

**18.12.2020**

## **Leitlinien für die molekulare und zytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom**

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V.  
Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V.

Veröffentlicht Mai 2020, überarbeitete und aktualisierte Fassung vom Nov. 2016

Autoren:

Dr. rer. nat. Karin Buiting, Institut für Humangenetik, Essen  
Dr. biol. hum. Dieter Gläser, Genetikum, Neu-Ulm  
Dr. rer. nat. Jasmin Beygo, Institut für Humangenetik, Essen

Die diagnostischen Empfehlungen dieser Leitlinien sind ebenfalls in dem *Update of the EMQN best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes* (Beygo et al., 2019) aufgeführt.

### **1. Klinischer Hintergrund**

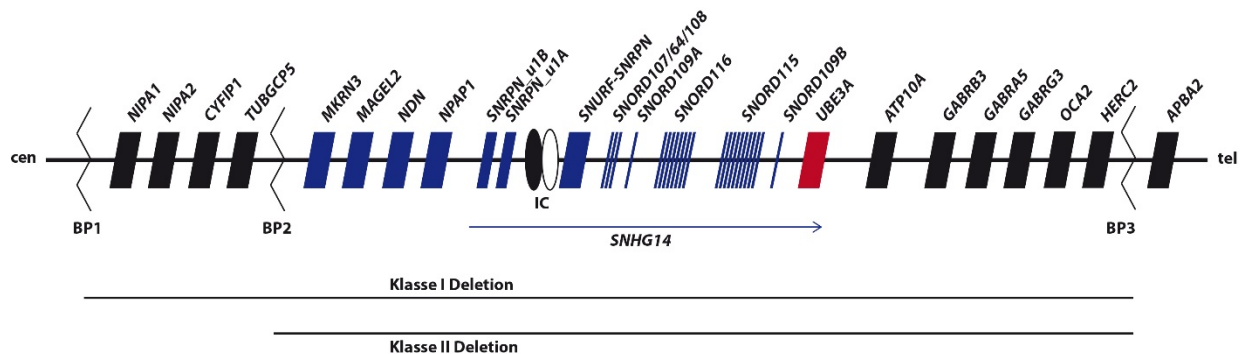
Das Prader-Willi-Syndrom (PWS, #176270) und das Angelman-Syndrom (AS, #105830) sind distinkte neurogenetische Erkrankungen, die durch den Funktionsverlust elternspezifisch geprägter Gene im Bereich 15q11q13 hervorgerufen werden. Neugeborene mit PWS haben oft ein etwas geringeres Geburtsgewicht und zeigen eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie und Trinkschwäche. Im Säuglingsalter bessert sich die Störung der Nahrungsaufnahme und geht im Kleinkindalter in eine Hyperphagie über, die zu massiver Adipositas führen kann. Weitere Kennzeichen des PWS sind ein Hypogonadismus, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, eine meist milde bis moderate Intelligenzminderung sowie Verhaltensprobleme.

Patienten mit AS zeigen eine verzögerte Entwicklung, eine schwere Intelligenzminderung, eine Ataxie und entwickeln in der Regel keine aktive Sprache. Weitere Symptome sind eine Mikrozephalie, spezifische EEG-Veränderungen, häufige Lachanfälle und ein ausgeprägtes freundliches Verhalten.

### **2. Wissenschaftlicher Hintergrund**

Ein ca. 2 Mb großer Bereich in 15q11q13 unterliegt einer elternspezifischen Prägung (*genomic imprinting*). Infolge der Prägung unterscheiden sich die väterliche und mütterliche Kopie dieses Bereichs in der DNA-Methylierung, der Histonmodifikation und der Genexpression. Die Prägung wird durch ein zweiteiliges *imprinting center* (IC) kontrolliert, das mit dem *SNRPN* Gen überlappt (Abbildung 1). *SNRPN* und mehrere andere Gene werden nur vom väterlichen Chromosom 15 exprimiert. Der 5'-Bereich dieser Gene ist auf dem väterlichen Chromosom unmethyliert und auf dem mütterlichen Chromosom methyliert. In Introns des *SNRPN*-Gens liegen zwei C/D box snoRNA-Gencluster (*SNORD115* und *SNORD116*, früher *HBII-52* und *HBII-85* genannt) sowie Einzelkopien weiterer snoRNA-Gene.

Das *UBE3A*-Gen wird in den meisten Zellen biallelisch, im Gehirn aber nur vom mütterlichen Chromosom exprimiert.



**Abbildung 1: Übersicht der Region 15q11q13**

Die Abbildung zeigt die Gene in dieser chromosomalen Region, die biparental (schwarz) oder nur vom paternalen Allel (blau) exprimiert werden. Das einzige Gen, das nur vom maternalen Allel exprimiert wird, ist *UBE3A* (rot). Die allelspezifische Expression von *UBE3A* bezieht sich aber nur auf neuronale Zellen, in anderen Geweben wird *UBE3A* biparental exprimiert.

