

ABSTRACT

Genetic Investigation in a Patient with Angelman Syndrome using MLPA and array CGH Techniques

Behrouz Ebrahimizadeh, Yousef Shafeghati, Navid Almadani, Roshanak Vameghi, Firouzeh Sajedi, Saghar Ghasemi Firouzabadi, Hossein Najmabadi, Roxana Kariminejad, Farkhondeh Behjati. *

Angelman syndrome is a complex genetic disorder that primarily affects the nervous system. Most cases of Angelman syndrome (about 70 percent) occur when a segment of the maternal chromosome 15(15q11-q13) is deleted. Characteristic features of this condition include delayed development, intellectual disability, severe speech impairment, and problems with movement and balance (ataxia).

In this report, an 8 year old boy with intellectual disability, convulsion, bursting laughter and motor impairment is presented. The patient was investigated using karyotyping, Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) and array Comparative Genomic Hybridization (aCGH). The karyotype was normal, while both MLPA and array CGH revealed a deletion of 15q11-13 region.

Key words: Angelman Syndrome; karyotype; MLPA; Comparative Genomic Hybridization.

*** Farkhondeh Behjati, PhD**

Genetic Research Center,
University of Social welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran,
Iran. Email: fbehjati@gmail.com

Submission Date: 21. Feb. 2012. • Acceptance Date: 4. May. 2012

نشانگان آنجلمن با استفاده از روش‌های MLPA و Array CGH

بهروز ابراهیمی‌زاده^۱، یوسف شفقتهی^۱، نوید المذنی^۲، روشنگر وامقی^۳، فیروزه ساجدی^۴، ساغر قاسمی فیروزآبادی^۱، حسین نجم‌آبادی^۱، رکسانا کریمی‌نژاد^۵، فرخنده بهجتهی^{*}

۱. مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران، ۲. دپارتمان ژنتیک پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی صادم، بیمارستان صادم، تهران، ایران، ۳. بخش مشاوره ژنتیک، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران، ۴. مرکز تحقیقات توانبخشی اعصاب اطفال، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران، ۵. مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی‌نژاد - نجم‌آبادی، تهران، ایران.

چکیده/ سندرم آنجلمن یک اختلال ژنتیکی پیچیده است که سیستم عصب مرکزی را گرفتار می‌کند. اغلب موارد سندرم آنجلمن (حدود ۷۰٪) زمانی رخ می‌دهد که یک قطعه از کروموزوم ۱۵ (q11-q13) مادری حذف می‌شود. علائم اصلی این سندرم شامل تاخیر تکامل، ناتوانی ذهنی، اختلال کلامی شدید و مشکلات حرکتی و تعادلی (آتاکسیا) می‌باشد. در این گزارش یک پسر بچه ۸ ساله با علائم ناتوانی ذهنی، تشنج، خنده اضافی و اختلال حرکتی در دست‌ها و پاها معرفی می‌گردد. این بیمار با استفاده از روش‌های کاریوتایپینگ، MLPA (Multiplex-Ligation dependent Probe Amplification) و Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت. کاریوتایپ نرمال بود در حالی که روش‌های MLPA و aCGH حذف 15q11-q13 را مشخص نمودند.

واژگان کلیدی: نشانگان آنجلمن؛ کاریوتایپ؛ هیپریدیزاسیون مقایسه‌ای میکروارایه ژنومی؛ MLPA

اختلالات گفتاری، ناتوانی ذهنی، تشنج، EEG غیر نرمال و حرکات آتاکسیک همراه است (۳). این اختلال ژنتیکی بوسیله جهش یا حذف در ژن UBE3A به ارث رسیده از مادر (آلل مادری) ایجاد می‌شود. ژن UBE3A، پروتیین یوبی کوییتین لیگاز E3 را کد میکند که این پروتیین در اغلب بافت‌های بدن توسط هردو آلل پدری و مادری بیان می‌شود ولی تقریباً در همه نرون‌ها بوسیله آلل مادری بیان می‌شود (۴).

