

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Angelmanův syndrom – etiologie a klinický obraz
onemocnění

Vedoucí bakalářské práce: Ing. *et* Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Karolína Holečková

České Budějovice, 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína HOLEČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z13178**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Angelmanův syndrom - etiologie a klinický obraz onemocnění**
Zadávající katedra: **Katedra zootechnických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Angelmanův syndrom neboli tzv. Syndrom šťastného dítěte (Angelman syndrome, Happy puppet syndrome) je vzácné geneticky podmíněné onemocnění popsané již v roce 1965 anglickým lékařem Harrym Angelmanem. Jde nejčastěji o mikrolečňní syndrom, způsobený delecí v úseku 15q11-13 na maternálním chromozomu. Onemocnění je charakterizováno zejména málo rozvinutou řečí, těžkou mentální retardací, motorickými problémy a bezdůvodnými záchvaty smíchu. Cílem bakalářské práce je zpracovat literární přehled zabývající se problematikou Angelmanova syndromu podmíněného mutačními změnami v genomu.

Bakalářská práce bude zpracována formou rešerše a bude reflektovat poznatky jak tuzemských, tak i zahraničních autorů. V literární rešerši pojednejte o všech dosud známých mutacích podmiňujících vznik tohoto onemocnění, o klinické manifestaci choroby a o možnostech její diagnostiky pomocí molekulárně biologických metod. Při zpracování práce dbejte na etická pravidla.

Rozsah grafických prací: dle požadavků vedoucího práce

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

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

Horváth E., Horváth Z., Isaszegi D., Gergev G., Nagy N., Szabó J., Sztriha L., Széll M., Endreffy E., 2013. Early detection of Angelman syndrome resulting from de novo paternal isodisomic 15q UPD and review of comparable cases. *Mol Cytogenet.*, 6 (1): 35.

Neubert G., von Au K., Drossel K., Tzschach A., Horn D., Nickel R., Kaindl A.M., 2013. Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2-q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion. *Gene*, 10; 512 (2): 453-5.

Thibert R.L., Larson A.M., Hsieh D.T., Raby A.R., Thiele E.A., 2013. Neurologic manifestations of Angelman syndrome. *Pediatr Neurol.*, 48 (4) :271-9.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. et Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.

Katedra zootechnických věd

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2016



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice



doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 30. března 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma Angelmanův syndrom zpracovala samostatně s použitím pramenů a literatury uvedených na seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 16. 4. 2016

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Ing. *et* Ing. Boženě Hosnedlové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, připomínky a pomoc při řešení problémů. Také děkuji všem, kteří mě během studia podporovali.

ABSTRAKT

Angelmanův syndrom (Angelman syndrome, Happy puppet syndrome, Syndrom šťastného dítěte) je vzácné geneticky podmíněné onemocnění. Jedná se o mikroleční syndrom, způsobený nejčastěji delecí v úseku 15q11-q13 na maternálním chromozomu, nebo uniparentální dizomií otcovského 15. chromozomu, případně jinou mutací (např. mutací genu *UBE3A*). Angelmanův syndrom byl poprvé popsán v roce 1965 anglickým pediatrem Harrym Angelmanem. Odhaduje se, že se toto onemocnění vyskytuje u 1 z 10 000 až 30 000 jedinců. Syndrom je charakterizován těžkou mentální retardací, málo rozvinutou řečí nebo nemluvností (uplatňuje se spíše neverbální projev), motorickými problémy (strnulá chůze, trhavé pohyby připomínající loutku), veselou náladou a bezdůvodnými záchvaty smíchu. Přibližně v 80 % případů se vyskytují epileptické záchvaty, poruchy pozornosti, abnormální EEG, hypotonie nebo mikrocefalie.

Klíčová slova: Angelmanův syndrom, delece maternálního chromozomu, uniparentální dizomie, mutace genu *UBE3A*, mentální retardace

ABSTRACT

Angelman syndrome (Happy puppet syndrome) is a rare genetic disease. It is a microdeletion syndrome, mostly caused by maternal deletion of chromosome 15q11-q13, or by paternal uniparental disomy of chromosome 15, or by other mutation (for example mutations in *UBE3A* gene). Angelman syndrome was first described in 1965 by Harry Angelman, an English pediatrician. It is estimated that this disease occurs in 1 in 10 000 to 1 in 30 000 individuals. The syndrome is characterised by severe mental retardation, underdeveloped speech or absent speech (rather nonverbal expression is used), motor skills problems (stiff walk, jerky movements reminiscent of puppet), happy mood and unreasonable fits of laughter. There are epileptic seizures, attention deficit disorder, abnormal EEG, hypotonia or microcephaly in approximately 80 % of cases.

Key words: Angelman syndrome, deletion of maternal chromosome, uniparental disomy, mutations in *UBE3A* gene, mental retardation

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL	11
3	HISTORIE ANGELMANOVA SYNDROMU	12
4	ETIOLOGIE ANGELMANOVA SYNDROMU	15
4.1	Maternální <i>de novo</i> delece chromozomu 15q11-q13	15
4.2	Paternální uniparentální dizomie chromozomu 15q11-q13	17
4.3	Porucha imprintingu	18
4.4	Mutace genu <i>UBE3A</i>	19
4.5	Prozatím neidentifikované abnormality chromozomu 15	20
5	KLINICKÁ MANIFESTACE ANGELMANOVA SYNDROMU	21
5.1	Tělesné abnormality	21
5.2	Poruchy řeči	22
5.3	Typické chování	23
5.4	Epileptické záchvaty	23
5.5	Abnormální EEG	24
5.6	Porucha rytmu spánku a bdění	25
6	KOMPLIKACE PŘI NUTNOSTI HOSPITALIZACE	26
7	DIAGNOSTIKA ANGELMANOVA SYNDROMU	27
7.1	Chromozomální analýza	29
7.2	Analýza metylace	30
7.3	CGH	30
7.3.1	Array CGH	31
7.4	FISH analýza	31
7.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	33
7.5.1	Real time PCR	35
7.5.2	MS-PCR	35
7.6	Sekvenování DNA	35
7.7	Magnetická rezonance (MRI) a počítačová tomografie (CT)	37
8	MOŽNOSTI LÉČBY ANGELMANOVA SYNDROMU	38
9	ZÁVĚR	40

10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
11	SEZNAM ELEKTRONICKÝCH ZDROJŮ	49
12	ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK.....	50
13	SEZNAM ZKRATEK	52

1 ÚVOD

Geneticky podmíněných onemocnění se v lidské populaci vyskytuje celá řada. A mnoho z nich je dosud předmětem vědeckého bádání. Mezi ně patří i Angelmanův syndrom, který se řadí mezi vzácná geneticky podmíněná onemocnění. Vyskytuje se u 1 z 10 000 až 30 000 jedinců. Jeho výskyt byl zaznamenán na celém světě. V České republice bylo diagnostikováno pouze několik desítek dětí s tímto onemocněním, ale podle odhadů zde může žít až 300–600 takových jedinců (Hladíková *et al.*, 2012). Rozdíly v těchto údajích jsou často zapříčiněny chybnou nebo nejednoznačnou determinací onemocnění. Podmínkou diagnostikování Angelmanova syndromu je provedení genetických testů, avšak jejich výsledky jsou často zaměňovány s jiným druhem onemocnění, například autismem. Angelmanův syndrom nelze rozpoznat u velmi malých dětí, ke stanovení diagnózy dochází obvykle mezi 3. a 7. rokem života.

Tomuto tématu je třeba věnovat pozornost, neboť většina lidí o existenci tohoto onemocnění vůbec neví, nebo o něm pouze zaslechla. Ale jak se projevuje navenek a jakou péči takové dítě potřebuje, netuší. Dostatečná informovanost veřejnosti přitom může omezit tázavé pohledy na takto nemocné dítě a zabránit tak vyvolávání nepříjemných pocitů u jeho rodičů. Povědomí o tomto onemocnění může napomoci jeho včasnému rozpoznání. Důležitá je především informovanost rodičů, jelikož vedle lékařů jsou to právě oni, kdo by si jako první měli povšimnout i sebemenších změn v chování, vyjadřování a fyzickém vzhledu svého dítěte. Získat povědomí o této nemoci není příliš složité. Existují i webové stránky s touto tematikou, např. www.angelman.cz, kde se lze s tímto syndromem seznámit. Problémem ale je, že individuální projevy se mohou od obecně popisovaného klinického obrazu onemocnění lišit.

Pro rodiče již diagnostikovaných pacientů je prospěšné, pokud mají možnost setkat se s jinými rodiči, kteří rovněž pečují o dítě s Angelmanovým syndromem. Mohou se navzájem svěřit se svými zkušenostmi a novými poznatky a také doporučit, co na jejich dítě působí pozitivně a co naopak negativně. Tyto rodiny si také mohou vzájemně poskytovat určitou formu podpory. Takové setkání ale není příliš snadné realizovat, neboť jednotlivé rodiny o sobě mnohdy ani nevědí.

2 CÍL

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární přehled zabývající se problematikou Angelmanova syndromu. Práce pojednává o historii onemocnění, jeho genetické podstatě, klinické manifestaci, metodách detekce a případných možnostech léčby či alespoň zmírnění příznaků onemocnění.

3 HISTORIE ANGELMANOVA SYNDROMU

Angelmanův syndrom (AS), někdy též nazývaný syndrom šťastného dítěte, je vzácné geneticky podmíněné onemocnění. V minulosti se pro jeho označení používaly také termíny jako např. šťastná loutka (Happy puppet) nebo andělské dítě (Angel child).

AS byl poprvé popsán v roce 1965 anglickým pediatrem Harrym Angelmanem (Obr. 1), který ve své práci vyobrazil tři děti s těžkým mentálním postižením, epileptickými záchvaty, s charakteristickým EEG (electroencephalogram, elektroencefalogram), absencí řeči, trhavými pohyby a šťastnou náladou. U všech tří dětí byla také pozorována hypopigmentace, tj. tvorba světlých depigmentovaných skvrn v pokožce. Tento stav je nyní znám jako Angelmanův syndrom (Clayton-Smith, 2001).



Obr. 1: Harry Angelman

Zdroj: <http://www.seslhd.health.nsw.gov.au>

Harry Angelman popsal svůj objev následovně: *„Historie medicíny je plná zajímavých případů, kdy byla odhalena nějaká nemoc. Sága Angelmanova syndromu je jedním z nich. Je to více než třicet let, kdy jsem se v rámci své pedagogické praxe setkal v různém čase se třemi postiženými dětmi. Měly spoustu postižení a na první pohled by se mohlo zdát, že jejich hendikep má různé příčiny, já jsem však cítil,*

že je něco spojuje. V té době bylo velmi obtížné příčinu diagnostikovat, neboť diagnostické metody byly „chabé“. Tehdy jsem nebyl schopen podat vědecký důkaz, že je příčina postižení u všech stejná. Napsal jsem článek do vědeckého časopisu věnovaného medicíně. Na své dovolené v Itálii jsem si v muzeu Castelveccchio ve Veroně všiml staré olejomalby* - na obrázku byl malý usměvavý chlapec, který si hraje s loutkou (Obr. 2). V tom momentě mě napadlo, že tyto děti charakterizuje těžká, nemotorná chůze, mávajících ruce a úsměv, tak jak je tomu u loutek, a proto vznikl název „happy puppet“ (<http://angelman.cz/>¹).