Das zweiteilige Imprinting center (IC) befindet sich upstream des *SNURF-SNRPN* Gens und setzt sich aus AS-IC und PWS-IC zusammen. *SNRPN\_u1A* und *\_u1B* repräsentieren upstream Exons des *SNURF-SNRPN*-Gens. *SNHG14* ist eine long noncoding RNA, die vom paternalen Allel exprimiert wird. Unterhalb sind die häufigen Klasse I (BP1-BP3) und Klasse II Deletionen (BP2-BP3) dargestellt. IC - Imprinting center, BP - Bruchpunktcluster, cen - centromer, tel - telomer, nicht maßstabsgetreu.

### 3. Ätiologie von PWS und AS

PWS wird durch den Funktionsverlust von Genen hervorgerufen, die nur auf dem väterlichen Chromosom 15 aktiv sind. Der Funktionsverlust ist in mehr als 99% aller Patienten Folge einer 5-7 Mb großen Deletion (Klasse I und II, Abbildung 1) auf dem väterlichen Chromosom 15, einer maternalen uniparentalen Disomie (UPD) oder eines Imprintingdefekts (mütterliche Prägung des väterlichen Chromosoms). Ungefähr 10% der Imprintingdefekte sind auf eine 8-200 kb große IC-Deletion zurückzuführen, die immer Exon 1 von *SNRPN* einschließt. Punktmutationen im IC wurden bislang nicht identifiziert. Es wurden jedoch einige Patienten mit einer paternalen Deletion des *SNORD116*-Clusters beschrieben, die viele Merkmale des PWS zeigen (Sahoo et al., 2008, de Smith et al., 2009, Duker et al., 2010, Goldstone et al., 2013, Bieth et al., 2015, Fontana et al., 2017, Tan et al. 2020). In sehr seltenen Fällen wurde eine balancierte Translokation mit Bruchpunkt in 15q11q13 beobachtet, wobei aber kein typisches PWS vorlag (Wirth et al. 2001; Schule et al. 2005). Mutationen im väterlichen *MAGEL2*-Allel verursachen das Schaaf-Yang-Syndrom (SYS), das klinisch stark mit PWS überlappt. Die Häufigkeit der verschiedenen Ursachen und das Wiederholungsrisiko sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1. Molekulare Klassen bei PWS

Ätiologie	Paternale Deletion 15q11q13	Maternale UPD(15)	Imprintingdefekt		Paternale Deletion <i>SNORD116</i>	Balancierte Translokation
			IC-Deletion	Keine IC- Deletion		
Häufigkeit	~ 70-75 %	~ 25-30 %	~ 0,1 %	~ 0,9 %	Sehr selten	Sehr selten
WR*	< 1 %	< 1 %	50 % <sup>+</sup>	< 1%	< 1%, wenn <i>de novo</i>	< 1%

\*Wiederholungsrisiko (WR) bei normalen elterlichen Chromosomen

<sup>+</sup> Wenn der Vater Träger ist (Mosaik ausgeschlossen)

Tabelle 2. Molekulare Klassen bei AS

Ätiologie	Maternale Deletion 15q11q13	Paternale UPD(15)	Imprintingdefekt		<i>UBE3A</i> Mutation	andere
			IC-Deletion	Keine IC- Deletion		
Häufigkeit	~ 70-75 %	~ 1-2 %	~ 0,3 %	~ 3,0 %	~ 5-10 %	~10-15%
WR*	< 1 %	< 1 %	50 % <sup>+</sup>	< 1%	50 % <sup>+</sup>	?

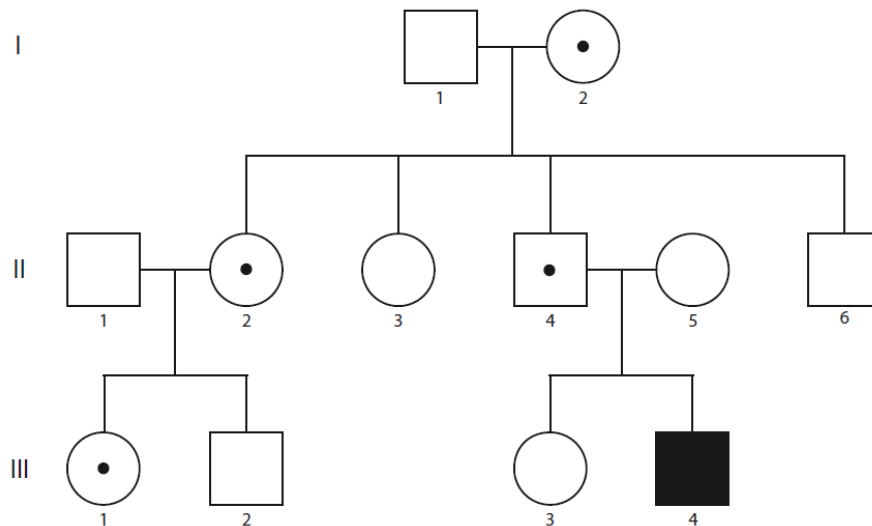
\*Wiederholungsrisiko (WR) bei normalen elterlichen Chromosomen