معرفی مورد

پسر ۸ ساله‌ای با علائم تشنج، خنده اضافی، و حرکات غیر عادی دست‌ها جهت بررسی ژنتیک به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران ارجاع داده شد. وزن بیمار

مقدمه

نشانگان آنجلمن نخستین بار در سال ۱۹۹۶ توسط Harry Angelman توصیف شد و شیوع آن حدود یک مورد به ازای هر ۱۲۰۰۰ تولد است (۱ و ۲). نشانگان آنجلمن با تاخیر رشد،

* فرخنده بهجتهی، Ph.D

مرکز تحقیقات ژنتیک،

دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

Email: fbehjati@gmail.com

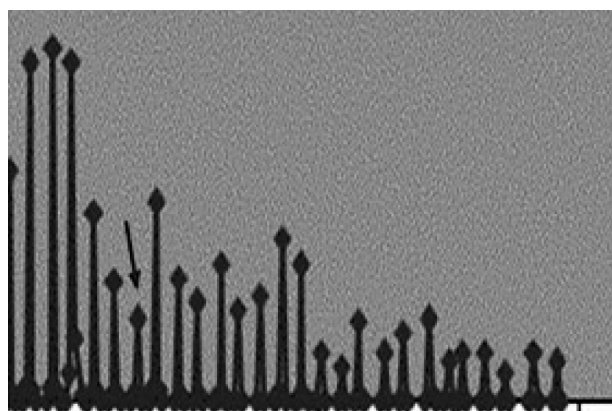
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۲ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۵

بررسی قرار گرفت که در نتیجه آن مشخص شد که این بیمار دارای حذف در ناحیه 13q11-q15 (ناحیه درگیر در سندرم آنجلمن و پرادر ویلی) است (شکل ۲).

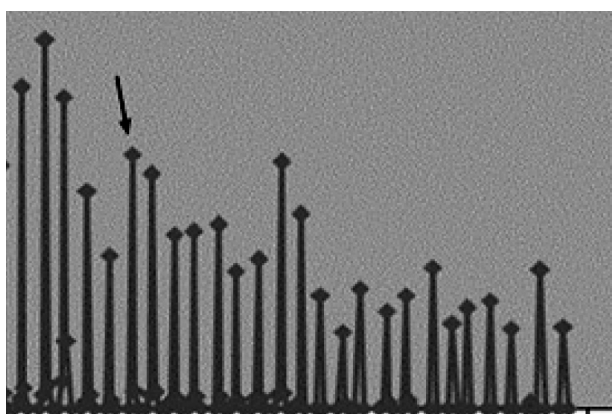
طبق بروشور کیت‌ها، کیت p036E1 در ناحیه 15q-cen دارای پروب برای ژن MKRN3 است و کیت P070B1 در این ناحیه دارای پروب برای ژن NDN می‌باشد، که هر دوی این ژن‌ها احصاراً در ایجاد سندرم پرادرویلی نقش دارند. این در حالی بود که علایم

هنگام تولد ۲/۹ کیلوگرم بوده است. وزن هنگام مراجعه ۲۵ کیلوگرم، قد ۱۲۴ سانتی‌متر و دور سر نیز ۵۱ سانتی‌متر بود. در معاینات بالینی که از این کودک بعمل آمد وی دارای تشنج، خنده اضافی، آلبنیسم پوست و مو، حرکات بدون کنترل دست و مشکل راه رفتن بود. (شکل ۱)

این بیمار ابتدا با روش GTG مورد بررسی سیتوژنتیکی قرار گرفت که نتیجه آن XY,46 و طبیعی بود. سپس باروش MLPA^۱ و با استفاده از دو کیت p036E1 و p070B1 برای نواحی ساب تلومریک، که توسط شرکت MRC از کشور هلند طراحی شده است مورد



292 392 492



292 392 492

شکل ۲. مقایسه fragment analysis بیمار (سمت راست) با فرد کنترل (سمت چپ). اندازه پیک بیمار برای ناحیه کروموزوم q11-13۱۵ کوتاه تر از فرد کنترل (نرمال) است.



