

Farmaziako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

**PRADER-WILLI SINDROMEA: OINARRI GENETIKOA,  
DIAGNOSTIKOA ETA TERAPIA GENIKOA**

*Egilea: Maria Elortegi Mendizabal*

*2023-2024 ikasturtea*

## AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	1
2. HELBURUAK .....	2
3. METODOLOGIA.....	2
4. GARAPENA .....	4
4.1. PWSren OINARRI GENETIKOA.....	4
4.1.1. 15q11-13 eskualdeko geneak eta PWSren sintomatologiaren arteko erlazioa.....	6
4.2. DIAGNOSTIKORAKO TEKNIKA MOLEKULARRAK.....	8
4.2.1. Metilazio patroiarene analisi.....	10
4.2.2. FISH.....	11
4.2.3. Mikroarrai kromosomikoak.....	12
4.2.4. Mikrosateliteen analisi .....	13
4.3. TERAPIA GENIKOAK GARAPEN BIDEAN.....	14
4.3.1. Terapia epigenetikoaren itua: Inpronta guneko CpG irlen metilazioa .....	14
4.3.2. Histonen modifikazioa terapia epigenetiko gisa .....	15
4.3.3. SMCHD1en inhibizioa terapia epigenetiko gisa .....	16
4.3.4. Adenobirusen bidezko terapia genikoa .....	17
5. ONDORIOAK .....	18
6. BIBLIOGRAFIA .....	19

## LABURPENA

Prader Willi Sindromea aitarengandik jasotako 15. kromosomako q11-13 eskualdeko geneen adierazpenean arazoak daudenean garatzen den gaixotasun arraroa da. Gaixotasunaren oinarrian 3 akats genetiko daude: delezioa, disomia amatiarra eta inpronta guneko akatsak, lehenengoa PWS kasu gehienek eragile izanik. Horrek gene ezberdinen adierazpen galera dakar, eta horrekin batera adinaren arabera aldatzen den gaixotasunaren sintomatologia bereizgarria: hipotonia, hiperfagia eta obesitatea. 15q11-13 eskualdeko gene batzuk proteinak kodetzen dituzte (MKRN3, MAGEL2, NDN, NPAP1, SNURF-SNRPN), eta beste batzuk RNA molekularak (snoRNAs: SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109A, SNORD116, IPW, SNORD115, SNORD109B). Geneen eta sintomatologiaren arteko erlazioa soilik kasu batzuetan ezagutu ahal izan da. Gaixotasunaren diagnostiko klinikorako irizpideak zehaztuta dauden arren, ezinbestekoa da diagnostiko molekularren bidezko konfirmazioa ondorengo teknikak erabiliz: metilazio patroien analisia, FISH, mikroarrai kromosomikoak eta mikrosateliteen analisia. Egun, sintomak soilik farmakologikoki tratatu daitezke, baina gaitza errotik sendatzea helburu duten zenbait terapia geniko garapen bidean daude. Horien artean terapia epigenetikoak nabarmentzen dira, PWSko inpronta guneko aldaera epigenetikoak modulatu (DNAren metilazioa, histonen metilazioa eta histonen azetilazioa), eta DNA sekuentzian aldaketarik eragin gabe, geneen adierazpena erregulatzen dutenak. Besteak beste, DNA metiltransferasen inhibitzaileak eta CRISPR/Cas9 sistema. Adenobirusen bidezko terapia genikoen bideragarritasuna ere frogatzen ari dira. Nahiz eta PWSren oinarri genetikoaren inguruan nahikoa informazio izan, oraindik asko dago ikertzeko. Eta hori ezinbesteko urratsa da gaitza errotik sendatzea helburu duten terapia geniko seguru eta eraginkorrak garatu ahal izateko.

## 1. SARRERA

Prader-Willi Sindromea (PWS) gaixotasun arraro, multisistemiko eta konplexua da. Gaixotasun arraro gisa sailkatzen da bere prebalentzia 1/10.000 - 30.000koa delako, eta multisistemiko eta konplexu gisa definitzen da sistema endokrinoan, kognitiboan eta neurologikoan eragiteaz gain, metabolismo eta portaera asalduren eragile izan daitekeelako.<sup>1</sup> Egun, munduan PWSdun 400.000 gaixo inguru daudela estimatzen da. Sexuaren arabera prebalentzia 1:1 erakoa da, eta % 3ko hilkortasun tasa du.<sup>2,3</sup>

