

# Diagnóstico rápido del síndrome de Prader-Willi y de Angelman mediante test de metilación por PCR

C. Huerta Rivas, A. Barabash Bustelo, J. Gallego Merlo, C. Ramos Corrales, A. Osorio Cabrero, M. Robledo Batanero, J. Benítez Ortiz

**Resumen.** *Introducción:* Los síndromes de Angelman (SA) y de Prader-Willi (SPW) son dos enfermedades neurogenéticas diferentes, causadas por una contribución genética materna deficiente en el caso del SA y paterna en el SPW de la región 15q11-13. El diagnóstico molecular de estas patologías puede realizarse por varias técnicas: análisis de polimorfismos de marcadores microsatélites, técnicas citogenéticas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) y test de metilación con técnicas de Southern Blot (SB), siendo esta la más fiable. Recientemente ha aparecido una técnica basada en el estudio de metilación, mediante tratamiento con bisulfito y posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por la rapidez y las ventajas que puede representar, esta técnica ha sido evaluada comparando los resultados con los obtenidos previamente por SB en un grupo de pacientes con sospecha de SPW y SA.

*Material y métodos:* ADN genómico de 70 pacientes con sospecha de SPW o SA. Test de metilación mediante SB, utilizando la sonda PW71B marcada radiactivamente. Test de metilación mediante PCR, tratamiento del ADN con bisulfito e hidroquinona y realización de PCR utilizando cebadores específicos para el alelo materno y paterno.

*Resultados y discusión:* De los 70 pacientes estudiados mediante PCR; 45 resultaron normales, 17 y 8 presentaron un patrón molecular alterado compatible con SPW y SA respectivamente. Al comparar estos resultados con los obtenidos previamente por SB la concordancia fue del 100%. Estos datos indican que la fiabilidad y especificidad de esta nueva técnica es muy elevada, presentando ventajas respecto al SB, al necesitar una menor cantidad de ADN y poder ser aplicada en neonatos para un diagnóstico de exclusión.

*An Esp Pediatr 1998;48:583-586.*

**Palabras clave:** Síndrome de Prader-Willi; Síndrome de Angelman; PCR; Test de metilación.

## RAPID DIAGNOSIS OF PRADER-WILLI AND ANGELMAN SYNDROMES BY MEANS OF METHYLATION TEST BY PCR

**Abstract.** *Objective:* Angelman (AS) and Prader-Willi (PWS) syndromes are two different neurogenetic diseases caused by a deficiency of maternal (AS) or paternal (PWS) contributions of the region 15q11-13. Molecular diagnosis of these pathologies can be accomplished by several techniques: DNA polymorphism (microsatellite) analysis, cytogenetic techniques of fluorescent in situ hybridization (FISH) and methylation test by Southern blot (SB), with the latter being the most reliable. Recently, a new technique, based on the study of methylation through treatment with sodium bisulphite and subsequent polymerase chain reaction (PCR), has

become available. We have evaluated this technique, comparing the results with those previously obtained by SB in a group of patients suspected of having PWS or AS.

*Patients and methods:* Genomic DNA from 70 patients with suspected PWS or AS was used. Methylation testing by SB was carried out using the probe PW71B labeled with radioactivity. For methylation testing by PCR the DNA was treated with sodium bisulphite and hydroquinone and PCR performed using specific primers for the maternal and paternal alleles.

*Results:* Of the 70 patients studied by PCR, 45 were normal, 17 and 8 showed altered molecular patterns that were compatible with PWS and AS, respectively. The concordance with the results obtained previously with SB was 100%.

*Conclusions:* These data suggest that the reliability of this new technique is very good and it has advantages compared to SB, since it requires a smaller quantity of DNA and can be applied for diagnosis in newborns.