شکل ۱. تصاویر بیمار

1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

به بالا، تمایل زیاد به آب، اختلال خواب و آبریزش از دهان (۵). بیمار گزارش شده اکثر علائم بالینی فوق را دارا بود. در اغلب موارد آنجلمن بوسیله جهش‌ها یا حذف‌هایی در ژن UBE3A ای که از مادر به ارث رسیده ایجاد می‌شود (۸-۶).

از آنجایی که آلل پدری UBE3A از طریق مکانیزم ایمپرینتینگ^۲ و متیلاسیون در اغلب نوروها (نه در همه بافت‌ها) خاموش می‌باشد (۹-۱۲)، لذا غیر فعال شدن آلل مادری UBE3A به فقدان کامل و انحصاری پروتیین UBE3A در مغز می‌انجامد (۱۳-۱۲). آنجلمن در حدود ۷۵٪ موارد ناشی از حذف (به اندازه حدود 6 Mb در جایگاه q13-q11) می‌باشد، یعنی ناحیه‌ای که ژن UBE3A آنجا قرار دارد و در ۱۵٪ موارد تنها آلل مادری این ژن دارای جهش است (۱۴) که این مسأله دلالت بر این دارد که از دست رفتن انحصاری عملکرد UBE3A در مغز می‌تواند عامل اغلب فنو تیپ‌ها و علایم آنجلمن باشد.

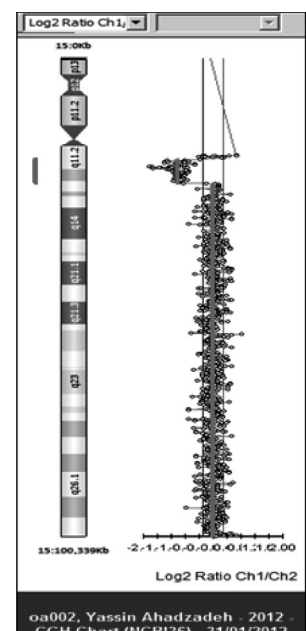
در موارد کمی (حدود ۴-۲٪)، آنجلمن ناشی از ریز حذف‌هایی^۳ است که بر ایمپرینتینگ در لوکوس 15q11-q13 تاثیر می‌گذارد. در ۷٪ موارد نیز آنجلمن ناشی از دیزومی تک والدی^۴ پدری می‌باشد، یعنی حالتی که هر دو کپی ژن از پدر به ارث می‌رسند و هردو نیز با مکانیزم ایمپرینتینگ به حالت خاموش هستند (۱۶-۱۵).

هنگامی که یک ژن UBE3A جهش یافته در یک خانواده به ارث میرسد، افرادی که جهش را به ارث می‌برند ممکن است به آنجلمن مبتلا شوند، در حالیکه برخی دیگر از دارندگان جهش می‌توانند سالم باشند. توارث یک جهش در ژن UBE3A از پدر هیچ تاثیر آشکاری بر فرزندان ندارد، چون این بچه‌ها یک آلل نرمال نیز از مادر به ارث می‌برند، که این آلل مادری بیان می‌شود، با این وجود دختران ناقل این فرد می‌توانند جهش را به بچه‌ها منتقل کنند (۱۷).

تست تشخیصی برای آنجلمن می‌تواند پیچیده باشد. یک رویکرد با بررسی متیلاسیون DNA ناحیه‌ی مرکز ایمپرینتینگ^۵ برای آنجلمن شروع می‌شود. متیلاسیون DNA هنگامی در AS

بالینی بیمار با سندرم آنجلمن مطابقت داشت. لذا برای بررسی بیشتر با استفاده از محصولات شرکت Blue Genome، تست whole genome oligo array بر روی نمونه‌ی بیمار انجام شد (شکل ۳)، که در نتیجه آن مشخص شد که فرد در این ناحیه کروموزومی (-15q cen) دارای یک حذف بزرگ به اندازه 4.9Mb می‌باشد که شامل تعداد زیادی ژن منجمله UBE3A است که نقش اصلی را در ایجاد نشانگان آنجلمن دارد.

ناحیه حذف شده



شکل ۳. Whole Genome Oligo Array (WGOA) plot ناحیه حذف شده (15q11-q13) در شکل مشخص می‌باشد.