Gaixotasun genetikoa da, izan ere, aitarengandik jasotako 15. kromosomako q11-13 eskualdeko geneetan mutazioak daudenean garatzen da. PWS eragiten duten mutazioak 3 motatakoak izan daitezke: delezioak, disomiak edota inpronta akatsak.<sup>4</sup> Mutazio motaren arabera, sintomatologia aldakorra da. Halere, PWS pairatzen dutenen artean badaude ohikoak diren sintoma batzuk, adinaren arabera aldatzen direnak. Esaterako, haurdunaldian zehar, oro har, fetu gaixoen hazkuntza atzeratua egon ohi da, eta, ondorioz, haur jaio berriek pisu eta tamaina txikia izaten dute.<sup>5</sup> Lehenengo bi urteetan sintoma nagusienak hipotonia, jateko arazoak, irensteko arazoak, listu lirdingatsua, negar ahula, mugimenduen gutxipena eta funtzio muskular eta motoreen garapen motela izaten dira. 8. hilabetetik aurrera hipotonia hobetzen den arren, masak eta tonu muskularrak behar baino baxuagoa izaten jarraitzen du. 2 urtetatik aurrera, ordea, hiperfagia, pisuaren handipena, obesitatea, hazkuntza atzerapena eta garapenean atzerapen orokorra nagusitzen dira. Hain zuzen ere, obesitatea da PWS pairatzen dutenen ezaugarri bereizgarriena, eta, aldi berean, arriskutsuena. Izan ere, hiperfagiaren, metabolismo basalaren gutxipenaren eta aktibitate fisikoaren gutxipenaren ondorioz garatzen den obesitatea da gaixoen heriotza kausa nagusia.<sup>1,2</sup> Gainera, 8 urtetatik aurrera, ohikoa izaten da hipogonadismoa, eta horrekin lotuta, pubertaroaren atzerapena eta hipogonadismoa. Izan ere, hormona gonadotropikoen (hormona luteinizatzailea eta hormona folikulu-estimulatzailea), sexu hormonon (testosterona eta estrogenoa) eta hazkuntza hormonaren (GH) jariapena gutxituta egoten da. Horrez gain, ohikoak izaten dira garapen intelektualaren gutxipena, ikasteko arazoak, ulermen arazoak eta portaera arazoak. Hala nola, burugogorkeria, oldarkortasuna, norbere burua zauritzea, antsietatea, depresioa eta manipulazio jarrerak.<sup>1,4</sup> Helduaroan sintomak arindu egiten dira. Portaera arazoak gutxitzeaz gain, elikatzeko orduan azkar asetzen direnez, hein batean behintzat, obesitate arazoak arindu egiten dira. Egia da, ordea, oraindik ez dagoela argi paziente guztiak fase horretara iristen diren.<sup>5</sup>

PWSdun pazienteek ezaugarri fisiko bereizgarriak ere izaten dituzte. Horien artean nabarmentzekoak dira altuera txikia, esku eta hanka txikiak, eta almendra formako begiak. Gainera, lo egiteko arazoak, eta horrekin batera, egunean zeharreko logurea ere ohikoak

izaten dira. Temperaturaren erregulazio arazoak ere izaten dituzte, eta gainera, minaren atalase handiagoa izan ohi dute.<sup>2,5</sup>

Gaur egun, PWSdun pazienteak tratatzeko hazkuntza hormona (GH) erabiltzen da. Izan ere, hormona horren administrazioaren bidez gaitza errotik sendatzen ez den arren, sintomatologia, hein batean behintzat, arindu egiten da. Hazkuntza hormonarekin tratatzen diren pazienteek, oro har, altuera eta esku eta oinen tamaina normala izan ohi dituzte, eta gainera, aurpegiko ezaugarri bereizgarri arinagoak aurkezten dituzte.<sup>6</sup> Horrez gain, portaera arazoak ere hobetu egiten dira.<sup>1</sup> Bestalde, hormona sexualen administrazioa ere tratamendu gisa erabiltzen da PWSdun pazienteetan hipogenitalismoa eta pubertaroaren hastapen atzerapena kontrolatze aldera.<sup>7</sup>

Gaur gaurkoz, ez dago gaitza errotik sendatzen duen tratamendurik, baina zenbait ikerketa talde terapia genikoaren erabilera aztertzen ari dira.

## **2. HELBURUAK**

Gradu amaierako lan honen helburu nagusia Prader-Willi Sindromearen inguruko lan bibliografiko bat egitea da. Alde batetik, PWS eragiten duten akats genetiko nagusiak aztertuko dira, eta horretarako 15. kromosomako q11-13 eskualdeko delezio, disomia edota inpronta akatsetan sakonduko da. Horrekin batera, kaltetutako geneen eta gaitzaren sintomatologiaren arteko erlazioa aztertuko da.