**Key words:** Prader-Willi syndrome. Angelman syndrome. DNA methylation. PCR

## Introducción

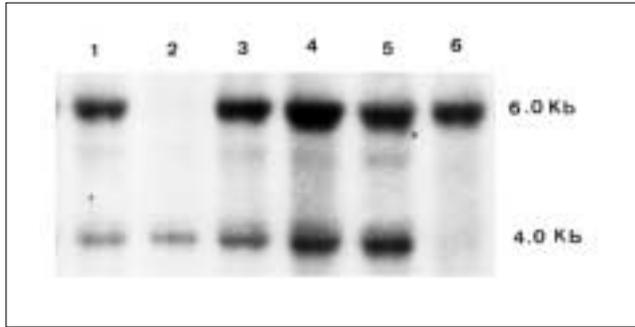
Los síndromes de Angelman (SA) y de Prader-Willi (SPW) son distintas enfermedades neurogenéticas causadas por una contribución genética deficiente materna en el caso del SA, o paterna en el SPW, del cromosoma 15. Los genes implicados están localizados en un dominio de 2 megabases (Mb) dentro de la región 15q11-13 regulados por expresión génica paterno/materno específica<sup>(1)</sup>.

El SPW presenta una incidencia de 1/10.000 a 1/25.000 recién nacidos vivos y está caracterizado clínicamente por presentar hipotonía grave, hiperfagia con obesidad, hipogonadismo y retraso mental<sup>(1)</sup>. Las anomalías genéticas que definen el SPW son: 1) deleción de la región 15q11-13 paterna (70% de los casos)<sup>(2)</sup>, 2) disomía uniparental materna (25%)<sup>(3,4)</sup> y 3) alteraciones en la metilación del ADN (5%)<sup>(5,6)</sup>.

El SA presenta una incidencia de 1/20.000 recién nacidos vivos. La clínica que presentan estos individuos incluye ausencia del lenguaje, convulsiones, microcefalia y retraso mental severo<sup>(7)</sup>. El SA puede estar causado por 4 tipos de alteraciones genéticas<sup>(8,9)</sup>: 1) deleción materna de 15q11-13 (70% de los casos), 2) disomía uniparental paterna (2%), 3) alteraciones en la metilación del ADN (3%) y 4) por mutaciones intragénicas de UBE3A (25%).

El diagnóstico de estas dos patologías se puede realizar por varias técnicas, tales como el análisis de polimorfismos de mar-

Departamento de Genética. Fundación Jiménez Díaz. Madrid  
*Correspondencia:* Dr. J. Benítez. Departamento de Genética.  
Fundación Jiménez Díaz. Avenida Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid  
*Recibido:* Noviembre 1997  
*Aceptado:* Febrero 1998



**Figura 1.** Southern Blot e hibridación con la sonda PW71B marcada radiactivamente. Línea 1, ADN control. Línea 2, paciente con Síndrome de Angelman. Líneas 3 a 5 individuos normales. Línea 6, paciente con Síndrome de Prader-Willi.

Las bandas de 6 y 4 Kb corresponden a los patrones normales de hibridación obtenidos en un individuo control que no tiene metilada la región 15q13. Cuando existe metilación de la región donde se localiza el gen responsable del S. Prader Willi o del S. de Angelman, la enzima HpaII que es sensible al estado de metilación, no digiere el ADN observándose únicamente una sola banda de 4Kb (línea 2) o de 6Kb (línea 6), según sea el diagnóstico de Angelman o de Prader Willi.

cadore microsatélites<sup>(10)</sup>, técnicas citogenéticas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH)<sup>(11,12)</sup>, o por el estudio de metilación de ADN en el locus PW71 (D15S63) mediante Southern Blot (SB) o “test de metilación”<sup>(10)</sup>. De todas ellas, la mayor sensibilidad y fiabilidad viene dada por el test de metilación. No obstante, esta técnica presenta una serie de desventajas, entre las que destacan la gran cantidad de ADN necesaria, la laboriosidad y el tiempo de espera que requiere la técnica de Southern Blot y la necesidad de trabajar con isótopos radiactivos. Por todo ello sólo contados laboratorios pueden desarrollar esta metodología diagnóstica.

Recientemente se ha desarrollado una técnica basada en la propiedad que tiene el ADN de modificar su secuencia de bases cuando se trata con bisulfito; en concreto la capacidad de convertir las citosinas en uracilos, excepto las que se encuentren metiladas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite entonces diferenciar el cromosoma paterno y materno según su estado de metilación al variar la secuencia que presenta<sup>(13-15)</sup>.