<sup>+</sup> Wenn die Mutter Trägerin ist (Mosaik ausgeschlossen)

AS wird durch den Funktionsverlust des mütterlichen Allels von *UBE3A* hervorgerufen. Neben einer 5-7 Mb Deletion auf dem mütterlichen Chromosom 15, einer paternalen UPD 15 und eines Imprintingdefekts (väterliche Prägung des mütterlichen Chromosoms) kann *UBE3A* auch durch eine pathogene Variante auf dem maternalen Allel und andere, bislang nicht geklärte Mechanismen inaktiviert werden (Tabelle 2). In einigen wenigen familiären Fällen wurden intragene oder atypische Deletionen, die *UBE3A* überspannen, nachgewiesen (Saitoh et al., 1992, Burger et al., 2002, Boyes et al., 2006, Sato et al., 2007; Piard et al., 2011, Beleza-Meireles et al., 2011, Kuroda et al., 2014, Aguilera et al., 2017). Ungefähr 10% der Imprintingdefekte sind auf eine 5-80 kb große IC-Deletion stromaufwärts von *SNRPN* Exon 1 zurückzuführen; in einem Fall wurde eine 1,5 Mb große, paracentrische Inversion mit Bruchpunkt im IC nachgewiesen (Buiting et al. 2001). Punktmutationen im IC wurden bislang nicht identifiziert (Beygo et al. 2020).

Generell ist das Wiederholungsrisiko für PWS und AS gering (Tabelle 1 und 2). Die 5-7 Mb große Deletion und die UPD treten fast immer sporadisch auf. Bestimmte Chromosomenaberrationen bei einem Elternteil können aber das Wiederholungsrisiko für eine dieser Aberrationen erhöhen. Eine große Deletion tritt zwar in der Regel *de novo* auf, aber das Vorliegen einer balancierten Translokation unter Beteiligung des Chromosoms 15 beim Vater (bei PWS) oder bei der Mutter (bei AS) kann zu einer unbalancierten Translokation und damit einer Deletion beim Kind führen. Für eine UPD gibt es ein erhöhtes Wiederholungsrisiko bei Vorliegen einer Robertsonschen Translokation mit der Beteiligung eines Chromosoms 15 bei einem der beiden Eltern. Imprintingdefekte ohne IC-Deletion oder Rearrangement scheinen sporadisch zu sein. IC-Deletionen und *UBE3A*-Mutationen können sporadisch und familiär auftreten. Bei familiärem Auftreten besteht ein Wiederholungsrisiko von 50%. Bei *de novo* IC- und *UBE3A*-Mutationen kann ein Keimzellmosaik und damit ein eventuell erhöhtes Wiederholungsrisiko nicht ausgeschlossen werden. Es ist zu beachten, dass IC-Deletionen und *UBE3A*-Mutationen durch Nichterkrankte vererbt werden und auch bei entfernt verwandten Familienmitgliedern vorliegen können (siehe Beispielstammbaum, Abbildung 2). IC-Deletionen (des PWS-IC) führen nur dann zu PWS, wenn sie paternal ererbt werden. Daher können sie über mehrere Generationen stumm über die maternale Linie vererbt werden.

Für IC-Deletionen (des AS-IC) und *UBE3A*-Mutationen verhält es sich umgekehrt. Hier manifestiert sich das AS erst, wenn die IC-Deletion oder *UBE3A*-Mutation maternal ererbt wird. Über die paternale Linie erfolgt eine stumme Transmission.



**Abbildung 2: Hypothetischer Stammbaum einer PWS Familie mit einer IC-Deletion des PWS-IC.** In der dritten Generation ist ein Sohn mit PWS (III.4, ausgefülltes Quadrat) nach paternaler Transmission der IC-Deletion geboren worden. Sein Vater (II.4) ist gesunder Überträger, ebenso wie seine Tante väterlicherseits (II.2) und seine Cousine (III.1) sowie seine paternale Großmutter (I.2; Konduktoren mit schwarzem Punkt gekennzeichnet). Im Familienzweig der Tante väterlicherseits (II.2) gäbe es frühestens in der 5. Generation ein erhöhtes Risiko für ein Kind mit PWS: Sollte seine Cousine (III.1) die IC-Deletion an einen Sohn (IV. Generation) vererben, hätte dieser ein 50%iges Risiko ein Kind mit PWS zu bekommen (V. Generation).

## 4. Diagnostische Strategie

In der Regel beginnt die Diagnostik bei einem klinischen Verdacht auf PWS oder AS mit der Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens. Bei einer Normalperson ist das mütterliche Allel methyliert und das väterliche Allel unmethyliert. Für die Methylierungsanalyse eignet sich DNA aus EDTA-Blut, Mundschleimhaut, Chorionzotten (nach Ausschluss mütterlicher Kontamination) und Amnionzellen des Probanden. Eine solche Methylierungsanalyse kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Die derzeit am häufigsten genutzte Methode ist die methylierungsspezifische (MS)-MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), gefolgt von der MS-PCR (siehe 5.1 und 5.2).