Beste alde batetik, gaur egun diagnostikorako erabiltzen diren teknika molekularrak aztertuko dira. Gaixotasun genetikoa izanik, diagnostiko goiztiar batek paziente hauen bizi kalitatea hobetzen lagun dezake. Izan ere, gaixotasuna bere horretan sendatzen duen tratamendurik egon ez arren, PWS konfirmatzen den kasuetan pazienteei disziplina anitzeko arreta eskaintzen zaie. Hala nola, jarraipen nutrizionala, laguntza psikologikoa eta terapia fisikoa. Zenbat eta lehenago jaso arreta hori, pazientearentzako onuragarriagoa da.<sup>2</sup>

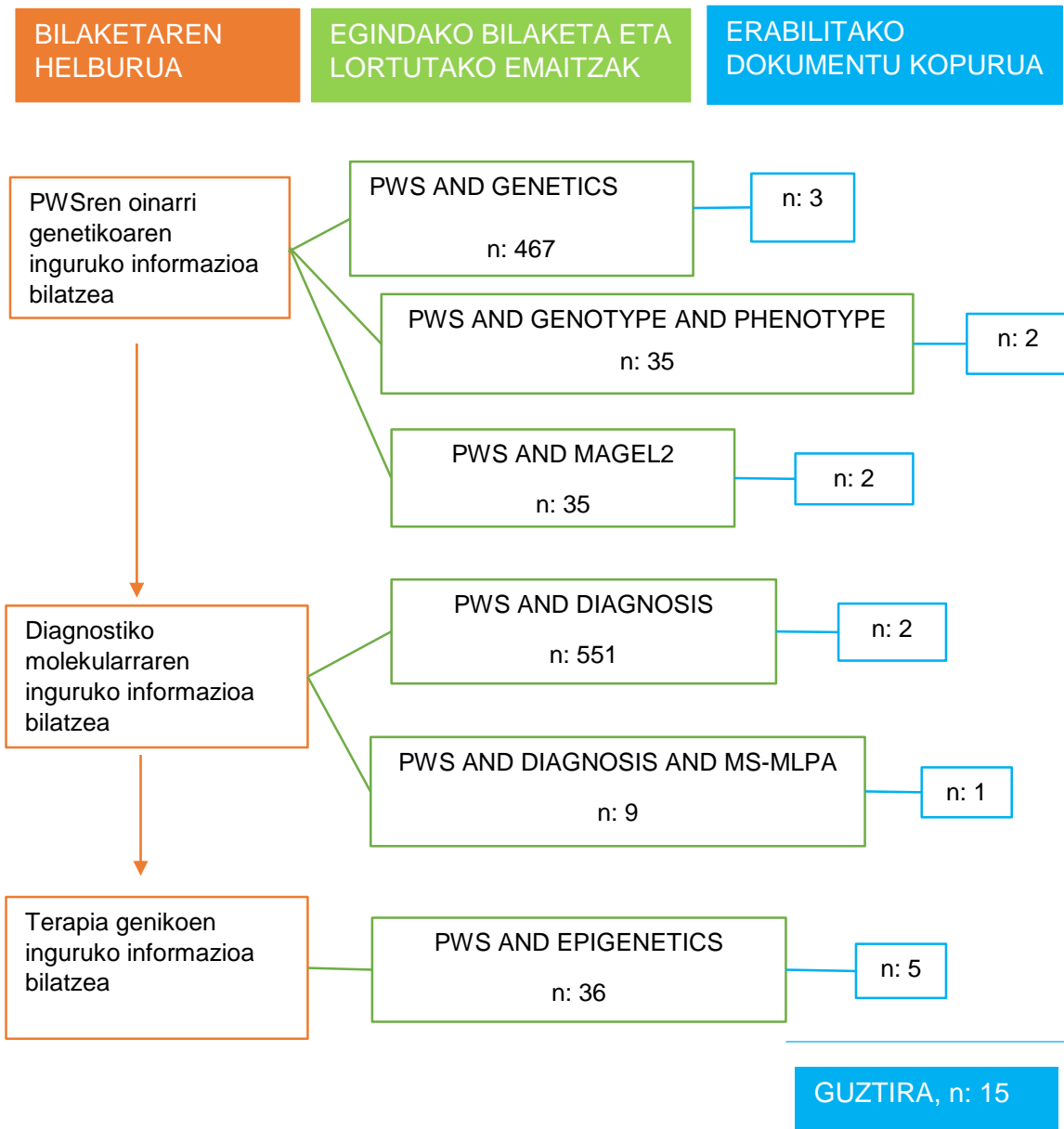
Azkenik, gaixotasunari aurre egiteko garapen bidean dauden terapia genikoen berrikusketa egingo da, eta horretarako, gaur egun abian dauden ikerketetan sakonduko da.