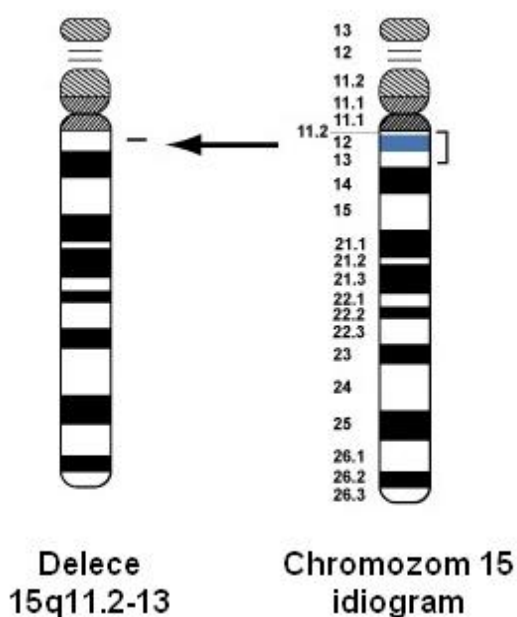
Obr. 2: Portrét chlapce, držícího dětskou kresbu (na kresbě je chlapec, hrající si s loutkou)

Zdroj: <https://it.wikipedia.org>

* Autorem obrazu *Ritratto di bambino con disegno* (Portrait of a Young Boy holding a child's drawing) z roku 1515 je Giovanni Francesco Caroto, renesanční malíř. Klíčová je kresba, nikoliv chlapec, který ji drží.

Za specifickou chorobu byl AS uznán na začátku 80. let 20. století (Hathaway and Courant, 2004).

V roce 1987 Magenis *et al.* identifikovali delecí na chromozomu 15q11-q13 (Obr. 3) u dvou pacientů s AS a ukázali, že syndrom může být způsoben odlišnými genetickými mechanizmy, které zahrnují tuto imprintovanou oblast genomu. Všechny tyto mechanizmy ovlivňují expresi maternálního genu pro ubikvitin ligázu E3A (*UBE3A*), který leží na lokusu 15q11-q13 (Magenis *et al.*, 1987 in Clayton-Smith and Laan, 2003). Gen *UBE3A* byl poprvé izolován v roce 1997 (<http://cidd.unc.edu/>).

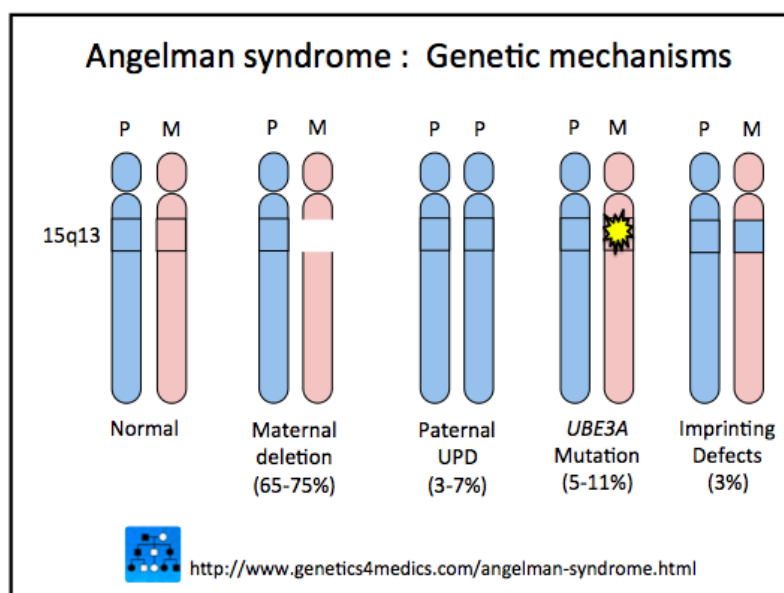


Obr. 3: Delece v chromozomální oblasti 15q11-q13

Zdroj: <http://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/>

4 ETIOLOGIE ANGELMANOVA SYNDROMU

AS je vzácné geneticky podmíněné onemocnění, které je nejčastěji způsobeno *de novo* maternální delecí chromozomu 15q11-q13, a to přibližně v 70–90 % případů. Může být ale způsobeno i paternální uniparentální dizomií (UPD) chromozomu 15q11-q13 (3–7 %), poruchami imprintingu (2–4 %) nebo mutací v genu *UBE3A* (přibližně 10 %) (Neubert *et al.*, 2013). Kromě těchto čtyř mechanismů vzniku AS (Obr. 4) stále existuje skupina pacientů s fenotypem tohoto onemocnění, u níž nebyly zjištěny žádné abnormality chromozomu 15 (Clayton-Smith and Laan, 2003).



Obr. 4: Genetické mechanismy vedoucí ke vzniku Angelmanova syndromu

Zdroj: <http://genetics4medics.com/>

4.1 Maternální *de novo* delece chromozomu 15q11-q13

Nejčastějším genetickým mechanismem, který se podílí na výskytu AS, je delece (mikrodelece). K delecí dochází na 15. maternálním chromozomu v úseku

11 až 13 delšího ramene. Delece ve stejné oblasti paternálního 15. chromozomu se projevuje jako Prader-Williho syndrom (Horváth *et al.*, 2013).

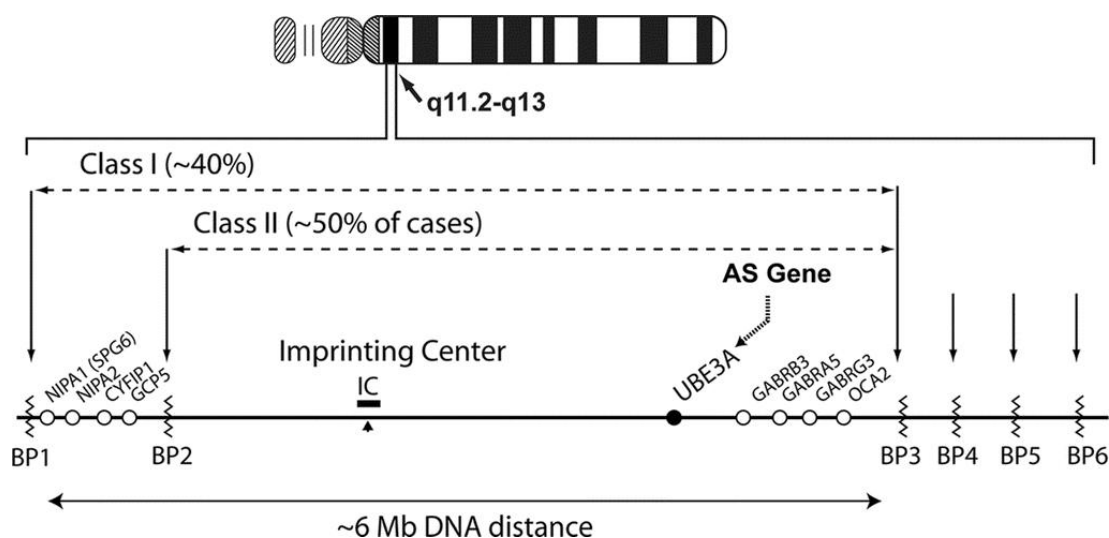
Většina delecí vzniká *de novo*, je maternálního původu a má přibližně stejnou velikost, obvykle okolo 4 Mb (megabase; megabáze) (Clayton-Smith and Laan, 2003). Podle Sahoo *et al.* (2007) se jejich velikost pohybuje okolo 6 Mb. Tito dále detekovali u čtyř pacientů s AS čtyři nové a neobvykle velké delece v chromozomové oblasti 15q11-q13. U prvního pacienta (chlapce) byla zjištěna delece o velikosti 7,1 Mb ve věku 18 měsíců. U druhého pacienta (chlapce) byla diagnostikována delece o velikosti 8,9 Mb ve věku 9 měsíců. Delece byla zjištěna metodou FISH (Fluorescence *in situ* hybridization, fluorescenční *in situ* hybridizace). Třetímu pacientovi (chlapci) byla diagnostikována delece o velikosti 9,4 Mb ve věku 7 měsíců. Doposud největší zjištěná delece, jejíž velikost byla 10,68 Mb, byla detekována u děvčete ve věku 7 měsíců. U všech čtyř pacientů byla zaznamenána svalová hypotonie a epileptické záchvaty, u tří pacientů problémy s krmením. Velké delece maternálního 15. chromozomu mají obvykle za následek závažnější fenotyp (Horváth *et al.*, 2013). Pacienti s delecí mají obvykle závažnější fenotyp než ti s uniparentální dizomií a poruchou imprintingu (Bonati *et al.*, 2007). Duplikace v oblasti 15q11.2-13 na maternálním chromozomu mohou způsobovat autismus (Dagli *et al.*, 2011).

Až v 90 % případů výskytu AS způsobeného *de novo* delecí jsou v oblasti 15q11.2-q13 obsaženy tři zlomové body (breakpointy, BP), proximální BP1 a BP2 a vzdálenější BP3 (Dagli *et al.*, 2011). Delece se rozdělují do tří tříd podle vzdálenosti zlomových bodů. Delece I. třídy tvoří okolo 40 % případů delecí. Tyto delece se rozšiřují z BP1 do BP3. Delece II. třídy tvoří okolo 50 % a rozšiřují se z BP2 do BP3. Delece III. třídy tvoří méně než 10 % případů. Tato třída může mít delecí rozšířenou z BP1/BP2 do vzdálenějších oblastí BP4, BP4A, BP5 a BP6 (Obr. 5). Oblasti BP1, BP2 a BP3 jsou charakterizovány sekvencemi o nízkém počtu repetitivních (low copy repeats, LCRs), které obsahují opakování několika pseudogenů a dalších exprimovaných sekvencí.

Sahoo *et al.* (2007) rozdělují delece do dvou tříd na základě jejich velikosti. Delece I. třídy mají velikost ~6,8 Mb, delece II. třídy ~6,0 Mb. Bylo zjištěno, že jedinci s větší delecí (třída I.) mají vyšší pravděpodobnost vzniku autismu, mají horší

kognitivní a expresivní jazykové dovednosti a musí užívat více léků ke kontrole epileptických záchvatů v porovnání s jedinci s méně rozsáhlou delecí (třída II.).

Delece mohou být detekovány metodou FISH a metylační analýzou (MS-PCR) lokusu *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N; gen kódující jeden polypeptid z malého jaderného ribonukleoproteinového komplexu) (Clayton-Smith and Laan, 2003).



Obr. 5: Schématické znázornění chromozomální oblasti 15q11.2-13 indukující oblasti bodů zlomů BP1–BP6

Zdroj: <http://www.nature.com/>

4.2 Paternální uniparentální dizomie chromozomu 15q11-q13

Uniparentální dizomie (UPD) je jev, při kterém jsou oba chromozomy 15 zděděny pouze od jednoho rodiče (Čapková *et al.*, 2005). Při vzniku AS v důsledku paternální uniparentální dizomie chromozomu 15 se u jedinců nepodaří zdědit maternální kopii genu *UBE3A*. Jedinci s touto příčinou AS mají mírnější projevy onemocnění s nižším počtem záchvatů (Dagli *et al.*, 2011) a menším výskytem pohybových abnormalit a ataxie (Bevinetto and Kaye, 2014). U jedinců s UPD se doporučuje provést chromozomální analýzu, která má za cíl zjistit, zda jedinci nemají paternálně zděděnou Robertsonskou translokaci. Pokud se u jedinců s UPD

nevyskytuje Robertsonská translokace, pravděpodobnost výskytu AS u sourozenců je nižší než 1 % (Dagli *et al.*, 2011).

4.3 Porucha imprintingu

Genetický imprinting je proces regulace transkripce založený na specifické rodičovské dědičnosti. Jedna alela, buď maternálně nebo paternálně zděděného chromozomu zůstává aktivní, zatímco homologní alela zděděná od druhého rodiče je epigeneticky potlačena. Řada genů v chromozomální oblasti 15q11-q13 je imprintována, včetně *UBE3A* genu, který je vystavován imprintingu v centrálním nervovém systému. Paternální kopie *UBE3A* genu je epigeneticky potlačena díky odlišné metylaci imprintingového centra, zatímco maternální alela zůstává aktivní. Angelmanův syndrom vzniká jako důsledek ztráty exprese maternálního *UBE3A* genu. Protože je paternální alela v neuronech potlačena, ztráta exprese *UBE3A* genu z maternální alely má za následek deficit tohoto genu v centrálním nervovém systému (Thibert *et al.*, 2013).