Die MS-MLPA detektiert zeitgleich die Methylierung und die Gendosis für den Bereich 15q11q13. Neben den 5-7 Mb großen Deletionen, uniparentalen Disomien und Imprintingdefekten kann die MLPA auch IC-Deletionen sowie je nach Größe und Lokalisation atypisch kleine Deletionen (z.B. begrenzt auf das *SNORD116* Gencluster bei Verdacht auf PWS oder das *UBE3A*-Gen bei Verdacht auf AS) und atypisch große Deletionen (*APBA2* siehe 5.1) detektieren. Für die Unterscheidung zwischen uniparentaler Disomie und Imprintingdefekt muss eine Mikrosatellitenanalyse von beiden Eltern und Patient angeschlossen werden.

Die MS-PCR ist auffällig (Hypomethylierung bei AS/Hypermethylierung bei PWS) bei Vorliegen einer Deletion 15q11q13, einer uniparentalen Disomie sowie einem Imprintingdefekt, unterscheidet aber nicht zwischen den drei Ursachen. Auch werden kleine Deletionen, die nicht das *imprinting center* überspannen mit einer MS-PCR nicht erfasst, da sie nicht zu einer Veränderung der Methylierung führen.

Translokationen können molekulargenetisch mit den Standardmethoden nicht erfasst werden.

Mit einer Methylierungsanalyse erfasst man fast alle Patienten mit PWS und die meisten Patienten mit AS. Bei einem normalen Testergebnis ist deshalb ein PWS mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. In diesen Fällen könnte auf das Vorliegen von SYS oder Temple-Syndrom getestet werden. Bei AS schließt ein normales Testergebnis das Vorliegen der Erkrankung nicht aus, da *UBE3A*-Mutationen und andere Ursachen das Methylierungsmuster nicht verändern. Wird nach einem Normalbefund der Methylierungsanalyse der klinische Verdacht auf AS aufrechterhalten, sollte eine *UBE3A*-Mutationsanalyse erfolgen. Wird bei dem Probanden eine *UBE3A*-Mutation nachgewiesen, wird auch der Mutter und gegebenenfalls weiteren Familienangehörigen die Untersuchung angeboten.

Zur genauen Abschätzung des Wiederholungsrisikos bei einer auffälligen Methylierung muss die molekulargenetische Ursache ermittelt und zwischen einer Deletion, einer uniparentalen Disomie und einem Imprintingdefekt unterschieden werden. Wenn eine MLPA durchgeführt wurde, ist eine Deletion 15q11q13 schon nachgewiesen oder ausgeschlossen worden. Alternativ kann eine Deletion 15q11q13 mittels Array-Analyse oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-) Analyse nachgewiesen werden. Allerdings kann per FISH keine Differenzierung zwischen den Klasse I, Klasse II (Abbildung 1) und anderer atypisch großen Deletionen erfolgen.

Mittels Mikrosatellitenanalysen kann eine Deletion ausgeschlossen werden, wenn für den Bereich 15q11q13 eine biparentale Vererbung vorliegt. Wenn für diesen Bereich nur ein parentales Allel nachgewiesen werden kann, während die Marker außerhalb eine biparentale Vererbung zeigen, deutet dies auf eine Deletion hin, da bislang keine segmentalen UPDs für Chromosom 15q11q13 beschrieben wurden. Für die Mikrosatellitenanalyse wird zusätzlich DNA der Eltern benötigt, für die FISH-Analyse heparinisiertes Blut. Bei Vorliegen einer UPD sollten die elterlichen Chromosomen auf das Vorliegen einer Robertsonischen Translokation untersucht werden. Wird eine Deletion nachgewiesen, sollte bei PWS der Vater und bei AS die Mutter mittels FISH untersucht werden, um eine Translokation auszuschließen. Wurde eine Deletion ausgeschlossen, muss mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse zwischen einer uniparentalen und biparentalen Chromosomen 15 unterschieden werden.

Ein auffälliger Methylierungsbefund bei biparentalen Chromosomen ohne typische Deletion 15q11q13 deutet auf einen Imprintingdefekt hin. In diesem Fall sollte eine IC-Deletionsanalyse durchgeführt werden. IC-Deletionen werden durch die MLPA mit erfasst. Wird bei dem Probanden eine IC-Deletion nachgewiesen, sollte auch den Eltern (bei PWS dem Vater, bei AS der Mutter) und ggf. weiteren Familienangehörigen diese Untersuchung angeboten werden.

Mittels FISH kann eine IC-Deletion nicht sicher nachgewiesen werden, da die Deletionsgröße stark variieren kann. Die bislang kleinste nachgewiesene IC-Deletion bei AS ist z.B. nur etwa 5 kb groß und wäre mit FISH nicht nachweisbar (Buiting, et al., 1999).

