülői DNS-minta miatt MSA nem volt kivitelezhető.

A BS-PCR és a nagy felbontású olvadáspont-elemzés eredménye alapján két olvadási csúcs (nem metilált apai: $T_m = 80,63 \pm 0,24$ °C, metilált anyai: $T_m = 84,97 \pm 0,35$ °C) volt detektálható egészséges esetekben. Deletiós esetekben ($T_m = 84,48 \pm 0,99$ °C) és nem deletiós, de PWS-betegekben ($T_m = 84,5 \pm 0,6$ °C) hiányzott az apai (nem metilált) csúcs. A járulékos minor olvadási csúcsok *LISI* locusra ($T_m = 76,0$ °C), illetve anyai és apai *SNRPN* heteroduplex produktumokra utaltak (1. ábra). A HRM- és az MS-MLPA-vizsgálatok eredményei minden esetben megegyeztek. A genetikai eredményeket a *Holm*-score-ral összevetve, a genetikailag igazolt PWS-betegek összpontszáma nagyobbak bizonyult (1. táblázat).

Következtetés

A Prader-Willi-szindróma diagnózisa a korcsoport-specifikus tüneteken és a genetikai vizsgálaton alapszik. A European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), a United Kingdom External Quality Assessment Scheme (UKNEQAS), valamint a Clinical Molecular Genetics Society (CMGS; Egyesült Királyság) konszenzusa alapján az *SNRPN* génlocus promotor régiójának DNS-metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és a leghatékonyabb kezdeti lépés a Prader-Willi-szindróma-gyanús betegek genetikai vizsgálatakor. Ezen módszerek szenzitivitása 99%-os. Mind a nyugat-európai országokban, mind pedig az Amerikai Egyesült Államokban az MS-MLPA, illetve az MS-PCR a legelterjedtebb DNS-metilációs vizsgálat. Az MS-MLPA-módszer nemcsak a PWS igazolására, illetve kizárására alkalmas, hanem egyben további információval szolgál a betegség molekuláris genetikai hátterét illetően, míg az MS-PCR esetében a betegség igazolására, illetve a diagnózis elvetésére van lehetőség. A HRM-technikát szintén elismerik és támogatják a fent említett társaságok [2, 16]. A jelen munkánk egy alternatív metilációs-specifikus

1. táblázat Prader-Willi-szindróma-gyanús betegek klinikai és molekuláris genetikai jellemzői. A genetikai vizsgálatok során 17-ből 6 PWS-gyanús esetben igazolódott a betegség. Három betegben deletio, míg két betegben anyai uniparentális disómia volt jelen. Egy beteg esetében az imprinting defektus az uniparentális disómiától nem volt elkülöníthető, mivel a hiányzó szülői DNS-minta miatt az MSA nem volt kivitelezhető. Minden magasabb *Holm*-pontszámú esetben PWS igazolódott. A HRM és az MS-MLPA eredményei minden esetben megegyeztek

| A beteg sorszáma | Holm-pontszám | HRM | MS-MLPA | MSA |
|------------------|---------------|-----|----------------|--------------------|
| 1. | 4 | NEG | NEG | 0 |
| 2. | 7,5 | POZ | POZ DEL-class2 | 0 |
| 3. | 3 | NEG | NEG | 0 |
| 4. | 4,5 | NEG | NEG | 0 |
| 5. | 2,5 | NEG | NEG | 0 |
| 6. | 5 | NEG | NEG | 0 |
| 7. | 3,5 | NEG | NEG | 0 |
| 8. | 2 | NEG | NEG | 0 |
| 9. | 11 | POZ | POZ DEL-class1 | DEL |
| 10. | 2 | NEG | NEG | 0 |
| 11. | 3,5 | NEG | NEG | 0 |
| 12. | 2,5 | NEG | NEG | 0 |
| 13. | 0 | NEG | NEG | 0 |
| 14. | 7,5 | POZ | POZ DEL-class1 | 0 |
| 15. | 7 | POZ | POZ – non-DEL | upd(15)mat vagy ID |
| 16. | 6 | POZ | POZ – non-DEL | upd(15)mat |
| 17. | 11 | POZ | POZ – non-DEL | upd(15)mat |

0 = nem elvégzett vizsgálat; DEL-class1 = class I-deletio; DEL-class2 = class II-deletio; HRM = nagy felbontású olvadáspont-elemzés; ID = imprinting defektus; MSA = mikroszatellita-analízis; MS-MLPA = metilációspecifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció; NEG = PWS nem igazolható; non-DEL = nincs deletio; POZ = igazolt PWS; PWS = Prader-Willi-szindróma; upd(15)mat = maternális uniparentális disómia

HRM-technikát mutat be a PWS igazolására, valamint alátámasztja a *Holm* szerinti kritériumrendszer klinikai használatának jelentőségét.