Debido a la rapidez de la PCR y a las implicaciones que podría tener para una detección precoz en recién nacidos, hemos llevado a cabo un estudio retrospectivo ciego en 70 pacientes con sospecha de SPW o SA, previamente estudiados en nuestro laboratorio con el test de metilación mediante SB<sup>(11)</sup>, para valorar la fiabilidad de esta nueva técnica.

## Material y métodos

### a) Test de metilación mediante Southern Blot

Se partió de ADN genómico extraído a partir de sangre periférica de 70 pacientes con sospecha de SPW o SA, con edades comprendidas entre 2 meses y 25 años, remitidos a nuestro servicio por distintos hospitales. (resultados parcialmente publicados<sup>(11)</sup>).

La extracción de ADN a partir de linfocitos de sangre periférica, así como la técnica de SB fueron llevados a cabo mediante métodos convencionales<sup>(16)</sup>.

Para el análisis de metilación por SB se realizó una doble digestión del ADN genómico con las enzimas de restricción Hind III y Hpa II (sensible al estado de metilación) y posterior hibridación con la sonda PW71B<sup>(17)</sup> (Fig. 1). En la figura 1 se muestra los resultados del test de metilación mediante SB, donde aparecen pacientes con un patrón normal de metilación (dos bandas), pacientes con SPW (únicamente la banda de 6,0 Kb) y pacientes con SA (con sólo la banda paterna de 4,0 Kb).

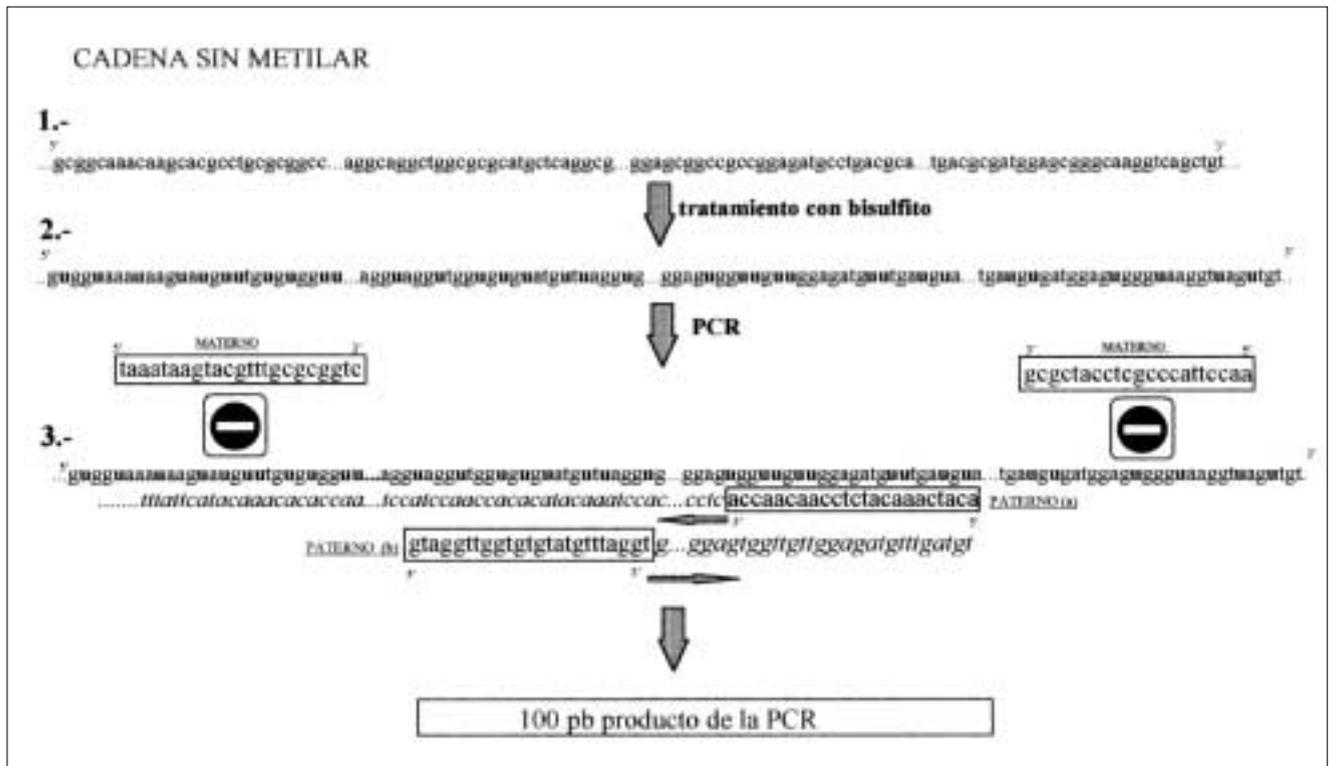
### b) Test de metilación mediante PCR: Tratamiento con bisulfito