Bei Patienten mit AS und einem Imprintingdefekt ohne IC-Deletion wird in etwa der Hälfte der Fälle eine schwache Methylierung detektiert. Diese Patienten haben ein somatisches Mosaik für normal methylierte Zellen und Zellen mit einem Imprintingdefekt (hypomethylierte Zellen).

Liegt eine uniparentale Disomie vor, sollte beim Patienten und bei beiden Eltern eine Robertsonsche Translokation ausgeschlossen werden.

In seltenen Fällen wurde das Vorliegen eines neu aufgetretenen überzähligen kleinen Markerchromosoms 15 in Assoziation mit einer uniparentalen Disomie 15 beschrieben (Liehr et al., 2005).

## 5. Testverfahren

### 5.1. MS-MLPA

Mit der methylierungsspezifischen (MS)-MLPA wird das Methylierungsmuster an mehreren Stellen in 15q11q13 erfasst und parallel eine Gendosisanalyse dieser Region durchgeführt. Das für die molekulargenetische PWS und AS Diagnostik verfügbare MS-MLPA Kit (ME028-, MRC Holland) enthält Hybridisierungssonden für die chromosomale Region 15q11q13 und Referenzsonden aus anderen chromosomalen Bereichen, die als Kontrollsonden für die vergleichende Bestimmung der Gendosis dienen. Einige Hybridisierungssonden sind methylierungssensitiv und enthalten eine *HhaI* Restriktionsschnittstelle. Ein Teil dieser methylierungsspezifischen Sonden repräsentieren elternspezifisch methylierte Sequenzen aus der PWS/AS Region (für den *SNRPN* Promoter/Exon 1/Intron 1 Bereich und für den *MAGE2* Locus). Weitere Sonden aus dieser Region aber auch aus anderen chromosomalen Bereichen für vollständig unmethylierte Sequenzen dienen als Methylierungskontrollen für den Nachweis einer vollständigen *HhaI* Restriktion. Die Methylierungsanalyse mittels MS-MLPA bietet gegenüber anderen Methoden, wie z.B. der MS-PCR, den Vorteil, dass die Methylierung an mehreren Stellen untersucht wird und deshalb das Risiko für ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis reduziert wird. Falls eine Sonde aufgrund eines Einzelnukleotidaustausches ausfällt, gibt es immer noch andere Sonden, die zur Auswertung genutzt werden können.

Die methylierungssensitiven Sonden zeigen bei Normalkontrollen eine 50%ige Methylierung, die das methylierte maternale und das unmethylierte paternale Allel widerspiegelt. Bei Patienten mit PWS wird eine komplette Methylierung der Sonden angezeigt (Hypermethylierung), entweder da das unmethylierte paternale Allel deletiert ist oder weil bei einer maternalen UPD oder einem Imprintingdefekt beide Allele methyliert vorliegen.

Bei AS hingegen zeigen die Sonden meist keine Methylierung (Hypomethylierung) entweder aufgrund der Deletion des methylierten maternalen Allels oder aufgrund einer paternalen UPD oder Imprintingdefektes, bei denen beide Allele unmethyliert vorliegen. Bei AS und einem Imprintingdefekt im Mosaik liegen neben den Zellen ohne Methylierung auch Zellen mit normaler Methylierung vor, so dass in Abhängigkeit von der Zahl normaler Zellen eine leichte Methylierung detektiert wird.

Die Gendosisanalyse mittels MLPA lässt direkt erkennen, ob bei methylierungsauffälligen PWS- oder AS-Befunden eine große, heterozygote Deletion 15q11q13 der PWS/AS Region vorliegt, was bei der Mehrzahl der Patienten (~70-75%) der Fall ist. Die MLPA Sonden zeigen dabei eine Dosisreduktion um 50%. Aufgrund der Verteilung der über 30 Sonden in der Region 15q11q13 kann man zwischen einer Klasse I- und Klasse II-Deletion unterscheiden. Bei Klasse I Deletionen ist der Bereich zwischen BP1 und BP3

(Bruchpunktregion) deletiert, während bei Klasse II Deletionen der Bereich BP2-BP3 deletiert ist und die Sonden für den Bereich zwischen *TUBGCP5* und *NIPA* eine normale Gendosis anzeigen.

Weiterhin können auch atypische Deletionen mittels MLPA erkannt werden. Sowohl atypisch kleine Deletionen, z. B. für das snoRNA Gencluster *SNORD116* oder für mehrere *UBE3A* Exons, als auch atypisch große Deletionen, die durch eine 50%ige Dosisreduktion der Sonde für das telomerisch zur PWS/AS Region gelegene Gen *ABPA2* angezeigt werden. Bei atypisch großen Deletionen sollte eine weiterführende Größenbestimmung z. B. mittels Array-Analyse erfolgen.