## **3. METODOLOGIA**

Lan hau osatzeko bilaketa bibliografikoa egin da bilatzaile gisa PubMed datu basea erabiliz. Egin den bilaketa nagusian iragazki komun bat erabili da: soilik azken 5 urteetan argitaratutako dokumentuak hartu dira aintzat. Hitz gako ezberdinak konbinatu dira datu basearen “AND” operadorea erabiliz bibliografia bilatzeko orduan.

1. irudian bilaketa bibliografikoa nola gauzatu den erakusten da. Bilaketa bakoitzaren helburua zein izan den adierazten da, eta kasu bakoitzean lortutako artikuluko kopurua zenbatekoa izan

den. Bilatzaileak aurkitutako artikulua horiei gainbegiratu bat eman, eta bilaketa bakoitzerako gehien egokitzen diren artikulua aukeratu dira (urduz adierazitako kopuruak), guztira 15 izanik.



### 1. irudia. PubMed datu basea erabiliz egin den bilaketa bibliografikoaren eskema.

Bestalde, lana osatu ahala, beharrezkoa izan den kasuetan, bilatzaile bera erabiliz bilaketa gehiago egin dira, baina azken 5 urteetako iragazki hori aplikatu gabe. Horrela, 15 artikulua horietaz aparte, 8 artikulua gehiago aurkitu dira PubMed bilatzailean.

PubMed datu baseaz aparte, beste zenbait iturri fidagarri ere kontsultatu dira, besteak beste, NIH (National Institutes of Health), SciELO (Scientific Electronic Library Online), NHGRI

(National Human Genome Research Institute), SEQC<sup>ML</sup> (Sociedad Española de Medicina de Laboratorio), SEFH (Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria), RiuNet (Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica de Valencia), Pediatría Integral (Revista Oficial de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria), NHS England Genomic Education Programme, Euskadi.eus, Science Direct, ResearchGate, MRC Holland biotechnology company eta Creative Biomart company.