Buiting *et al.* (1995) identifikovali a definovali uvnitř 15. chromozomu imprintingové centrum. Toto centrum má bipartijní strukturu a reguluje strukturu chromatinu, metylaci DNA a genovou expresi. Porucha imprintingu může být způsobena například delecí v imprintingovém centru. Podle Dagli *et al.* (2011) byly delece v imprintingovém centru zjištěny pouze u malého procenta pacientů s AS s poruchou imprintingu. V naprosté většině případů vzniká porucha imprintingu primární epimutací bez změny v sekvenci DNA. Dagli *et al.* (2011) dále naznačují, že se u pacientů s primární epimutací může imprintingová chyba vytvořit na základě chyby při vzniku imprintingu v ženské zárodečné linii nebo může vzniknout při udržování imprintingu v embryonální fázi vývoje, což vede k somatickému mozaicismu. Mozaicismus se vyskytuje přibližně ve 20 % případů pacientů s poruchou imprintingu. Pacienti s poruchou imprintingu mají podobně jako ti s UPD mírnější projevy onemocnění (Bevinetto and Kaye, 2014). Margolis *et al.* (2015) jsou přesvědčeni, že lepší porozumění mechanismům imprintingu může přinést nové možnosti léčby tohoto onemocnění.

4.4 Mutace genu *UBE3A*

Gen *UBE3A*, lokalizovaný na 15. chromozomu, byl identifikován v roce 1997. Je kandidátním genem pro AS. Sekvence *UBE3A* genu je dlouhá 120 kb a skládá se ze 16 exonů (Camprubí *et al.*, 2009). Tento gen produkuje E6 asociovaný protein (E6-associated protein, E6AP), který působí jako buněčný enzym E3 (ubikvitin ligáza). Gen *UBE3A* je exprimován v neuronech pouze z maternální alely, zatímco paternální alela je potlačena epigenetickým mechanismem zvaným imprinting (Kara *et al.*, 2008; Li and Qiu, 2014). Singhmar and Kumar (2011) zkoumali závislost exprese *UBE3A* genu na fázi buněčného cyklu a zjistili, že je maximálně exprimován v M fázi a minimálně v S fázi. Podle Kara *et al.* (2008) může mít mutace *UBE3A* genu i pozitivní význam, a to právě tehdy, pokud nemají tyto mutace nežádoucí vliv na metylaci DNA v oblasti 15q11.2-15q13.

Gen *UBE3A* působí jako koaktivátor. Koaktivátory interagují s jadernými receptory a zlepšují jejich schopnost aktivovat transkripci (Lalande and Calciano, 2007). Také regulují stabilitu estrogenového receptoru a předpokládá se, že by mohly mít spojitost se vznikem rakoviny prsu. Snížená hladina exprese *UBE3A* byla zjištěna nejen u rakoviny u prsu, ale i prostaty (Lalande and Calciano, 2007). Předpokládá se, že většina dosud zjištěných mutací *UBE3A* může způsobit předčasné ukončení proteosyntézy.

Mutace maternální alely genu *UBE3A* vede ke ztrátě funkce tohoto genu a je příčinou vzniku AS (Li and Qiu, 2014). Podle Dagli *et al.* (2011) bylo zaznamenáno okolo 60 mutací, z nichž 60–70 % zahrnuje malé delece a duplikace, které vedou k posunovým mutacím. Zbytek představují nesmyslné (nonsense) mutace, poruchy splicingu (sestříhu), rozsáhlé delece a komplexní chromozomové přestavby. Většina mutací *UBE3A* jsou truncating mutace (Dagli *et al.*, 2011). Bodové mutace *UBE3A* zahrnují okolo 50 % mutací vzniklých *de novo* a 50 % mutací maternálně zděděných (Camprubí *et al.*, 2009). U jedinců s bodovou mutací se většinou vyskytují méně závažné symptomy (Bailus and Segal, 2014). Ve výzkumu Camprubí *et al.* (2009) bylo zjištěno, že všechny jednonukleotidové mutace (5 z 5 mutací) byly zděděny od zdravé matky, zatímco většina z vícenukleotidových delecí nebo inzercí (4 z 5) vznikla *de novo* u pacienta. Většina

mutací zjištěných v *UBE3A* je lokalizována v oblasti *hect* domény (De Molfetta *et al.*, 2012). U některých mutací však původ stále není znám.

Stejně tak nejsou známy detailní mechanismy toho, jak vede nedostatečná funkce genu *UBE3A* k Angelmanovu syndromu. Prozatím je to vysvětlováno tím, že změny exprese *UBE3A* mohou ovlivnit životaschopnost neuronů. Ztráta neuronů může být spojena s procesem buněčné smrti. Další potenciální mechanismus je ten, že nedostatečná funkce *UBE3A* postihuje syntézu bílkovin. Studie ukazují, že nedostatečná funkce tohoto genu způsobuje dezorganizaci a zvýšení pH Golgiho aparátu. Hypotetickou příčinou je i to, že abnormality *UBE3A* narušují regulaci genové exprese (Li and Qiu, 2014).

Na rozdíl od předchozích tří příčin vzniku AS je u mutace genu *UBE3A* DNA metylační analýza v normálu (Lalande and Calciano, 2007; Sadikovic *et al.*, 2014).

4.5 Prozatím neidentifikované abnormality chromozomu 15

Přestože už bylo identifikováno velké množství příčin vzniku AS, stále existují pacienti s fenotypem tohoto onemocnění, u nichž nebyly objeveny žádné abnormality chromozomu 15. U těchto pacientů nebyla prozatím zjištěna příčina onemocnění. Jako možný kandidát pro vznik AS se zvažuje maternálně exprimovaný gen *ATP10C* (ATPase, class V, type 10C; gen pro ATPázu transportující aminofosfolipidy) (Clayton-Smith and Laan, 2003; Vendrame *et al.*, 2012). Dalším kandidátem je gen *Zfp 127* (zinc finger protein, zinkový prst), který je exprimovaný pouze z paternální alely. Exprimuje se v mozku, ledvinách a srdci. Za zmínku stojí i gen *MAGEL2* (melanoma associated antigen, family L2), který přímo nesouvisí s AS, ale s Prader-Williho syndromem (Vendrame *et al.*, 2012). I zde je metylace v normálu (Lalande and Calciano, 2007).

Tato skupina zahrnuje i pacienty s jinými poruchami. Diagnóza AS může být zvažována u dětí s širšími komplexními symptomy, manifestujícími se např. jako mozková obrna, Lennox-Gastautův syndrom, α thalasémie, Rettův syndrom nebo mitochondriální choroby (Clayton-Smith and Laan, 2003).

5 KLINICKÁ MANIFESTACE ANGELMANOVA SYNDROMU

První klinické příznaky se u dítěte začínají objevovat již od jednoho měsíce věku (Vendrame *et al.*, 2012). Klinické projevy AS mohou být velice subjektivně posuzovány, ale v zásadě se dělí do tří skupin podle četnosti výskytu. První skupinu tvoří symptomy, u kterých se uvádí, že se vyskytují až ve 100 % případů. Symptomy ve druhé skupině se vyskytují ve více než 80 % a ve třetí skupině ve 20–80 % případů. Do první skupiny řadíme silně opožděný vývoj, pohybové obtíže, poruchy řeči, typické chování jako je např. veselá nálada, časté záchvaty smíchu, hyperaktivita a vznětlivost. Do druhé skupiny patří nepřiměřený růst hlavy, který může vést až k mikrocefalii, epileptické záchvaty a abnormální EEG. Do třetí skupiny se řadí symptomy jako plochý týl, jazyk vyčnívající z úst, obtíže při polykání a krmení, prognathia, široce rozevřená ústa, předkus, nepřiměřené slinění, šilhání, v porovnání s rodiči světlejší vlasy a oči, citlivost na teplo, zácpa, obezita, skolióza nebo spánkové dysfunkce. Jedinci s tímto onemocněním mají velmi pozitivní vztah k vodě (Thibert *et al.*, 2013), zejména ti s delecí (Tan *et al.*, 2013).

Klinické projevy mohou mít různou závažnost. Podle Kara *et al.* (2008) existují určité vztahy mezi závažností klinických projevů AS a genetickými mechanizmy, které je způsobují. Konkrétně jedinci s mutací genu *UBE3A* a zároveň poruchou imprintingového centra (IC) mají větší pravděpodobnost, že se u nich vyskytnou mírnější klinické projevy onemocnění.

5.1 Tělesné abnormality

Téměř u 100 % jedinců s AS se projevují určité pohybové obtíže. K nim můžeme zařadit ataktickou chůzi, problémy s rovnováhou nebo například trhavé pohyby a nemotornost. Vyskytnout se ale mohou i křeče v dolních končetinách a hypotonie (Thibert *et al.*, 2013). Podle Dagli *et al.* (2011) můžeme v menší míře pozorovat také strnulou chůzi připomínající chůzi robota. Dále uvádějí, že postižení jedinci mají často plochá chodidla vybočující směrem ven. Popsána byla také svalová atrofie (Bevinetto and Kaye, 2014).

Hladíková *et al.* (2012) uvádějí jako další projev tzv. „hand flapping“ (mávání rukama). Typické jsou různé deformace prstů, např. klinodaktylie, a s nimi spojená porucha jemné motoriky (Kara *et al.*, 2008).

Vyskytují se také vývojové vady mozku. Popsána byla mikrocefalie, plagiocefalie, deformace dolní čelisti a špatný růst zubů (Hladíková *et al.*, 2012). Na lebce nalézáme plochý týl a týlní drážku. Vyskytnout se může jazyk vyčnívající z úst. Postižení jedinci mají problém se sliněním, polykáním a sáním mateřského mléka (Bevinetto and Kaye, 2014).

Pro jedince s tímto onemocněním je typická hypopigmentace pokožky a vlasů (Hladíková *et al.*, 2012).

5.2 Poruchy řeči

Převážná část (okolo 85 %) postižených jedinců není schopna se verbálně vyjadřovat, malá část (okolo 15 %) rozeznává pouze několik málo slov. Běžně používají pouze několik symbolických gest a zvuků. Velká část jedinců užívá k vyjádření protestu, žádosti a za účelem komunikace nesymbolická gesta (křik, pláč, zápas, trhavé pohyby, mávání rukama), kterým rodiče nerozumí (Hyppa *et al.*, 2013). V současné době se proto lékaři a rodiny pacientů snaží realizovat různé komunikační strategie, nadále však zůstává způsob komunikace s jedinci postiženými AS předmětem dalšího výzkumu (Hyppa *et al.*, 2013; Thibert *et al.*, 2013).

Poruchy řeči jsou podle Peters *et al.* (2011) způsobeny změnami v bílé hmotě mozku. Tyto změny jsou pro AS charakteristické. Bílá hmota je totiž tvořena vlákny, z nichž některá jsou propojena s centrem řeči a centrem kognitivních a sociálních schopností. Bylo prokázáno, že porucha těchto center je spojena pouze se změnami v bílé hmotě temporálního laloku mozku.

5.3 Typické chování

Až ve 100 % případů můžeme u postižených jedinců pozorovat určité typické chování. Konkrétně se jedná o časté záchvaty smíchu, šťastnou náladu nebo naopak vznětlivost často spojenou s trhavými pohyby a máváním rukou. Běžně se vyskytuje i hyperaktivita (Bevinetto and Kaye, 2014; Thibert *et al.*, 2013). Hladíková *et al.* (2012) zmiňují také neschopnost udržet pozornost.