Alle bislang beschriebenen IC-Deletionen können mit dem o.g. MLPA Kit detektiert werden. In der jetzigen Version enthält das MLPA Kit (ME028-C1) vier Sonden für die *SNRPN* Promoter, Exon 1 und Intron 1 Region, ein Bereich, der den kleinsten überlappenden Deletionsbereich bei PWS Patienten mit einer IC-Deletion repräsentiert (PWS-IC). Es gibt auch Sonden, die genutzt werden können, um IC-Deletionen bei Patienten mit AS und einem Imprintingdefekt zu identifizieren. Diese Sonden liegen in dem kleinsten überlappenden Deletionsbereich von Patienten mit AS und einer IC-Deletion (AS-IC).

Im Falle einer pränatalen Diagnostik sollte sich die Interpretation der Methylierungsergebnisse auf den *SNRPN* Locus beschränken. An diesem Locus ist die Methylierung in fetalen und extraembryonalen Geweben bereits vollständig etabliert (Kubota et al. 1996). Für den *MAGEL2* Locus wird zumindest in Chorionzotten bzw. kultivierten Chorionzellen eine Hypomethylierung beobachtet. Daher sollte das Resultat der methylierungsspezifischen Sonde für *MAGEL2* in der pränatalen Diagnostik nicht gewertet werden (Beygo et al. 2019).

## 5.2. Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Bei der Analyse mittels MS-PCR wird die differentielle Methylierung am 5'-Ende von *SNRPN* untersucht. Für die Untersuchung wird eine methylierungsspezifische PCR an bisulfitbehandelter DNA nach Zeschnigk et al. (1997) oder Kubota et al. (1997) empfohlen, in der das methylierte und das unmethylierte Allel getrennt dargestellt werden. Bei der PCR nach Kubota muss eine Duplex-PCR durchgeführt werden, da getrennte PCRs für das paternale und das maternale Allel bei somatischen Mosaiken zu falsch negativen Ergebnissen führen können (Horsthemke et al. 2003). Bei der MS-PCR nach Zeschnigk wird eine PCR mit einem gemeinsamen Primer und einem allelspezifischen Primer (für das methylierte bzw. unmethylierte Allel) durchgeführt.

In jeder Bisulfit-Ansatzserie muss als Qualitätskontrolle der Bisulfitbehandlung eine Normalkontrolle mitgeführt werden. Die PCR muss so optimiert sein, dass die beiden Banden bei Normalkontrollen in annähernd gleicher Intensität vorhanden sind. In jeder PCR-Testreihe müssen eine Leerkontrolle, eine Normalkontrolle und eine Positivkontrolle für PWS sowie eine für AS mitgeführt werden. Ist in der Gelelektrophorese sowohl eine methylierte als auch eine unmethylierte Bande vorhanden, handelt es sich um einen Normalbefund. Bei einer *de novo* Deletion 15q11q13, einer uniparentalen Disomie 15 oder einem Imprintingdefekt fehlt entweder die Bande für das methylierte mütterliche Allel (AS) oder die Bande für das unmethylierte väterliche Allel (PWS). Im Fall eines AS Imprintingdefekts im Mosaik, ist die mütterliche Bande nur schwach ausgeprägt.

Obwohl die DNA-Sequenz am 5'-Ende des *SNRPN*-Gens hochkonserviert ist, gibt es einzelne sehr seltene Sequenzvarianten innerhalb der Primerbindungsstellen für beide genannten Testverfahren (Kubota et al. 1997 und Zeschnigk et al. 1997). Dies kann zu PCR Ausfällen für einzelne Allele und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen (siehe Ramsden et al, 2010 und Beygo et al. 2019).

### 5.3. Alternative Methoden zur Methylierungsuntersuchung am *SNRPN* Locus

Alternative Methylierungsanalysen sind i) eine PCR nach Restriktion mit einem methylierungssensitiven Enzym an genomischer DNA (Chotai et al., 2000), ii) eine methylierungssensitive Schmelzkurvenanalyse (White et al., 2007) sowie iii) eine spezielle Form der Sequenzierung (Pyrosequencing, White et al., 2007). Diese Methoden werden zwar nur wenig genutzt, sind aber in einigen Laboren erfolgreich für die molekulargenetische Diagnostik etabliert worden. Auch diese Methoden können, wie die MS-PCR, nicht zwischen den einzelnen molekulargenetischen Ursachen unterscheiden.