Tizenhét, a klinikai tünetek alapján PWS-gyanús betegből 6 esetben igazoltuk a betegség jelenlétét mind a saját tervezésű HRM-, mind pedig az általánosan elfogadott MS-MLPA-technikával. A két módszer során kapott eredmények minden esetben megegyeztek. Az MS-MLPA során egyszerre volt detektálható a kópiaszám-változás (deletiónál csökkent) és a 15q11q13 target régió metilációs statusa (imprinting defektus, uniparentális disómia), ám a módszer hazánkban – technikai és anyagi források hiányában – nehezen hozzáférhető.

Eredményeink alapján, az általunk tervezett primereket és a módosított biszulfitszekvenáló PCR-technikát használva, a HRM egyszerű, gyors, költséghatékony, kis mennyiségű DNS rendelkezésre állása esetén is kivitelezhető, megbízható és hatékony módszernek látszik a Pra-

2. táblázat A HRM- és az MS-MLPA-módszerek klinikai szempontból jelentős, általános jellemzői. A HRM-vizsgálat gyorsan és egyszerűen kivitelezhető, előnye, hogy kis mennyiségű rendelkezésre álló DNS esetén is elvégezhető, valamint lényegesen gazdaságosabb. Ez a módszer a PWS igazolására, illetve kizárására alkalmas. Az MS-MLPA-technika több időt vesz igénybe, bonyolultabb a kivitelezése, és nagyon jó minőségű, nagy mennyiségű DNS szükséges a reakciókhoz. Ez a vizsgálat a HRM-nél drágább, ám nemcsak a betegség kizárására, illetve igazolására alkalmas, hanem további genetikai besorolást is ad [16–18]

| | HRM | MS-MLPA |
|---|---|--|
| DNS-mennyiség (ng) | 20–40 | 50–250 |
| Szükséges reakciók | DNS-izolálás, biszulfítkonverzió, 1 PCR (metilációs-specifikus primerekkel) | DNS-izolálás, 4 PCR (DNS-denaturáció, DNS-hibridizáció, DNS-ligatio, DNS-ligatio és emésztés), DNS-szekvenálás |
| Vizsgálati idő | 1 nap | 2 nap |
| Kiértékelés | Egyszerű, grafiknról leolvasható | Többlépcsős, a DNS szennyezettsége jelentősen befolyásolja az eredményt |
| | PWS igazolására, illetve kizárására alkalmas | PWS igazolására, illetve kizárására, valamint további molekuláris genetikai besorolására alkalmas |
| Költség (HUF) | Kb. 25 000 | Kb. 60 000 |
| A minta beérkezése és a lelet elkészítése közötti idő | 1 hét | 2 hét |

HRM = nagy felbontású olvadáspont-elemzés, MS-MLPA = metilációspecifikus multiplex ligatíofüggő próbaamplifikáció, PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-lánreakció; PWS = Prader-Willi-szindróma

der-Willi-szindróma igazolására. Vizsgálatunk alapján a HRM megfelelő elsődleges genetikai vizsgálat lehet, amennyiben az MS-MLPA technikai vagy anyagi okok miatt nem érhető el (2. táblázat) [16–18].

A genetikai vizsgálatok eredményeit az általunk regisztrált *Holm*-score-ral összevetve, a genetikailag igazolt PWS-betegek esetében a kritériumrendszer szerinti pontszám nagyobbak bizonyult a nem betegek pontszámánál. Tehát a *Holm*-score szerinti besorolás valóban segítség lehet a klinikai diagnózis felállításában és abban, hogy a továbbiakban mely betegnekél szükséges a genetikai vizsgálat elvégzése.

A vizsgált minták mennyiségét figyelembe véve, mivel ritka betegségről van szó, további nagyobb elemszámú, statisztikai elemzéseknek is alávethető vizsgálatokra van szükség az általunk javasolt vizsgálat hatékonyságának bizonyítására.

Anyagi támogatás: European Network of Human Congenital Imprinting Disorders (grant: COST BM1208 – STSM), German Bundesministerium für Bildung und Forschung (grant: 01GM1513A).