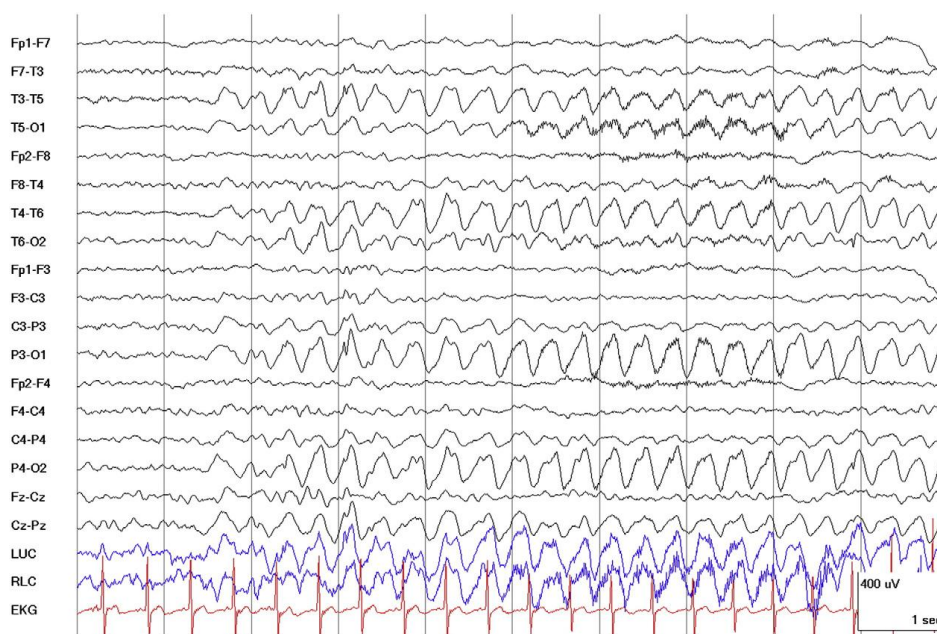
5.4 Epileptické záchvaty

Epilepsie je jedním ze společných projevů AS a její četnost kolísá od 80 do 95 %. Existuje tedy 5–20 % jedinců, u kterých se epilepsie nikdy neprojeví (Thibert *et al.*, 2013). Epilepsie se obvykle začíná u dětí objevovat relativně brzy. Uvádí se, že se tak děje již v průběhu prvního roku života, většinou ale dochází k prvním výskytům mezi prvním a třetím rokem života (Dagli *et al.*, 2011). Hladíková *et al.* (2012) mají obdobný názor a tvrdí, že se epilepsie poprvé objevuje před dosažením třetího roku života dítěte. Thibert *et al.* (2013) uvádějí, že se 50 % záchvatů prvně objevuje v průběhu prvního roku života a 75 % záchvatů do tří let věku dítěte. Vendrame *et al.* (2012) považují za průměrný věk při prvním výskytu epileptického záchvatu 22,3 měsíce. Dále upozorňují, že důležitou roli při výskytu počátečních epileptických záchvatů hraje horečka. Působí jako spouštěcí mechanismus počátečního záchvatu u více než jedné třetiny postižených. Mezi další spouštěcí mechanismy se řadí nemoc nebo únava (Bevinetto and Kaye, 2014).

AS může být také doprovázen (přestože to není příliš časté) závažnými formami epilepsie zahrnujícími časté mnohonásobné nebo prodloužené záchvaty. Vážné formy epilepsie se často projevují v raném dětství a jejich průběh se zmírňuje v pubertě. S přibývajícím věkem se ale dále jejich stav může opět zhoršit (Thibert *et al.*, 2013).

5.5 Abnormální EEG

Epileptické záchvaty bývají často spojeny s určitými změnami EEG (Dagli *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že abnormální EEG se odvíjí od věku. Centro-okcipitální (Obr. 6) a centro-temporální delta vlny se snižují s věkem (Vendrame *et al.*, 2012). Abnormální EEG se obvykle objevuje okolo druhého roku věku a může předcházet klinickým projevům (Thibert *et al.*, 2013). Mezi nejčastěji zjištěné abnormality EEG patří střídavé rytmické delta vlny (83,5 %), interiktální epileptiformní výboje (74,2 %), střídavé rytmické theta vlny (43,5 %) a pozdější zpomalení rytmu (43,5 %). Nebyl zjištěn vztah mezi specifickým EEG a konkrétním typem epileptického záchvatu. EEG může sloužit k diagnostice AS. Analýza EEG před epileptickými záchvaty může pomoci získat další poznatky o vzniku tohoto onemocnění (Vendrame *et al.*, 2012).



Obr. 6: Centro-okcipitální delta vlny typické pro Angelmanův syndrom

Zdroj: Vendrame *et al.* (2012)

5.6 Porucha rytmu spánku a bdění

U dětí se často popisuje inverzní rytmus spánku a bdění (Hladíková *et al.*, 2012). Děti se v noci často, i ve vyšším věku, budí a mají obecně sníženou potřebu spánku (Tan *et al.*, 2011). Vydrží dlouhou dobu bez spánku a mají výrazně kratší celkovou dobu spánku. Během spánku se děti často pomačují, mají noční můry, bývají náměsíčné, chrápou a skřípou zuby. I během spánku můžeme zpozorovat trhavé pohyby typické pro toto onemocnění a smích. Obtíže se spánkem se vyskytují obvykle jen v dětství, ale jsou zaznamenány i případy, kdy přetrvaly až do dospělosti. Při poruchách spánku bývá podáván melatonin, který umožní upravení rytmu spánku a bdění a délky spánku (Angriman *et al.*, 2015).

6 KOMPLIKACE PŘI NUTNOSTI HOSPITALIZACE

U dětí s AS je často nutná hospitalizace, zejména kvůli závažné formě epilepsie. Kromě toho bývají hospitalizovány kvůli stomatologickým a neurochirurgickým zákrokům, operacím očí nebo korekci skoliózy. Při těchto zákrocích je nutná anestezie, při které dochází k řadě komplikací (Hladíková *et al.*, 2012). Komplikace hrozí, protože pacienti s AS mají postižené $\beta 3$ podjednotky GABA A receptorů, přes které normálně anestezie působí na CNS. Jako vhodnější se proto jeví užití inhalační celkové anestezie, která působí na α (nikoliv $\beta 3$) podjednotky. Ty nejsou u AS postiženy (Bevinetto and Kaye, 2014). Vyskytnout se mohou poruchy srdečního rytmu (Hladíková *et al.*, 2012). Gardner *et al.* (2008) zaznamenali u 12letého chlapce během operace chrupu bradykardii a u 9leté dívky během laparoskopie nejprve bradykardii, poté změněnou v asystolii. V obou případech se situace vrátila k normálu. Autoři se domnívají, že tyto poruchy mohou souviset s převahou vagálního tonu. Obecně můžeme mezi faktory mající vliv na anestezii zařadit epilepsii, převahu vagálního tonu, poruchy syntézy a uvolňování GABA a periferní svalovou atrofii (Bujok and Knapik, 2004). Ramanathan *et al.* (2008) uvádějí, že reakce na anestezii je nepředvídatelná a může následovat delší doba zotavení. Reakce na anestezii může dále zahrnovat změny krevního tlaku, arytmií, hypotenzi či hypertenzi (Gardner *et al.*, 2008).

Děti s AS obecně špatně snášejí bolest a reakce na ni bývá nepředvídatelná. Složitý je také odhad stupně bolesti, jelikož postižení jedinci mají šťastný výraz v obličejí i při velkých bolestech (Hladíková *et al.*, 2012).

7 DIAGNOSTIKA ANGELMANOVA SYNDROMU

Projevy AS bývají velice subjektivní a nemusí vždy odpovídat standardním projevům onemocnění, proto se občas stává, že je namísto AS určena jiná diagnóza (Tab. 1). Mezi odlišné diagnózy patří Mowat-Wilsonův syndrom, Christiansonův syndrom nebo Rettův syndrom. Angelmanův syndrom může být napodobován i deficitem adenylosukcinát lyázy nebo methyilentetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). Někdy může být Angelmanův syndrom pomýlen s dětskou mozkovou obrnou, Lennox-Gastautovým syndromem, statickou encefalopatií nebo Prader-Williho syndromem (Panda *et al.*, 2013).

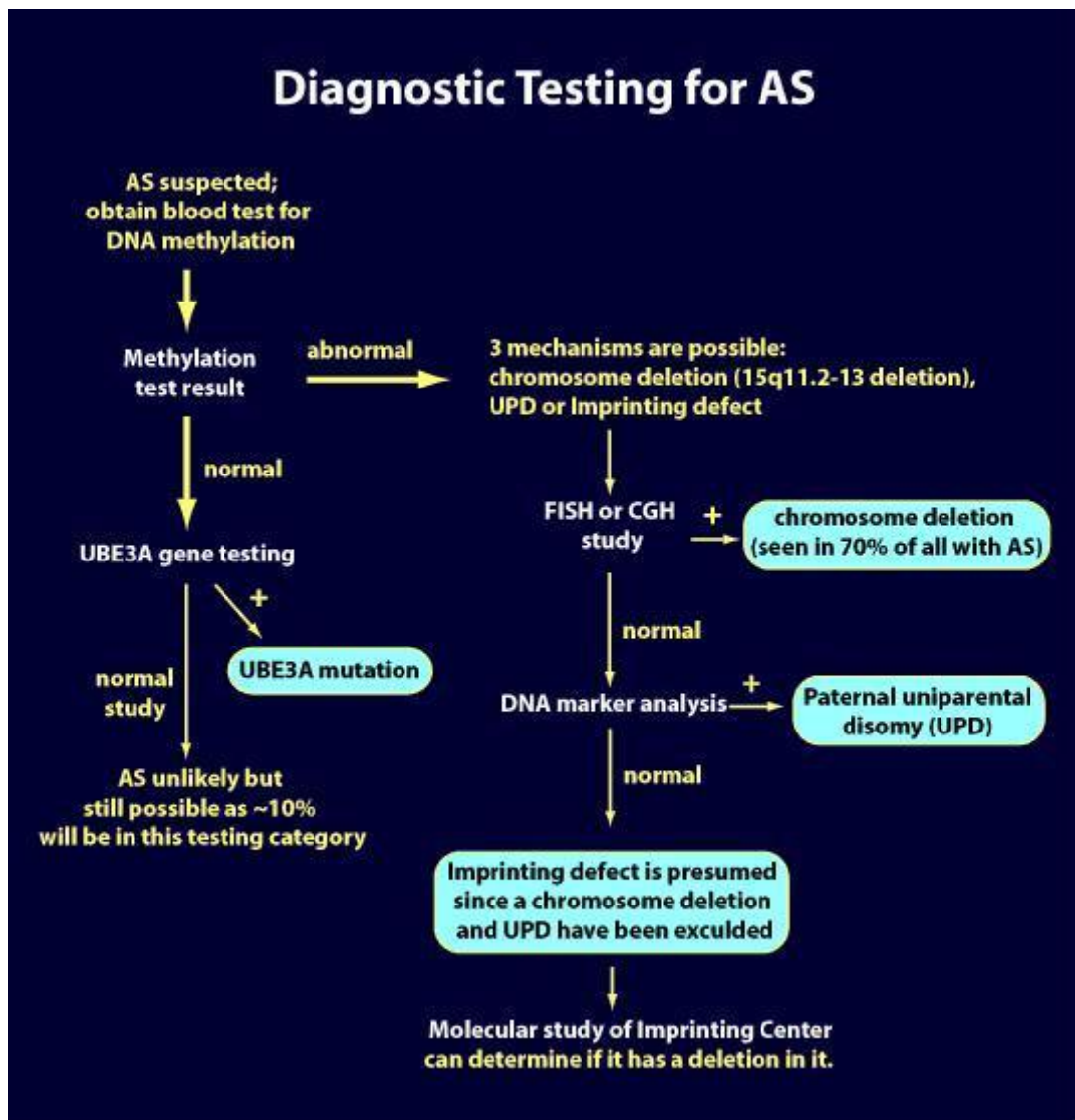
Tab. 1: Odlišné diagnózy a jejich podobnost s Angelmanovým syndromem

Zdroj: Thibert *et al.* (2013) (upraveno)

	Záchvaty	Závažná kognitivní porucha	Absence řeči	Ataxie	Hypotonie	Poruchy spánku	Mikrocefalie	Záchvaty smíchu/ usmívání se
Mowat-Wilsonův syndrom	●	●	●		●		●	●
Pitt-Hopkinsův syndrom	●	●	●	●	●		●	●
Christiansonův syndrom	●	●	●	●		●	●	●
Rettův syndrom	●	●		●		●	●	
Prader-Williho syndrom	●				●	●		
Deleční syndrom chromozomu 2q23.1	●	●	●	●	●	●	●	
Phelan-McDermidův syndrom	●	●	●		●			
<i>MECP2</i> duplikační syndrom	●	●	●	●	●	●	●	
Nedostatek adenylosukcinát lyázy	●	●	●	●	●		●	●
Nedostatek methyilentetrahydrofolát reduktázy	●	●		●			●	
Vrozená porucha glykosylace	●	●		●	●			

K potvrzení diagnózy AS lze využít FISH analýzu, analýzu metylace (Wilson *et al.*, 2012), PCR (Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) nebo analýzu DNA polymorfizmu (Bevinetto and Kaye, 2014). Sahoo *et al.* (2007) využívají CGH (comparative genomic hybridization; komparativní genomová hybridizace) array test. Jako doplňkové vyšetření může být užita magnetická rezonance (MRI) nebo počítačová tomografie (CT) (Duca *et al.*, 2013).