### 5.4. Mikrosatellitenanalyse

Für die Mikrosatellitenanalyse wird DNA des Probanden und der Eltern benötigt. Es werden Loci innerhalb des typischen Deletionsbereichs ("interne Marker") und Loci außerhalb des typischen Deletionsbereichs ("externe Marker") untersucht. Als interne Marker werden *D15S541*, *D15S817*, *D15S128*, *D15S122*, *D15S986*, *D15S1234* und *D15S822* empfohlen. Als externe Marker werden *D15S1007*, *CYP19*, *D15S216*, *D15S100* und *FES* empfohlen. Wegen möglicher Nullallele und anderer Probleme sollten *D15S542* und *D15S113* nicht benutzt werden. Beim Marker *D15S817* können in einigen Fällen drei Allele beobachtet werden. Das kann man weitestgehend vermeiden, wenn man Primer verwendet, die in ihrer Sequenz von den ursprünglich beschriebenen Primern abweichen (siehe unten). Bei Vorliegen eines auffälligen Methylierungsergebnisses (Hypermethylierung bei PWS/Hypomethylierung bei AS) sollte mindestens ein interner Marker und ein externer Marker informativ sein. Fehlt bei internen Markern ein elterliches Allel, während bei externen Markern Allele beider Eltern nachweisbar sind, handelt es sich um eine Deletion. Fehlt bei internen und bei externen Markern ein elterliches Allel, handelt es sich um eine UPD. Bei einer UPD können isodisome und heterodisome Bereiche vorkommen. Sind bei internen und externen Markern Allele beider Eltern nachweisbar, handelt es sich bei Vorliegen eines auffälligen Methylierungsergebnisses um einen Imprintingdefekt.

alternative Primer für *D15S817*:

<i>D15S817</i> rA2	5'-GGTCAGCCTCCATAATCA-3'
<i>D15S817</i> fB2	5'-TGGAACCAATAGGATAGACAC-3'

### 5. 5. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Für die Präparation von Metaphase-Chromosomen wird Heparin-Blut benötigt. Als Sonden für die FISH-Analyse werden *SNRPN* und *UBE3A* empfohlen. Für den distalen Bereich von 15q11q13 stehen auch andere Sonden zur Verfügung (z.B. *D15S10* und *GABRB3*), mit denen aber eine auf *UBE3A* begrenzte Deletion übersehen würde. Zur Identifizierung des Chromosoms 15 wird eine Sonde für einen distal gelegenen Locus,



z.B. *PML*, verwendet. Ist ein Chromosom 15 negativ für *SNRPN* und *UBE3A*, liegt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine typische 5-7 Mb Deletion vor. IC-Deletionen können mittels FISH nicht sicher abgeklärt werden. In entsprechenden Fällen sollte eine molekulargenetische Analyse z. B. mittels MLPA erfolgen.

## 5.6 Array-Analyse

Die Array-Analyse kann zur Identifikation der großen 5-7 Mb großen Deletionen (falls keine MS-MLPA erfolgt ist) und vor allem zur Größenbestimmung bei großen, atypischen Deletionen angewandt werden. Hier können sowohl SNP-Arrays als auch CGH-Arrays genutzt werden. Die Detektion kleinerer Deletionen kann nur unter Berücksichtigung der Abdeckung des jeweiligen Array-Typs in der untersuchten Region erfolgen. Inversionen und balancierte Translokationen können mit Array-Analysen nicht ermittelt werden.

Die Detektion von uniparentalen Disomien kann nur mit SNP-Arrays erfolgen. Dabei sollten beide Elternteile ebenfalls mittels SNP-Array untersucht werden. Wird nur der Patient untersucht können nur Isodisomien erfasst werden, Heterodisomien hingegen können auf diese Weise nicht detektiert werden.

## 5.7. *UBE3A* Mutationsanalyse

Bei einem unauffälligen Methylierungsergebnis können bei etwa 5% der Patienten mit einem Angelman-Syndrom Mutationen im *UBE3A*-Gen nachgewiesen werden. Das *UBE3A*-Gen besteht aus 16 Exons mit dem Translationsstartkodon in Exon 7 (Refseq NM\_130838.4). Für das *UBE3A*-Gen sind fast alle Mutationstypen wie beispielsweise „missense“-Mutationen, „nonsense“-Mutationen, Spleißmutationen, kleine Deletionen und Duplikationen/Insertionen sowie große Deletionen und Duplikationen beschrieben (Sadikovic et al. 2014; LaSalle et al. 2015, HGMD).

Die Mutationsanalyse im *UBE3A*-Gen erfolgt in der Regel im Rahmen einer Sequenzanalyse (Sanger oder NGS, *next generation sequencing*), wobei der gesamte kodierende Bereich einschließlich der angrenzenden Exon-Intron-Übergänge untersucht wird.

Exonübergreifende Deletionen und Duplikationen können mit einer Sanger-Sequenzierung methodisch bedingt nicht erfasst werden. Solche Gendosisveränderungen können aber mittels MLPA detektiert werden. Das MLPA Kit P336 (MRC Holland) enthält für jedes Exon von *UBE3A* mindestens 1 Sonde und weitere sechs Sonden für den „upstream“ Bereich des Gens. Bei NGS-Analysen besteht bei einigen Auswerteprogrammen die Möglichkeit, Deletionen und Duplikationen zu detektieren, sofern ein entsprechendes Softwareelement für CNVs integriert ist.

Zudem besteht bei NGS die Möglichkeit, z. B. über Gen-Panels, nicht nur *UBE3A* sondern zeitgleich auch andere, differentialdiagnostisch in Frage kommende Gene zu sequenzieren.