El ADN genómico fue tratado con bisulfito sódico e hidroquinona como se ha descrito previamente<sup>(15)</sup>. 4 µg de ADN fueron desnaturalizados en una disolución de hidróxido sódico, e incubados a 55°C durante 16 horas en oscuridad con hidroquinona y bisulfito sódico (Sigma). Después del tratamiento, el ADN modificado se purificó usando el sistema “Wizard DNA clean-up” (Promega) y se realizó una PCR utilizando cebadores y condiciones previamente descritos<sup>(14)</sup>. El ADN es tratado con bisulfito siguiendo el protocolo de secuenciación genómica<sup>(15,18)</sup>, con lo que se consigue convertir las citosinas en uracilos, excepto aquellas que se encuentran metiladas las cuales permanecerán inalteradas. De este modo, variará la secuencia nucleotídica, pudiéndose diferenciar el ADN que se encuentra metilado del que no lo está. Esta diferencia en la secuencia permite realizar amplificaciones específicas para cada alelo<sup>(13,14,19)</sup>. (Fig. 2). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa Metaphor (FMC) al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Los individuos normales presentan las 2 bandas amplificadas (materna y paterna), los pacientes con SPW solo muestran la banda materna (174pb), y los pacientes con SA sólo la paterna (100pb). (Fig. 3).

## Resultados y discusión

De los 70 pacientes estudiados mediante PCR con sospecha de SPW o SA, 45 presentaron un patrón molecular normal, mientras que en 17 y 8 apareció un patrón alterado compatible con SPW y SA respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos con esta técnica con los hallados previamente con SB, la concordancia observada fue del 100%. Todos los pacientes que presentaron un patrón molecular alterado habían sido diagnosticados de SPW o SA mediante técnicas de SB. Los individuos con un patrón normal por PCR también lo fueron por SB. Estos resultados muestran la fiabilidad y especificidad de la técnica, así como la aplicación que tiene para el diagnóstico rápido y diferencial en recién nacidos, ya que aquellos con marcada hipotonía son susceptibles de ser estudiados para descartar un diagnóstico de SPW. Para estos casos, las técnicas que utilicen muy poca cantidad de sangre total están especialmente indicadas y en este sentido hemos realizado el test de metilación por PCR a partir de muestras de 500 µl



**Figura 2.** Representación esquemática del tratamiento con bisulfito y amplificación de la cadena no metilada. En la línea 1 se muestra parte de la secuencia que se quiere amplificar. En la línea 2 se observa la misma secuencia tras el tratamiento con bisulfito, en el que las citosinas no metiladas se han convertido en uracilos (en negrita). En la siguiente línea (3) se representa la reacción en cadena de la polimerasa. El cebador paterno (a) se une a su región homologa del ADN modificado y genera la hebra complementaria. A esta hebra complementaria generada se une el cebador paterno (b) formando una nueva cadena que servirá de molde para el cebador paterno (a). Este proceso se realiza varias veces (ciclos), generando un producto de 100 pb que puede visualizarse tras realizar una electroforésis. Los cebadores maternos no se pueden unir a esta cadena del ADN modificado, debido a que no son complementarios, son cebadores específicos para la hebra con citosinas metiladas (materna). En el caso que la cadena fuese la metilada los cebadores que se unirían serían los maternos generando un producto de 174 pb.

de sangre periférica obteniendo los mismos resultados que partiendo de una mayor cantidad de sangre (datos no mostrados), lo que demuestra la aplicación de la PCR específica de metilación para el diagnóstico precoz de estos síndromes.