Při testování na AS je doporučeno řídit se následujícím postupem (Obr. 7). Nejefektivnější je začít analýzou metylace. Pokud je metylace abnormální, následuje testování FISH analýzou nebo CGH. Pokud je alespoň jeden z těchto testů v normálu, provádí se další testování s cílem zjistit, zda je abnormální metylace způsobena paternální UPD nebo poruchou imprintingu. Pokud jsou výsledky FISH analýzy nebo CGH abnormální, pravděpodobně došlo k delecii. Pokud je test metylace normální, následuje testování na přítomnost mutace genu *UBE3A*. K tomu se využívá například DNA sekvenování. Pokud je toto testování negativní (nedošlo k mutaci genu *UBE3A*), stále se může jednat o AS, pouze ještě nebyla identifikována příčina vzniku. Tito jedinci bývají podrobeni dalšímu lékařskému vyšetření a genetickému testování (<http://angelman.org/>³).



Obr. 7: Postup testování při podezření na Angelmanův syndrom

Zdroj: <http://www.angelman.org/>

7.1 Chromozomální analýza

Chromozomální analýza představuje základní typ vyšetření. Slouží k identifikaci chromozomů a popisu změn ve struktuře a počtu chromozomů. Při podezření na AS se využívá především GTG-banding (Giemsa banding) – proužkování chromozomů, které se provádí zejména v metafázi. Principem bandingu je specifické barvení chromatinu, kdy na chromozomu vznikají odlišitelné světlé a tmavé proužky (Neubert *et al.*, 2013).

7.2 Analýza metylace

DNA metylace je proces, při kterém se metylová skupina váže na vybrané nukleotidové báze. Tímto se v normálních tkáních vytváří relativně stabilní DNA metylační vzorec. Metylace podléhají cystinové báze v CpG (Cytosin-fosfát-Guanin) dinukleotidech. Metylace nejsou v organismu rozloženy rovnoměrně, nacházíme je jak v genech a jejich promotorech, tak i v intergenových oblastech. DNA metylace má za následek umlčování genů v důsledku inhibovaných vazeb transkripčních faktorů. Změny metylace jsou spojovány s nádorovým bujením a jinými genetickými změnami, jako jsou mutace nebo chromozomální aberace (Ludvíková *et al.*, 2009). Abnormální metylace se objevuje u 80–90 % jedinců s AS (Margolis *et al.*, 2015). Analýza metylace se provádí metodou MS-PCR (Calì *et al.*, 2010; Herman *et al.*, 1996).

7.3 CGH

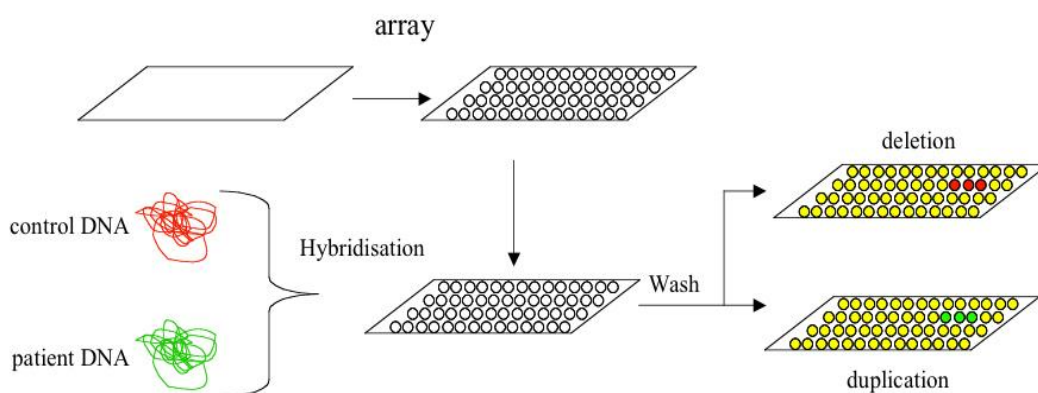
CGH (komparativní genomová hybridizace) je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje provádět analýzu chromozomálních změn v rámci celého genomu. Sledují se změny v počtu kopií sekvencí mezi vyšetřovanou a kontrolní DNA. Kontrolní DNA slouží ke zjišťování změn ve schopnosti hybridizovat. CGH je založen na FISH analýze (Kallioniemi *et al.*, 1992) a obvykle jí předchází (Sahoo *et al.*, 2009).

Základem CGH je odebrání dvou vzorků DNA, z nichž jeden je z vyšetřované tkáně a druhý je z kontrolní (zdravé) tkáně. Při CGH jsou vyšetřovaná DNA a kontrolní DNA hybridizovány s normálními chromozomy v metafázi. Hybridizovaná kontrolní a vyšetřovaná DNA jsou značeny odlišnou fluorescenční barvou - fluorochromem (kontrolní červenou Cy5 (Cyanin 5) a vyšetřovaná zelenou Cy3 (Cyanin 3)). Relativní množství vyšetřované a kontrolní DNA navázané na normální chromozomy je pak změřeno a vyhodnoceno na základě poměru a intenzity zastoupení červené a zelené fluorescence. Místa s vyšší nebo nižší intenzitou fluorescence znamenají nadbytečné nebo naopak chybějící sekvence DNA. Pokud je zbarvení všech chromozomů jednotné, nedošlo pravděpodobně

k žádné změně. Fluorescence je snímána speciální kamerou a vyhodnocována počítačovým programem (Kallioniemi *et al.*, 1992).

7.3.1 Array CGH

Vedle klasického CGH se někdy využívá i array CGH (mikročipová komparativní genomová hybridizace) (Obr. 8). Na rozdíl od klasické CGH jsou zde vyšetřovaná DNA a kontrolní DNA hybridizovány s fragmenty DNA, jako jsou oligonukleotidy, cDNAs, BACs, plazmidy nebo kosmidy (nikoliv chromozomy jako u klasické CGH). V současné diagnostice převažují BACs. Tyto fragmenty jsou přichyceny na DNA čipu. Vyšetřovaná a kontrolní DNA jsou značeny odlišnou barvou fluorescence. Po hybridizaci následuje vymytí navázaných sond. Výsledky jsou vyhodnoceny speciálním počítačovým programem. Array CGH slouží k detekci delecí a duplikací (Bejjani and Shaffer, 2006).



Obr. 8: Schématické znázornění průběhu array CGH

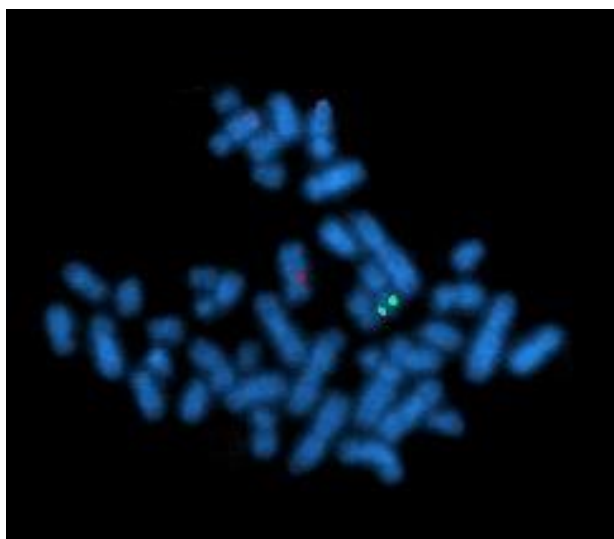
Zdroj: <http://www.biologia.uniba.it/eca/>

7.4 FISH analýza

FISH analýza u AS slouží především k detekci bodů zlomu při delecí (Sahoo *et al.*, 2007), ale využívá se i při detekci chromozomálních abnormalit (Fotra *et al.*,

2014). FISH je molekulárně cytogenetické vyšetření, které využívá fluorescenčně značené DNA sondy k detekci změn na úrovni genu nebo chromozomu (Fotra *et al.*, 2014). Obvykle se používají fluorescenční barviva dvou typů, fluorescein izothiokyanát (FITC, žluté barvy) a tetra-methylrhodamin izothiokyanát (TRITC, červené barvy) (Raff and Schwanitz, 2001).

Průběh FISH má několik fází. Vyšetřovaná DNA musí být nejprve denaturována. Tím dochází k rozpadu vodíkových můstků a z dvouvláknové DNA se stává jednovláknová. Denuraci podléhá i sonda. Následuje fáze hybridizace, kdy je fluorescenčně značená sonda navázána na základě komplementarity bází na jednovláknovou DNA. Fáze hybridizace probíhá několik hodin při teplotě 37 °C. Sonda může být navázána k pouze částečně homologní sekvenci DNA. Tyto hybridy dále podléhají „stringent washingu“, při kterém je sonda odstraněna z míst, k nimž není úplně komplementární. Chromozomy jsou obarveny a nakonec se provádí vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem (Obr. 9). Tím se zjistí, kam se sonda navázala a získá se přehled o počtu změn a jejich umístění (Raff and Schwanitz, 2001).