Szerzői munkamegosztás: Á. O. D.: A vizsgálat megtervezése, adatgyűjtés, a laboratóriumi vizsgálatok elvégzése, kiértékelése, az eredmények összesítése, a kézirat megírása. P. B., H. P.: A laboratóriumi vizsgálatok tervezése, ellenőrzése, az eredmények értékelése. H. I.: A laboratóriumi vizsgálatok és az eredmények értékelése, a kézirat kiegészítése. S. Á., L. A.: A betegek vizsgálata és kezelése, klinikai adatok szolgáltatása. K. B., B. H.: A laboratóriumi eredmények feldolgozása, a kézirat lektorálása. T. D.: A közlemény felépítésének megtervezése, lektorálása. Sz. A., F. Gy.: A vizsgálat tervezése, szenior ellenőrzés és kiegészítés. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltség: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet Prof. Dr. Kovalszky Ilonának és Dr. Bagby Kornéliának a mérések elvégzéséhez nyújtott segítségért, Dr. Németh Krisztinának, Staub Krisztinának, Egedi Krisztinának, Christina Lichnek és Sabine Kayának a technikai segítségért. Köszönet illeti betegeinket és hozzátartozóikat a vizsgálatban való részvételért.

Irodalom

- [1] Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, et al. Prader–Willi syndrome. *Genet Med.* 2012; 14: 10–26.
- [2] Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, et al. Prader–Willi syndrome: Consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993; 91: 398–402.
- [3] Rocha CF, Paiva CL. Prader–Willi-like phenotypes: a systematic review of their chromosomal abnormalities. *Genet Mol Res.* 2014; 13: 2290–2298.
- [4] Bittel DC, Butler MG. Prader–Willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7: 1–20.
- [5] Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M, et al. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14311–14316.
- [6] Runte M, Huttenhofer A, Gross S, et al. 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: 2687–2700.
- [7] Buiting K, Saitoh S, Gross S et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader–Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet.* 1995; 9: 395–400.
- [8] Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, et al. Angelman and Prader–Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet.* 1989; 32: 285–290.
- [9] Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan, PK et al. The frequency of uniparental disomy in Prader–Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med.* 1992; 326: 1599–1607.
- [10] Goldstone AP. Prader–Willi syndrome: Advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15: 12–20.
- [11] Varela MC, Fridman C, Koiffmann CP. Diagnosis of patients with Prader–Willi and Angelman syndromes: The importance of an overall investigation. *Genet Mol Biol.* 2002; 25: 7–12.
- [12] Wang W, Law HY, Chong SS. Detection and discrimination between deletional and non-deletional Prader–Willi and Angelman syndromes by methylation-specific PCR and quantitative melting curve analysis. *J Mol Diagn.* 2009; 11: 446–449.
- [13] Puiu M, Cucu N. Prader–Willi syndrome, from molecular testing and clinical study to diagnostic protocols. In: Ikehara K. (ed.) *Advances in the study of genetic disorders.* Publisher InTech, Rijeka, Croatia, 2011; pp. 409–430.
- [14] Varjas T, Nádasi E, Kovács E, et al. Diagnostic test for Prader–Willi syndrome by polymerase chain reaction of reverse-transcribed RNA. [Prader–Willi-szindróma diagnóza reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval.] *Orv Hetil.* 1998; 139: 1685–1687. [Hungarian]
- [15] Deal CL, Tony M, Hoybye C, et al. Growth hormone research society workshop summary: Consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader–Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: E1072–E1087.
- [16] Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, et al. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader–Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet.* 2010; 11: 70.
- [17] Smith A, Hung D. The dilemma of diagnostic testing for Prader–Willi syndrome. *Transl Pediatr.* 2017; 6: 46–56.
- [18] Monaghan KG, Wiktor A, Van Dyke DL. Diagnostic testing: A cost analysis for Prader–Willi and Angelman Syndromes. *Genet Med.* 2002; 4: 448–450.

(Ács Orsolya Dóra dr.,
Budapest, Tűzoltó u. 7–9., 1094
e-mail: orsi.acs@gmail.com)

Az Orvosi Hetilap 2017, 158, 1926. oldalán (48. szám) megjelent OH-Kvízre két helyes megfejtés érkezett.

A beküldők: Dr. Bíró László (Budapest) és Dr. Janik Leonárd (Budapest).

A nyerteseknek szívből gratulálunk.

A nyereményüket – egy, az Akadémiai Kiadó webáruházában kedvezményes vásárlásra jogosító kupont – e-mailen küldjük el.