Uno de los casos, previamente diagnosticado como SA por técnicas de SB, presentó una banda débil de 174pb (banda materna) al hacer el estudio por PCR. Esta misma observación ha sido descrita en uno de los tres trabajos previos<sup>(13)</sup>, sugiriendo la existencia de mosaicismo en estos individuos. Esta situación no sería detectada por SB y sí por PCR a partir de ADN modificado, por lo que la sensibilidad de esta última técnica sería mayor si cabe que la utilizada hasta el momento.

Según nuestra experiencia, la amplificación por PCR específica de metilación exige unos requerimientos concretos. En este sentido, la proporción de cebadores debe estar muy ajustada, para no tener problemas de amplificación alelo-específica. Así mismo, la cantidad de ADN resulta ser un parámetro crítico en la obtención de los resultados y debe ser ajustada antes de realizar la PCR.

En resumen, la fiabilidad del análisis de metilación por PCR a partir de ADN modificado parece demostrada. Al igual que el



**Figura 3.** Análisis por PCR de ADNs de individuos a estudio después de tratarlos con bisulfito. Línea 1, ADN control. Líneas 2,4,5 y 7, individuos normales. Línea 3, paciente con síndrome de Angelman. Línea 6, paciente con síndrome de Prader-Willi.

Southern Blot, la PCR es capaz de diagnosticar pacientes con SPW o SA independientemente de la alteración genética que los origine: deleciones, disomías uniparentales y defectos en la metilación, aunque ninguna de las dos técnicas puede distinguir entre estas alteraciones. Además, la PCR resulta ser más sensible en casos de individuos con bajo grado de metilación en mosaico, e introduce una clara ventaja al poder trabajar con muy poca cantidad de ADN, lo que le convierte en una técnica enor-

memente útil, sobre todo en el caso de recién nacidos en los que haya que descartar cualquiera de los dos síndromes.

## Agradecimientos

Ana Osorio es becaria de la Fundación Conchita Rábago.

## Bibliografía

- 1 Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993; **91**:398-402.
- 2 International Conference on Prader-Willi and other chromosome 15q deletion disorders (1991) Noordwijkerhout, The Netherlands.
- 3 Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalonde M. Genetic imprinting suggested by maternal uniparental heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989; **342**:281-285.
- 4 Robinson WP, Bottani A, Yagang X, et al. Molecular, cytogenetic, an clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1991; **49**:1219-1234.
- 5 Reis A, Dittrich B, Greger V, et al. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman an Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* 1994; **54**:741-747.
- 6 Buiting K, Dittrich B, Robinson WP, et al. Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications. *Hum Molec Genet* 1994; **3**:893-895.
- 7 Williams, CA. Et al. Angelman syndrome. *Curr Probl Pediatr* 1995; **25**:216-231
- 8 Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J: UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**:70-73.
- 9 Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Romment JM, Beaudet AL: De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**:74-77.
- 10 Kubota T, Sutcliffe JS, Aradhya S, Gillessen Kaesbach G, Christian SL, Horsthemke B, Beaudet AL, Ledbetter DH. Validation studies of SNRPN methylation as a diagnostic test for Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 1996; Dec 2, **66**(1):77-80.
- 11 Barabash A, Robledo M, Sanz R, Renedo M, Ramos C, Ayuso C, Benítez J. Estudio clínico, citogenético y molecular en 10 pacientes con síndrome de Prader-Willi. *Med Clin (Barc)* 1997; **108**:304-306.
- 12 Kokkonen H, Kähkönen M, Leisti J. A molecular an cytogenetic study in Finnish Prader-Willi patients. *Hum Genet* 1995; **95**:568-571.
- 13 Zeschngk 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* 1997; **5**:94-98.
- 14 Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nature Genet* 1997; **16**:16-17.
- 15 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of %-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:1827-1831.
- 16 Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- 17 Gillessen-Kaesbach G, Grob S, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B : DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1995; **32**:88-92.
- 18 Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M: High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**:2990-2997.
- 19 Zeschngk 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* 1997; **6**:387-395.