Obr. 9: FISH analýza jedince s Angelmanovým syndromem znázorňující genetické změny v genu *UBE3A*

Zdroj: <http://cureangelman.net/>

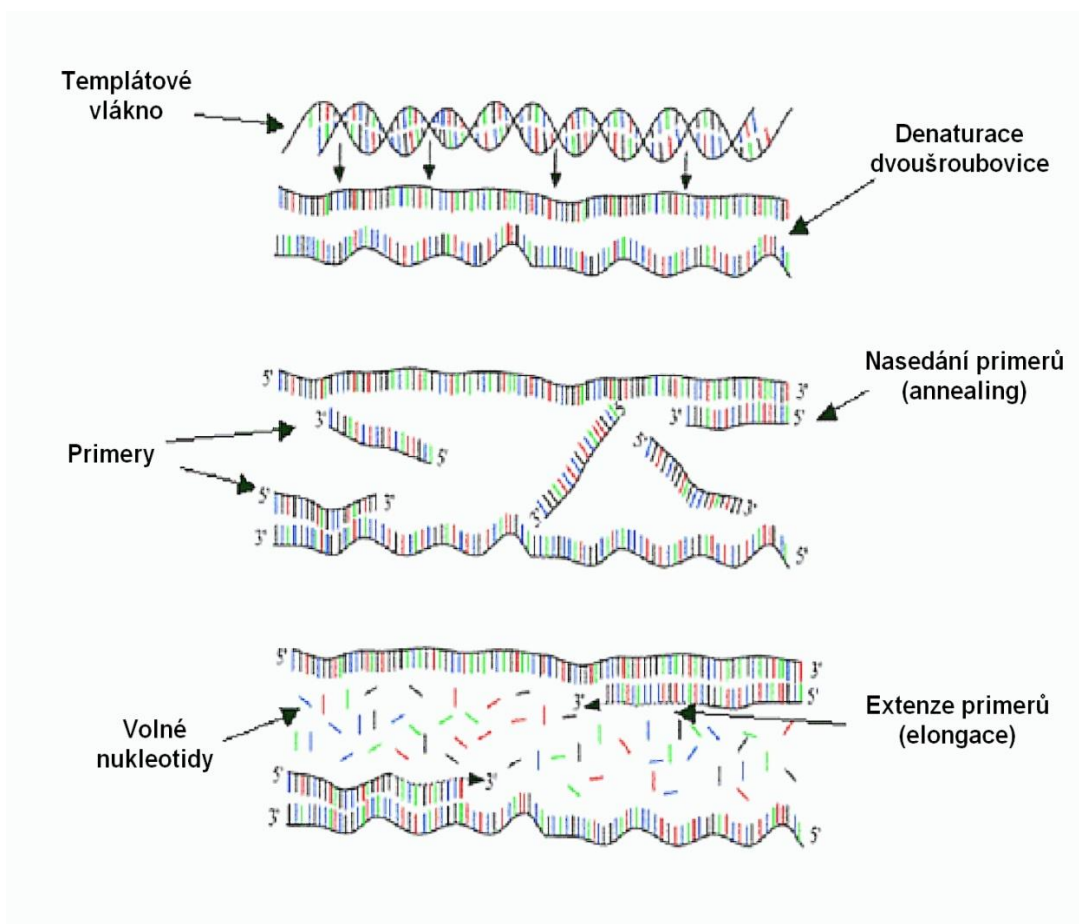
V dnešní době se využívá několika typů sond. Jedná se například o centromerické DNA sondy, které hybridizují s rozsáhlými repetitivními sekvencemi centromerických oblastí chromozomů. Jsou využívány především k detekci početních odchylek chromozomů. Dále existují lokusově specifické DNA sondy, které hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA a využívají se především k identifikaci jednotlivých genů a následně pak k detekci změn těchto genů, jako jsou delece, duplikace, amplifikace nebo translokace. Třetím typem sond jsou celochromozomové DNA sondy, které hybridizují s mnohačetnými chromozomovými sekvencemi. Lze jimi označit celý chromozom. Tento typ sond se využívá především k detekci translokací na mitotických preparátech (Slabý *et al.*, 2014).

7.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda, která umožňuje namnožení (amplifikaci) konkrétní sekvence DNA a získání jejího dostatečného množství (až milionu kopií) za relativně krátký čas. Základem PCR je cyklické opakování tří fází; denaturace, hybridizace (annealing) a elongace (Obr. 10). V každé jednotlivé fázi je zapotřebí specifická teplota (Baumforth *et al.*, 1999).

Nejprve je třeba získat vzorek DNA, a to například z tkáně, periferní krve, vlasů nebo nehtů. Extrakce DNA ze vzorku probíhá v pufru společně s proteinázou K po dobu alespoň 24 hodin. Tímto dostaneme vysoce kvalitní DNA. Po extrakci je proteináza K inaktivována zahřátím na 95 °C po dobu 10 minut. Poté je DNA vyčištěna a centrifugována ve vhodném médiu. Následně je DNA přidána do PCR zkumavky k reakčnímu pufru, obsahujícímu dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty), jeden pár primerů a *Taq* polymerázu a pro stabilizaci roztoku soli (nejčastěji hořečnaté kationty). Vše promícháme, centrifugujeme a umístíme do termocykleru. Při počáteční denaturaci je DNA zahřata na 94 °C po dobu 5 minut, každá další denaturace probíhá po dobu 20–30 sekund. Denurací dochází k rozpadu vodíkových můstků a z dvouvláknové DNA se stává jednovláknová. Ve druhé fázi (annealing) probíhá zahřívání na teplotu 50–60 °C po dobu 20–60 sekund. Přitom dochází k přisedání primerů ke komplementárním bázím DNA z obou stran řetězců.

Následuje fáze elongace, během které se syntetizují nové řetězce DNA při teplotě okolo 70 °C po dobu 30–60 sekund. Celý cyklus je opakován 20–35x. Po poslední elongaci se doporučuje zahřátí na 95 °C po dobu 5 minut, aby se zajistila pevnost vzniklých řetězců (Baumforth *et al.*, 1999).



Obr. 10: Jednotlivé fáze PCR (denaturace, annealing a elongace)

Zdroj: <http://www.chempoint.cz/>

PCR probíhá nejlépe, pokud se cílová sekvence DNA skládá ze 100–1000 párů bází. Produkt PCR je nutno před dalším použitím zkontrolovat. Kontrola se provádí agarózovou gelovou elektroforézou (Baumforth *et al.*, 1999).

7.5.1 Real time PCR

Real time PCR je metoda, od klasické PCR odlišná tím, že kombinuje amplifikaci konkrétní sekvence DNA a detekci amplifikovaného produktu. Vše probíhá v uzavřené nádobě, a tím je zajištěna ochrana před kontaminací. Výhodou real time PCR je, že se výsledky zaznamenávají v průběhu celé amplifikace DNA, ale i menší časová náročnost, jelikož provádíme oba kroky zároveň. Zaznamenávání výsledků se provádí na základě fluorescenční sondy, která se váže na amplifikovanou DNA (Cockerill, 2003). Real time PCR se při diagnostice AS využívá k detekci paternální uniparentální dizomie a defektů imprintingového centra (<http://cureangelman.net/>⁴).

7.5.2 MS-PCR

Metylačně specifická PCR se využívá k analýze metylace specifických CpG v rámci CpG ostrůvků. Tato metoda je velmi citlivá. Při MS-PCR se využívají primery, které jsou schopné rozlišit metylovanou a nemetylovanou DNA nebo i bisulfitem modifikovanou a nemodifikovanou DNA. Metylovaná a nemetylovaná DNA je amplifikována a poté jsou produkty vyhodnoceny elektroforézou v agarózovém gelu (Herman *et al.*, 1996).

7.6 Sekvenování DNA

Bodové mutace genu *UBE3A* mohou být detekovány pomocí metody analýzy sekvence DNA (Cali *et al.*, 2010). Sekvenování DNA je označení pro metodu, jíž se určuje pořadí nukleotidových bází v sekvenci DNA. Metody sekvenování jsou následující: Sangerova metoda, Maxam-Gilbertova metoda, pyrosekvenování a sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (França *et al.*, 2002).

Sangerova metoda využívá DNA polymerázy, primeru, dNTPs (deoxynucleotide triphosphates; deoxynukleotid trifosfáty) a ddNTPs (dideoxynucleotide triphosphates; dideoxynukleotid trifosfáty) (França *et al.*, 2002).

Jedná se o proces podobný klasické PCR s tou výjimkou, že dNTPs jsou barveny radioaktivním nebo fluorescenčním primerem (Baumforth *et al.*, 1999). Metoda probíhá ve čtyřech oddělených zkumavkách, přičemž v každé z nich je vzorek templátové DNA, fluorescenčně značený primer, DNA polymeráza, tři dNTPs (např. dATP, dGTP, dTTP) a v každé zkumavce je jeden konkrétní ddNTP – ten, který není mezi dNTPs (zde tedy např. ddCTP) (Fraňča *et al.*, 2002). V každé zkumavce tak dochází k terminaci reakce v pozici jiného typu nukleotidu. Princip terminace je takový, že se místo např. dCTP začlení do komplementárního řetězce DNA ddCTP a proces elongace se zastaví, jelikož ddCTP (na rozdíl od dCTP) nemá OH skupinu, na kterou by se mohl připojit další dNTP. Výsledkem je směs různě dlouhých sekvencí DNA, které začínají primerem a končí specifickým ddNTP (<http://new.biologie.upol.cz/>⁵). Po ukončení reakcí je výsledek vyhodnocen elektroforézou na denaturačním polyakrylamidovém gelu (Fraňča *et al.*, 2002).

Při Maxam-Gilbertově metodě dochází ke štěpení koncových fragmentů DNA na polohách adeninu, guaninu, cytosinu a thyminu. Štěpení probíhá za přítomnosti chemických látek (restrikčních enzymů), které nejprve modifikují báze, dále dochází k odstranění modifikovaných bází z cukru a zlomu řetězce DNA. Produkty těchto čtyř reakcí jsou vyhodnoceny elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (Fraňča *et al.*, 2002). Tato metoda se však v současné době již nepoužívá.

Pyrosekvenování je relativně nová metoda sekvenování. Skládá se ze čtyř základních kroků: amplifikace DNA, rozštěpení dvouvláknové DNA na jednovláknovou, čištění jednovláknové DNA a hybridizace nukleotidů. Cílová DNA musí být nejprve amplifikována pomocí PCR metody a rozštěpena na jednovláknovou DNA. Po jejím vyčištění dochází k hybridizaci oligonukleotidových primerů na jednovláknovou DNA na základě komplementarity. Jakmile jsou oligonukleotidy zabudovány, dochází k uvolňování pyrofosfátu (PPi) a jeho připojování k DNA. Přítomny jsou i enzymy (např. DNA polymeráza), které katalyzují reakci (Clarke, 2005).

Sekvenování jednotlivých molekul DNA je nejnovější metoda sekvenování, která začala být komerčně používána v roce 2008. Bývá nazývána sekvenační metodou třetí generace (Gupta, 2008). Hlavní výhodou sekvenování jednotlivých molekul DNA je časová nenáročnost a nepotřebnost amplifikovat cílovou sekvenci

DNA (Pushkarev *et al.*, 2009). Metoda je založena na detekci fluorescenčně zbarvených nukleotidů vznikajících v průběhu syntézy (Gupta, 2008).

7.7 Magnetická rezonance (MRI) a počítačová tomografie (CT)

Pomocí MRI/CT lze zjistit abnormality jako zvětšení mozkové komory, leukomalacii, atrofii mozku, abnormality bílé a šedé hmoty mozkové, léze a další (Duca *et al.*, 2013). Vedle klasické magnetické rezonance lze využít i difuzní tenzorové zobrazení (DTI), které umožňuje rozpoznat změny v bílé hmotě mozkové, na základě měření pohybu vody ve tkáních (Peters *et al.*, 2011). Pomocí DTI se standardně vyšetřuje mozek například při podezření na Alzheimerovu nemoc (Alexander *et al.*, 2007).

8 MOŽNOSTI LÉČBY ANGELMANOVA SYNDROMU

Doposud neexistuje efektivní léčba AS. Lze pouze zmírňovat projevy onemocnění.

Gastrointestinální problémy jsou zmírňovány podáváním léků a dodržováním vhodné diety. U jedinců s hypopigmentací je nutno pokožku a oči vhodně chránit (Margolis *et al.*, 2015). Pro zmírňování epileptických záchvatů se pacientovi podává valproát sodný a při anémii z nedostatku železa bývá užitá krevní transfúze a orální podávání železa spolu s vitamínem B12 a kyselinou listovou (Mane *et al.*, 2015).

Thibert *et al.* (2012) doporučují pro léčbu epileptických záchvatů nízkoglykemickou dietu s vysokým podílem tuků, u které prokázali vysokou účinnost. Tuto léčbu testovali na šesti dětech, z nichž u pěti došlo po roce léčby k poklesu množství záchvatů až o 90 %. Sami ovšem dodávají, že na základě takto malého počtu pozorování nemohou jednoznačně nic potvrdit. Věří ale, že v ní tkví potenciál.