بحث

در نشانگان آنجلمن برخی علایم در همه بیماران یافت می‌شود که شامل موارد زیر می‌باشند: تاخیر تکاملی، اختلال در تکلم، اختلال در حرکت و تعادل، و شیوه رفتاری خاص: ترکیبی از خنده یا لبخند، ظاهر سرخوش، شخصیت تحریک‌پذیر و غالباً با حرکت دست‌ها و تمرکز کوتاه. برخی علایم بالینی در ۸۰ درصد موارد دیده می‌شود: رشد دوسر نامتناسب و با تاخیر، تشنج با شروع زیر ۳ سالگی، نوار مغز غیر طبیعی و خاص. برخی علایم که در ۸۰-۲۰٪ مواد دیده می‌شود:

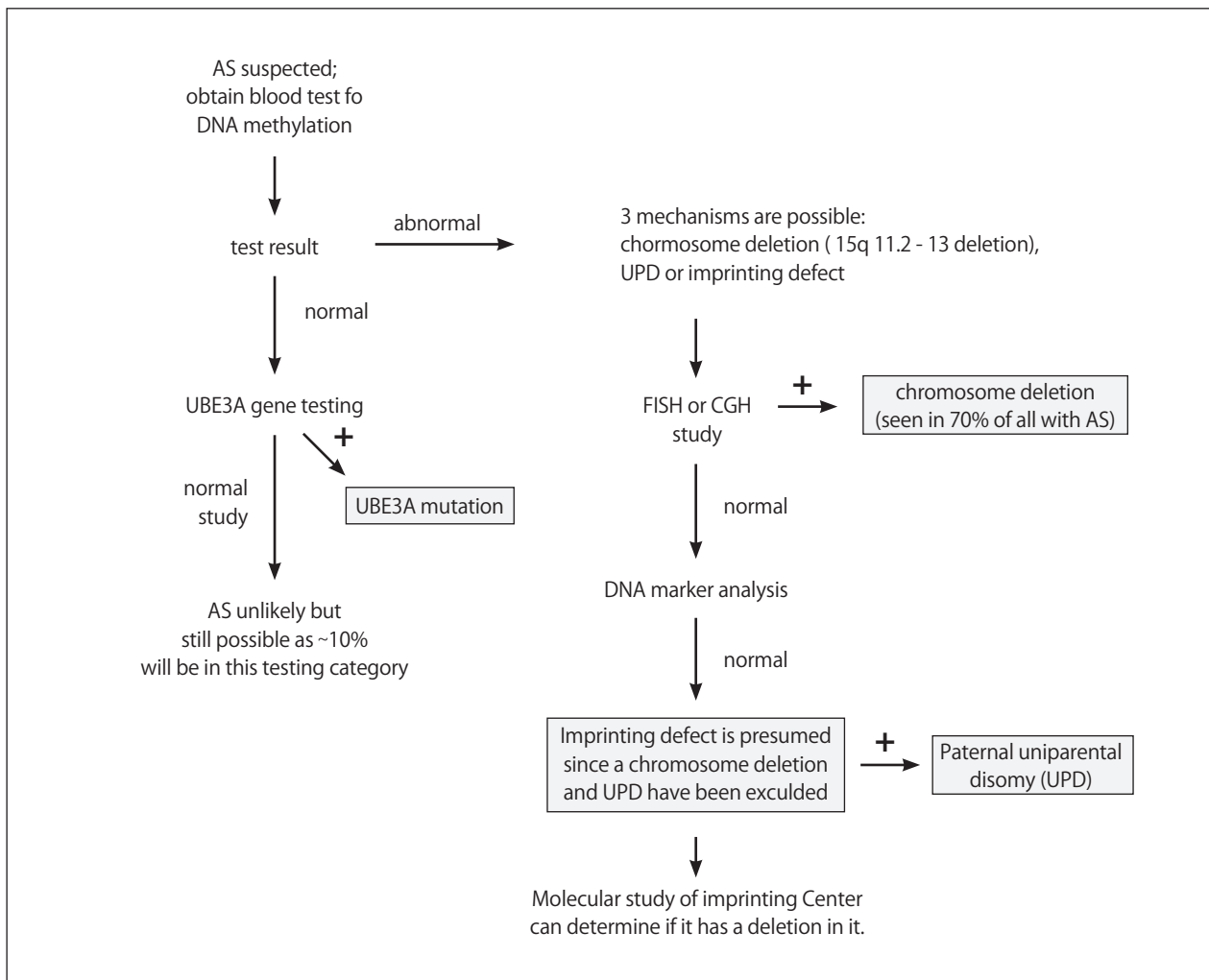
لوچی، رنگ روشن پوست و چشم، بیرون آوردن زبان و اختلالات بلع، مشکلات تغذیه در شیرخوارگی، افزایش حساسیت به گرما، دندان‌های با فاصله، دست‌ها در حالت خمیده از آرنج و رو