Bei Nachweis einer Mutation in *UBE3A* sollte zur Bestimmung des Wiederholungsrisikos eine DNA-Untersuchung bei der Mutter durchgeführt werden. Ist die detektierte Mutation nicht eindeutig als pathogene Mutation in den einschlägigen Mutationsdatenbanken (z. B. HGMD) aufgeführt, sollten zur Abklärung einer möglichen Pathogenität der Genveränderung zunächst beide Eltern und ggf. weitere Familienangehörige untersucht

werden. Grundsätzlich sollte bei Nachweis einer Genveränderung die maternale Herkunft abgeklärt werden. Bei einer vererbaren Mutation im *UBE3A*-Gen ist ein Wiederholungsrisiko von 50% bei weiteren Nachkommen der Mutter und möglicherweise ein erhöhtes Risiko für andere Familienangehörige gegeben. Im Rahmen einer Schwangerschaft kann bei bekannter Mutation eine pränatale Diagnostik angeboten werden.

## 6. Literatur

- Aguilera C, Viñas-Jornet M, Baena N, Gabau E, Fernández C, Capdevila N, Cirkovic S, Sarajlija A, Miskovic M, Radivojevic D, Ruiz A, Guitart M (2017) Novel intragenic deletions within the *UBE3A* gene in two unrelated patients with Angelman syndrome: case report and review of the literature. *BMC Medical Genetics* 18:137-143.
- Beleza-Meireles A, Cerqueira R, Sousa SB, Palmeiro A, Ramos L (2011) Novel deletion encompassing exons 5–12 of the *UBE3A* gene in a girl with Angelman syndrome *European Journal of Medical Genetics* 54:348–50
- Beygo, J, Buiting, K, Ramsden, SC, Ellis, R, Clayton-Smith, J, Kanber, D (2019) Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur J Hum Genet* 27, 1326-1340.
- Beygo, J, Grosser, C, Kaya, S, Mertel, C, Buiting, K, Horsthemke, B (2020) Common genetic variation in the Angelman syndrome imprinting centre affects the imprinting of chromosome 15. *Eur J Hum Genet*.
- Bieth E, Eddiry S, Gaston V, Lorenzini F, Buffet A, Conte Auriol F, Molinas C, Cailley D, Rooryck C, Arveiler B, Cavaillé J, Salles JP, Tauber M (2015) Highly restricted deletion of the *SNORD116* region is implicated in Prader-Willi Syndrome. *Eur J Hum Genet*. 23: 252-5.
- Boyes L, Wallace AJ, Krajewska-Walasek M, Chrzanowska KH, Clayton-Smith J, Ramsden S (2006) Detection of a deletion of exons 8-16 of the *UBE3A* gene in familial Angelman syndrome using a semi-quantitative dosage PCR based assay. *Eur J Med Genet*. 49: 472-480.
- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999). A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* 105(6):665-6.
- Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcolm S, Horsthemke B. Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome (2001) *Am J Hum Genet* 68: 1290-1294.
- Burger J, Horn D, Tonnies H, Neitzel H, Reis A (2002) Familial interstitial 570 kbp deletion of the *UBE3A* gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 111: 233-237.
- Chotai, KA, Payne, SJ (1998) A rapid, PCR based test for differential molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *J Med Genet*: 35, 472-475. Erratum in: *J Med Genet* 37: 399.
- De Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GS, O'Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AI (2009) A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* 18: 3257-3265.
- Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T (2010) Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the *SNORD116* C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 18: 1196-201.
- Fontana P, Graaso M, Acquaviva F, Gennaro E, Galli ML, Falco M, Scarano F, Scarano G, Lonardo F (2017) *SNORD116* deletions cause Prader-Willi syndrome with a mild phenotype and macrocephaly. *Clin Genet* 992:440-443.
- Goldstone AP, Mitchell C, Mountford S, Holder SE, Papadopoulou D, Bridges N, Blakemore AIF, Bewes B. A chromosome 11q11.2 microdeletion involving *SNORD116* with hypophagia, childhood-onset morbid obesity and hypogonadotrophic hypogonadism but without short stature, GH deficiency, mental retardation or developmental delay. 8<sup>th</sup> International PWS Conference, Cambridge, 2013.
- Horsthemke B, Lich C, Buiting K, Achmann R, Aulehla-Scholz C, Baumer A, Bürger J, Dworniczak B, Gläser 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-Mücke B, Varon-Mateeva R, Weinhäusel A, Weirich H (2003) Problems in detecting mosaic DNA methylation in Angelman syndrome. *Eur J Hum Genet* 11: 913-915
- Kubota, T., Aradhya, S., Macha, M., Smith, A., Surh, L.C., Satish, J., Verp, M.S., Nee, H.L., Johnson, A., Christan, S.J.J.o.m.g., 1996. Analysis of parent of origin specific DNA methylation at SNRPN and PW71 in tissues: implication for prenatal diagnosis. 33, 1011-1014.
- Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* 16: 16-17.
- Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Wada T, Kurosawa K (2014) Deletion of *UBE3A* in brothers with Angelman syndrome at the breakpoint with an inversion at 15q11.2. *Am J Med Genet Part A*, 164A: 2873-2878.