Bird *et al.* (2011) se pokoušeli podáváním komplexu léků, zahrnujícího L-5-methyltetrahydrofolát, kreatin, betain a vitamín B12, snížit produkci antisense transkriptu a zvýšit expresi genu *UBE3A* v maternální alele. To mělo mít za následek zmírnění projevů AS. Žádný statisticky prokazatelný rozdíl jim však mezi kontrolní skupinou a skupinou, které byly podávány tyto léky, nevyšel.

Grieco *et al.* (2014) předpokládají, že podávání minocyklinu může u pacientů zlepšit symptomy spojené s centrální nervovou soustavou a chováním. Dokazují to testy prováděné na 25 dětech, kterým byl minocyklin podáván po dobu 8 týdnů. U pacientů došlo ke zmírnění závažnosti projevů a změnám v kognitivních funkcích a adaptivním chování. Základní dávkování bylo stanoveno na $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$, maximálně však 200 mg denně. Látka byla podávána dvakrát denně perorálně ve formě 50 mg tobolek. U 3 z 25 jedinců, kterým bylo podáváno 200 mg minocyklinu denně, se vyskytly obtíže ve formě letargie a závratí. Po snížení dávkování na 100 mg denně potíže ustaly.

Naděje na léčbu představují topoizomerázy I. třídy, irinotecan a topotecan. Obě látky se používají při léčbě rakoviny. U pacientů s AS mohou pozitivně regulovat

paternální *UBE3A* a způsobovat opětovnou expresi tohoto genu z paternální alely, která je při poruše imprintingu potlačena. Tím by mohly být léčeny symptomy spojené s AS. Lepšího účinku dosahuje topotecan, jehož účinnost je až 20x větší než u irinotecanu. Další výhodou topotecanu je, že se neukládá v organismu, ale je rychle odbouráván v mozku (Huang *et al.*, 2012).

Genové inženýrství také představuje naději na léčbu. Tu by umožnily proteiny specificky vázané v DNA, mezi které patří C₂H₂ zinkové prsty, TALEs (transcription activator-like effectors), nebo CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) systémy, které dohromady tvoří tzv. ATFs (artificial transcription factors; umělé transkripční faktory). Tyto faktory by byly nastaveny tak, aby aktivovaly nebo potlačovaly expresi konkrétního genu. Tímto způsobem by bylo možné znovu zaktivovat expresi genu *UBE3A* z paternální alely, která je při poruše imprintingu potlačena (Bailus *et Segal*, 2014).

V současné době probíhá testování nového léku s názvem AGIL-AS. Lék vynalezla biotechnologická společnost Agilis Biotherapeutics. Tato společnost se specializuje na vývoj DNA terapeutik pro vzácná onemocnění postihující nervovou soustavu. Podle předpokladů by lék měl mít schopnost opravit defekty *UBE3A*, a tím odstranit deficity v nervové soustavě jedinců s tímto onemocněním (Cook, 2015).

9 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zpracovat literární přehled zabývající se Angelmanovým syndromem, vzácným geneticky podmíněným onemocněním. V této práci byly shrnuty dosavadní poznatky týkající se historie, etiologie, klinické manifestace, diagnostiky a léčby.

Přestože je známo velké množství poznatků ohledně tohoto onemocnění, stále přetrvávají některé nejasnosti. Dosud byly objeveny čtyři mechanismy vzniku Angelmanova syndromu, přesto existují pacienti s fenotypem tohoto onemocnění s dosud nezjištěnou příčinou jeho vzniku. Stejně tak nejsou známy přesné mechanismy toho, jakým způsobem vede snížení hladiny exprese *UBE3A* k Angelmanovu syndromu. Prozatím není známa účinná komplexní léčba tohoto onemocnění.

Pro získání chybějících informací je nutný další výzkum. Ten probíhá v současné době hned v několika oblastech. Předně se soustředí na objasnění dalšího mechanismu vzniku Angelmanova syndromu, prozatím však neúspěšně. Dalším předmětem studií je mechanismus fungování imprintingového centra. Očekává se, že lepší porozumění pochodům uvnitř tohoto centra by mohlo napomoci objevení účinné léčby. Výzkum se dále věnuje možnostem léčby. Soustředí se především na nápravu mutací a dalších defektů v *UBE3A* s cílem zlepšit stav nervové soustavy. V neposlední řadě je třeba vyvíjet a zlepšovat metody komunikace s postiženými jedinci.

Velice důležité je včasné a přesné stanovení diagnózy, z dostupných dat však vyplývá, že je diagnostika tohoto onemocnění velmi složitá. Je nutno provést celou řadu diagnostických metod a ani tak nemusí být diagnóza Angelmanova syndromu stoprocentně potvrzena.

Na závěr je třeba zmínit jednu lehce pozitivní zprávu. Na rozdíl od mnoha dalších geneticky podmíněných onemocnění zůstává pacientův stav a jeho závažnost konstantní po celý jeho život (tj. nezhoršuje se).

V případě zájmu o další informace týkající se Angelmanova syndromu je možno navštívit nejrůznější webové stránky zabývající se touto problematikou. Mezi nejkomplexněji zpracované webové stránky patří <http://www.angelman.org/>,

z českých potom <http://angelman.cz/>. Za zhlédnutí určitě stojí i facebooková stránka občanského sdružení ANGELMAN.CZ. Zde lze nalézt informace o nových publikacích, kampaních na podporu dětí postižených geneticky podmíněnými chorobami nebo informace o možnostech setkání rodičů dětí s Angelmanovým syndromem.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) **ALEXANDER A. L., LEE J. E., LAZAR M., FIELD A. S.** Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007, **4**(3): 316-329.
- 2) **ANGRIMAN M., CARAVALE B., NOVELLI L., FERRI R., BRUNI O.** Sleep in children with neurodevelopmental disabilities. *Neuropediatrics*. 2015, **46**: 199-210.
- 3) **BAILUS B. J., SEGAL D. J.** The prospect of molecular therapy for Angelman syndrome and other monogenic neurologic disorders. *BMC Neuroscience*. 2014, **15**(1).
- 4) **BAUMFORTH K. R. N., NELSON P. N., DIGBY J. E., O'NEIL J. D., MURRAY P. G.** The polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*. 1999, **52**: 1-10.
- 5) **BEJJANI B. A., SHAFFER L. G.** Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2006, **8**(5): 528-533.
- 6) **BEVINETTO C. M., KAYE A. D.** Perioperative considerations in the patient with Angelman syndrome. *Journal of Clinical Anesthesia*. 2014, **26**(1): 75-79.
- 7) **BIRD L. M., TAN W.-H., BACINO C. A., PETERS S. U., SKINNER S. A., ANSELM I., BARBIERI-WELGE R., BAUER-CARLIN A., GENTILE J. K., GLAZE D. G., HOROWITZ L. T., NAGA MOHAN K., NESPECA M. P., SAHOO T., SARCO D., WAISBREN S. E., BEAUDET A. L.** A therapeutic trial of pro-methylation dietary supplements in Angelman syndrome. *American Journal of Medical Genetics A*. 2011, **155**(12): 2956-2963.
- 8) **BONATI M. T., RUSSO S., FINELLI P., VALSECCHI M. R., COGLIATI F., CAVALLERI F., ROBERTS W., ELIA M., LARIZZA L.** Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: a resource to unfold autism genes. *Neurogenetics*. 2007, **8**: 169-178.

- 9) **BUITING K., SAITOH S., GROSS S., DITTRICH B., SCHWARTZ S., NICHOLLS R. D., HORSTHEMKE B.** Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genetics*. 1995, **9**(4): 395-400.
- 10) **BUJOK G., KNAPIK P.** Angelman syndrome as a rare anaesthetic problem. *Pediatric Anesthesia*. 2004, **14**: 281-283.
- 11) **CALÌ F., RAGALMUTO A., CHIAVETTA V., CALABRESE G., FICHERA M., VINCI M., RUGGERI G., SCHINOCCA P., STURNIO M., ROMANO S., ROMANO V., ELIA M.** Novel deletion of the E3A ubiquitin protein ligase gene detected by multiplex ligation-dependent probe amplification in a patient with Angelman syndrome. *Experimental and Molecular Medicine*. 2010, **42**(12): 842-848.
- 12) **CAMPRUBÍ C., GUITART M., GABAU E., DOLORS COLL M., VILLATORO S., OLTRA S., ROSELLÓ M., FERRER I., MONFORT S., ORELLANA C., MARTÍNEZ F.** Novel UBE3A mutations causing Angelman syndrome: different parental origin for single nucleotide changes and multiple nucleotide deletions or insertions. *American Journal of Medical Genetics*. 2009, **149A**(3): 343-348.
- 13) **CLARKE S. C.** Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005, **5**(6): 947-953.
- 14) **CLAYTON-SMITH J.** Angelman syndrome: evolution of the phenotype in adolescents and adults. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2001, **43**(7): 476-480.
- 15) **CLAYTON-SMITH J., LAAN L.** Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *Journal of Medical Genetics*. 2003, **40**(2): 87-95.
- 16) **COCKERILL F. R.** Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2003, **127**(9): 1112-1120.

- 17) **COOK J.** Agilis Biotherapeutics announces FDA orphan drug designation for AGIL-AS for the treatment of Angelman syndrome. *Business wire*. 2015.
- 18) **ČAPKOVÁ P., VRTĚL R., ŠANTAVÁ A., ZAPLETALOVÁ J., KRŠIAKOVÁ J., HYJÁNEK J., ŠANTAVÝ J.** Molekulárně-genetická studie příčin Prader-Williho a Angelmanova syndromu. *Časopis Lékařů Českých*. 2005, **144**: 113-118.
- 19) **DAGLI A., BUTING K., WILLIAMS C. A.** Molecular and clinical aspects of Angelman syndrome. *Molecular Syndromology*. 2011, 100-112.
- 20) **DUCA D. G., CRAIU D., BOER M., CHIRIEAC S. M., ARGHIR A., TUTULAN-CUNITA A., BARCA D., ILIESCU C., LUNGEANU A., MAGUREANU S., BUDISTEANU M.** Diagnostic approach of Angelman syndrome. *Journal of Clinical Medicine*. 2013, **8**(4): 321-327.
- 21) **FOTRA R., GUPTA S., KOUL S., GUPTA S.** Analysis of the chromosomal aneuploidy by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in Squamous cell carcinoma of the cervix in Jammu region of J and K state. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014, **10**(2): 317-323.
- 22) **FRANÇA L. T. C., CARRILHO E., KIST T. B. L.** A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2002, **35**(2): 169-200.
- 23) **GARDNER J. C., TURNER CH. S., RIRIE D. G.** Vagal hypertonia and anesthesia in Angelman syndrome. *Pediatric Anesthesia*. 2008, **18**(4): 348-349.
- 24) **GRIECO J. C., CIARLONE S. L., GIERON-KORTHALS M., SCHOENBERG M. R., SMITH A. G., PHILPOT R. M., HEUSSLER H. S., BANKO J. L., WEEBER E. J.** An open-label pilot trial of minocycline in children as a treatment for Angelman syndrome. *BMC Neurology*. 2014, **14**: 232.
- 25) **GUPTA P. K.** Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends in Biotechnology*. 2008, **26**(11): 602-611.
- 26) **HERMAN J. G., GRAFF J. R., MYÖHÄNEN S., NELKIN B. D., BAYLIN S. B.** Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996, **93**: 9821-9826.