2. Imprinting
3. Microdeletions
4. Uniparental Disomy
5. Imprinting Center

(کمتر از 4 Mbp در اکثر مواقع نمی‌باشد همانطور که در مورد بیمار گزارش شده نشان داده شد. این درحالی‌است که از روش‌های MLPA و array CGH می‌توان برای تشخیص این موارد استفاده نمود. دو روش فوق حذف ناحیه 13q11-15 را نشان دادند و نشانگان آنجلمن را در بیمار تایید نمودند. ■

می‌تواند مثبت باشد که یکی از این ۳ مکانیزم وجود داشته باشد: ۱. جهش کروموزومی ۲. دیزومی تک والدی ۳. نقص در مرکز ایمپرینتینگ (IC). برای تشخیص هر یک از این حالت‌ها می‌توان مطابق الگوریتم زیر عمل کرد (۱۷). روش کاریوتایپ قادر به تشخیص ریزحذف‌ها

Diagnostic Test Pathway



References / منابع

1. Bower, B.D. and Jeavons, P.M. (1967) The "happy puppet" syndrome. *Arch. Dis. Child.* 42, 298–302
2. Steffenburg S, Gillberg CL, Steffenburg U, Kyllerman M. (1996) Autism in Angelman syndrome: a population-based study. *Pediatr. Neurol.* 14, 131–136
3. Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA et al. (2006) Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 413–418
4. Mabb AM, Judson MC, Zylka MJ, Philpot BD. (2011) Angelman syndrome : Insights into genomic imprinting and neurodevelopmental phenotypes. *Neurosciences*, 2011, vol, 34, No. 6
5. Clayton-Smith J, Lean L. Angelman syndrome : a review of the clinical and genetics aspect. *J Med Genet* 2003 ; 40 : 87-95
6. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15, 70–73
7. Sutcliffe JS, Jiang YH, Galijaard RJ, Matsuura T, Fang P, Kubota T. (1997) The E6-AP ubiquitin-protein ligase (UBE3A) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res.* 7, 368–377
8. Toshinobu Matsuura, James S. Sutcliffe, Ping Fang, Robert-Jan Galjaard, Yong-hui Jiang, Claudia S. Benton. (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15, 74–77
9. Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalonde M. (2004) Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res.* 32, 3480–3492
10. Runte M, Hüttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. (2001) 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.* 10, 2687–2700
11. Runte M, Kroisel PM, Gillissen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. (2004) SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum. Genet.* 114, 553–561
12. Urs Albrecht, James S. Sutcliffe, Bruce M. Cattanach, Colin V. Beechey, Dawna Armstrong, Gregor Eichele & Arthur L. Beaudet. (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat. Genet.* 17, 75–78
13. Yong-hui Jiang, Ting-Fen Tsai, Jan Bressler and Arthur L Beaudet. (1998) Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 334–342
14. Williams CA, Driscoll DJ, D'Agli AI. (2010) Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genet. Med.* 12, 385–395
15. A Lossie, M Whitney, D Amidon, H Dong, P Chen, D Theriaque, A Hutson, R Nicholls, R Zori, C Williams, and D Driscoll. (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J. Med. Genet.* 38, 834–845
16. Buiting K, Gross S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B. (1998) Expressed copies of the MN7 (D15F37) gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet. Cell Genet.* 81, 247–253
17. <http://www.angelman.org> (2011)