- 27) **HLADÍKOVÁ A., OLOS T., HLADÍK M., ŠILHÁNOVÁ E.** Rizika anestezie u dětí s Angelmanovým syndromem. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2012, **23**(4): 183-187.
- 28) **HORVÁTH E., HORVÁTH Z., ISASZEGI D., GERGEV G., NAGY N., SZABÓ J., SZTRIHA L., SZÉLL M., ENDREFFY E.** Early detection of Angelman syndrome resulting from de novo paternal isodisomic 15q UPD and review of comparable cases. *Molecular Cytogenetics*. 2013, **6**(1).
- 29) **HUANG H.-S., ALLEN J. A., MABB A. M., KING I. F., MIRIYALA J., TAYLOR-BLAKE B., SCIAKY N., DUTTON J. W., LEE H.-M., CHEN X., JIN J., BRIDGES A. S., ZYLKA M. J., ROTH B. L., PHILPOT B. D.** Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of *UBE3A* in neurons. *Nature*. 2012, **481**(7380): 185-189.
- 30) **HYPPA J. M., REICHLE J., DIMIAN A., CHEN M.** Communication modality sampling for a toddler with Angelman syndrome. *Language, Speech, and Hearing Services in Schools*. 2013, **44**: 327-336.
- 31) **CHANG C.-W., HSU H.-K., KAO CH.-CH., HUANG J.-Y., KUO P.-L.** Prenatal diagnosis of Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome for fetuses with suspicious deletion of chromosomal region 15q11-q13. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2014, **125**(1): 18-21.
- 32) **KALLIONIEMI A., KALLIONIEMI O.-P. SUDAR D., RUTOVITZ D., GRAY J. W., WALDMAN F., PINKEL D.** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992, **258**: 818-821.
- 33) **KARA B., KARAMAN B., ÖZMEN M., ÖZGÜR R. R., ÇALIŞKAN M., KAYSERILI H., BAŞARAN S.** Angelman syndrome: clinical findings and follow-up data of 14 patients. *Turkish Journal of Pediatrics*. 2008, **50**(2): 137-142.

- 34) **LALANDE M., CALCIANO M. A.** Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, **64**(7-8): 947-960.
- 35) **LI G., QIU S.** Neurodevelopmental underpinnings of Angelman syndrome. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*. 2014, **6**: 52-56.
- 36) **LUDVÍKOVÁ M., PEŠTA M., HOLUBEC L. Jr., KALFEŘT D.** Nové aspekty patobiologie nádorů. *Česko-slovenská Patologie*. 2009, **45**(4): 94-99.
- 37) **MANE S., CHATTERJEE R.** Angelman syndrome: The blurred lines of interpretation in cognitive defects. *Journal of Pediatric Neurosciences*. 2015, **10**: 70-72.
- 38) **MARGOLIS S. S., SELL G. L., ZBINDEN M. A., BIRD L. M.** Angelman syndrome. *Neurotherapeutics*. 2015, **12**: 641-650.
- 39) **MOLFETTA G. A. D., FERREIRA C. A., VIDAL D. O., GIULIANI L. R., MALDONADO M. J., SILVA W. A.** 1031-1034delTAAC (Leu125Stop): a novel familial UBE3A mutation causing Angelman syndrome in two siblings showing distinct phenotypes. *BMC Medical Genetics*. 2012, **13**(1).
- 40) **NEUBERT G., AU K., DROSSEL K., TZSCHACH A., HORN D., NICKEL R., KAINDL A. M.** Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2–q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion. *Gene*. 2013, **512**(2): 453-455.
- 41) **PANDA A. K., KAR S. K., GOPINATH G.** Angelman syndrome in three biological siblings: Focusing on the neuropsychiatric domain. *Journal of Pediatric Neurosciences*. 2013, **8**: 213-216.
- 42) **PETERS S. U., KAUFMANN W. E., BACINO C. A., ANDERSON A. W., ADAPA P., CHU Z., YALLAMPALLI R., TRAIPE E., HUNTER J. V., WILDE E. A.** Alterations in white matter pathways in Angelman syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2011, **53**(4): 361-367.
- 43) **PUSHKAREV D., NEFF N. F., QUAKE S. R.** Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nature Biotechnology*. 2009, **27**(9): 847-850.

- 44) **RAFF R., SCHWANITZ G.** Fluorescence *in situ* hybridization. General principles and clinical application with special emphasis to interphase diagnostics. *Indian Journal of Human Genetics*. 2001, **1**(1): 65-75.
- 45) **RAMANATHAN K. R., MUTHUSWAMY D., JENKINS B. J.** Anaesthesia for Angelman syndrome. *Anaesthesia*. 2008, **63**(6): 659-661.
- 46) **SADIKOVIC B., FERNANDES P., ZHANG V. W., WARD P. A., MILOSLAVSKAYA I., RHEAD W., ROSENBAUM R., GIN R., ROA B., FANG P.** Mutation update for *UBE3A* variants in Angelman syndrome. *Human Mutation*. 2014, **35**(12): 1407-1417.
- 47) **SAHOO T., BACINO C. A., GERMAN J. R., SHAW CH. A., BIRD L. M., KIMONIS V., ANSELM I., WAISBREN S., BEAUDET A. L., PETERS S. U.** Identification of novel deletions of 15q11q13 in Angelman syndrome by array-CGH: molecular characterization and genotype–phenotype correlations. *European Journal of Human Genetics*. 2007, 943-949.
- 48) **SINGHMAR P., KUMAR A.** Angelman syndrome protein *UBE3A* interacts with primary microcephaly protein ASPM, localizes to centrosomes and regulates chromosome segregation. *PLoS ONE*. 2011, **6**(5): 1-12.
- 49) **SLABÝ O.** *Molekulární medicína*. Praha: Galén. 2014, 598 s. ISBN 978-80-7492-121-6.
- 50) **TAN W.-H., BACINO C. A., SKINNER S. A., ANSELM I., BARBIERI-WELGE R., BAUER-CARLIN A., BEAUDET A. L., BICHELL T. J., GENTILE J. K., GLAZE D. G., HOROWITZ L. T., KOTHARE S. V., LEE H.-S., NESPUCA M. P., PETERS S. U., SAHOO T., SARCO D., WAISBREN S. E., BIRD L. M.** Angelman syndrome: Mutations influence features in early childhood. *American Journal of Medical Genetics A*. 2011, **155A**(1): 81-90.
- 51) **THIBERT R. L., LARSON A. M., HSIEH D. T., RABY A. R., THIELE E. A.** Neurologic manifestations of Angelman syndrome. *Pediatric Neurology*. 2013, **48**(4): 271-279.

- 52) **THIBERT R. L., PFEIFER H. H., LARSON A. M., RABY A. R., REYNOLDS A. A., MORGAN A. K., THIELE E. A.** Low glyceic index treatment for seizures in Angelman syndrome. *Epilepsia*. 2012, **53**(9): 1498-1502.
- 53) **VENDRAME M., LODDENKEMPER T., ZAROWSKI M., GREGAS M., SHUHAIBER H., SARCO D. P., MORALES A., NESPECA M., SHARPE C., HAAS K., BARNES G., GLAZE D., KOTHARE S. V.** Analysis of EEG patterns and genotypes in patients with Angelman syndrome. *Epilepsy & Behavior*. 2012, **23**(3): 261-265.

11 SEZNAM ELEKTRONICKÝCH ZDROJŮ

1) <http://angelman.cz/>¹

Co je Angelmanův syndrom? *Angelman CZ* [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://angelman.cz/index.php/zakladni>

2) <http://cidd.unc.edu/>²

About Angelman syndrome. *UNC* [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://cidd.unc.edu/Angelman-Syndrome/about.aspx>

3) <http://angelman.org/>³

WILLIAMS CH. Diagnostic testing. *Angelman Syndrome Foundation* [online]. 2008 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://www.angelman.org/understanding-as/medical-info/diagnostic-testing/>

4) <http://cureangelman.net/>⁴

BURDINE R. D., SHELDON E. Genetic testing for Angelman syndrome 101. *Foundation for Angelman Syndrome Therapeutics* [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://www.cureangelman.org/what-testing101.html>

5) <http://new.biologie.upol.cz/>⁵

Sekvenování DNA. [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.htm>

12 ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK

- Obr. 1: About Angelman syndrome. *NSW Government* [online]. 2013 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z:
<http://www.seslhd.health.nsw.gov.au/AS2013/angelman.asp>
- Obr. 2: Giovan Francesco Caroto. *WIKIPEDIA*. [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: https://it.wikipedia.org/wiki/Giovan_Francesco_Caroto
- Obr. 3: Divisional programs. *University of Florida* [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z:
https://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/programs/angelman_syndrome/ube3a_gene.htm
- Obr. 4: Angelman syndrome. *Genetics 4 Medics* [online]. 2014 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://genetics4medics.com/angelman-syndrome.html>
- Obr. 5: Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genetics in Medicine* [online]. [cit. 2015-11-18]. Dostupné z:
http://www.nature.com/gim/journal/v12/n7/fig_tab/gim201062f2.html
- Obr. 6: **VENDRAME M., LODDENKEMPER T., ZAROWSKI M., GREGAS M., SHUHAIBER H., SARCO D. P., MORALES A., NESPECA M., SHARPE C., HAAS K., BARNES G., GLAZE D., KOTHARE S. V.** Analysis of EEG patterns and genotypes in patients with Angelman syndrome. *Epilepsy & Behavior*. 2012, **23**(3): 261-265.
- Obr. 7: **WILLIAMS CH.** Diagnostic testing. *Angelman Syndrome Foundation* [online]. 2008 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z:
<http://www.angelman.org/understanding-as/medical-info/diagnostic-testing/>
- Obr. 8: **VERMEESCH J. R., DEBIEC-RYCHTER M., MELOTTE C., MAAS N., FRYNS J.-P., DEVRIENDT K.** Molecular karyotyping: towards improved pre- and postnatal diagnosis. [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z:
<http://www.biologia.uniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-15/03-Vermesch.html>

Obr. 9: **BURDINE R. D., SHELDON E.** Genetic testing for Angelman syndrome 101. *Foundation for Angelman Syndrome Therapeutics* [online]. [cit. 2015-11-18]. Dostupné z: <http://www.cureangelman.org/what-testing101.html>

Obr. 10: **ZORNÍKOVÁ G.** Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů. *ChemPoint* [online]. 2012 [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probioticky-mikroorganismu>

Tab. 1: **THIBERT R. L., LARSON A. M., HSIEH D. T., RABY A. R., THIELE E. A.** Neurologic manifestation of Angelman syndrome. *Pediatric Neurology*. 2013, **48**(4): 271-279.

13 SEZNAM ZKRATEK

AS	Angelman syndrome; Angelmanův syndrom
ATFs	artificial transcription factors; umělé transkripční faktory
<i>ATP10C</i>	gene encoding an aminophospholipid-transporting ATPase; gen pro ATPázu transportující aminofosfolipidy
BACs	bacterial artificial chromosomes; umělé bakteriální chromozomy
BP	breakpoints; breakpointy; zlomové body
cDNAs	complementary DNA; komplementární DNA
CGH	comparative genome hybridization; komparativní genomová hybridizace
CNS	central nervous systém; centrální nervová soustava
CpG	Cytosin-phosphate-guanin; cytosin-fosfát-Guanin
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat; seskupené pravidelně nahuštěné krátké palindromické repetice
CT	computed tomography; počítačová tomografie
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynucleotide triphosphate; deoxynukleotid trifosfát
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate; dideoxynukleotid trifosfát
DTI	diffusion tensor imaging; difuzní tenzorové zobrazení
E6AP	E6 associated protein; protein spojený s UBE3A
EEG	electroencephalogram; elektroencefalogram
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization; fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GABA A receptor	receptor, its ligand is γ -aminobutyric acid; receptor, jehož ligandem je kyselina gama-aminomáselná
<i>MAGEL2</i>	melanoma associated antigen, family L2
Mb	megabase; megabáze
MRI	magnetic resonance imaging; magnetická rezonance
PPi	pyrophosphate; pyrofosfát
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce

SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N; gen kódující jeden polypeptid z malého jaderného ribonukleoproteinového komplexu
TALEs	transcription activator-like effectors
<i>UBE3A</i>	ubiquitin protein ligase E3A; gen pro ubikvitin ligázu E3A
UPD	uniparental disomy; uniparentální dizomie
Zfp 127	zinc finger protein 127; zinkový prst 127