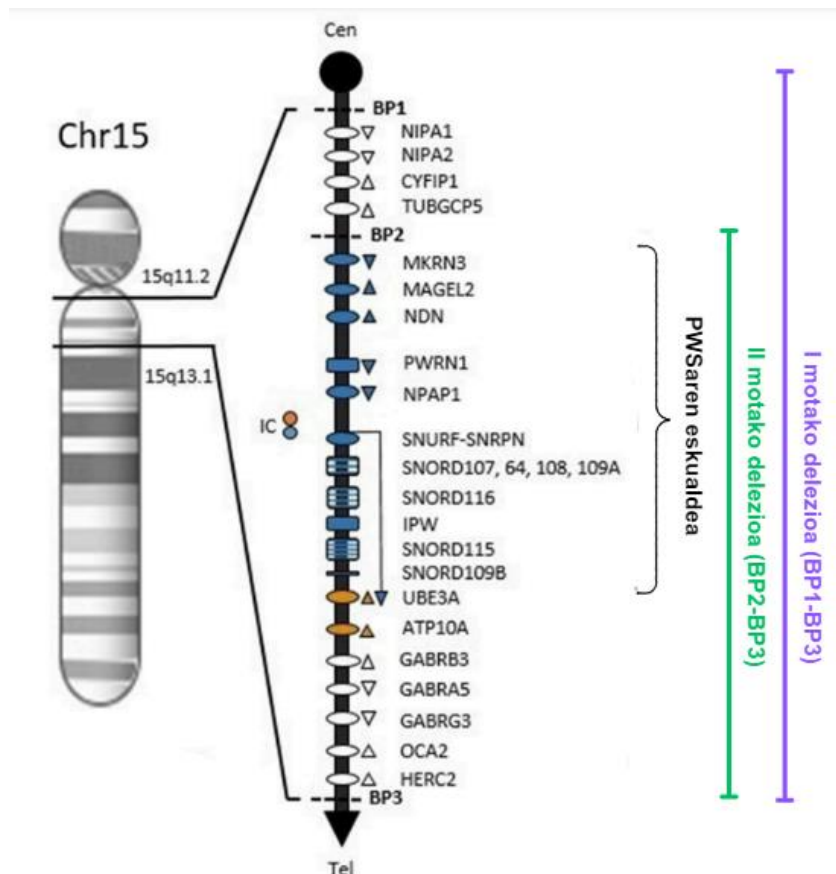
## **4. GARAPENA**

### **4.1. PWSren OINARRI GENETIKOA**

Prader-Willi Sindromearen oinarrian 15. kromosomako alterazio genetikoak daude. Egoera fisiologikoan, amarengandik jasotako 15q11-q13 eskualdeko geneak inpronta bidez erregulatuta daude, alegia, zitosina guanina dinukleotido (CpG) irlen metilazioaren bidez isilarazita daude. Ondorioz, gene horien adierazpena monoalelikoa da, hots, soilik aitarengandik jasotako aleloak adierazten dira. DNAREN metilazio profila gametogenesisian zehazten denez, hurrengo belaunaldira transmititzen da.<sup>7</sup>

PWSren oinarrian 3 akats genetiko mota daude: aitarengandik jasotako 15q11-q13 eskualdearen delezioa (kasuen % 65 - % 75), disomia amatiarra (kasuen % 20 - % 30) eta inpronta akatsak (kasuen % 1 - % 3).<sup>3</sup>

PWS eragiten duen akats genetiko ohikoena aitarengandik jasotako 15q11-q13 eskualdeko delezioak dira. Eskualde horretan 3 haustura gune daude: BP1 (zentromerotik hurbilen), BP2 (BP1etik 500Kb-tara) eta BP3 (distalena) (2.irudia). Hain zuzen ere, haustura gune horietatik ematen dira PSW eragiten duten delezioak. I motako delezioa BP1 eta BP3 artean ematen da, eta, ondorioz, 6 Mb inguru galtzen dira. Aldiz, II motakoan BP2 eta BP3 arteko material genetikoak galtzen da (5,3 Mb inguru).<sup>4</sup> 2. irudian ikus daitekeen bezala, I motako delezioa pairatzen duten gaixoei II motakoa pairatzen dutenek baino 4 gene gehiago galtzen dituzte, eta horren ondorioz, gaixo horiek portaera-arazo eta arazo psikologiko gehiago dituzte.<sup>8</sup>



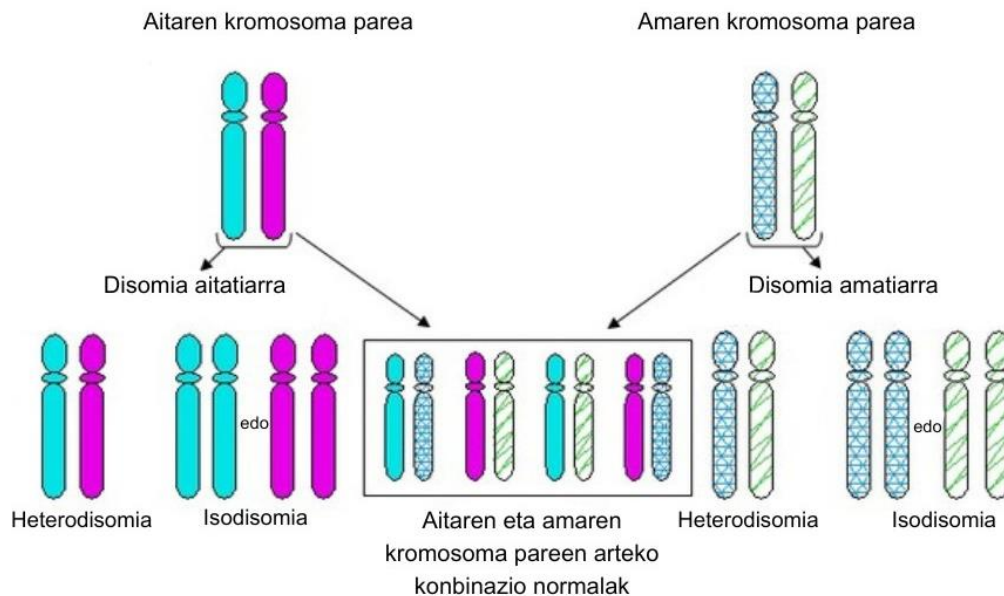
- Adierazpen bialelikoa
- Adierazpen monoalelikoa, aitatiarra
- Adierazpen monoalelikoa, amatiarra
- Transkripzio norabidea

**2. irudia. 15q11-13 eskualdea.** Eskualde horretan dauden geneak, eta gene bakoitza ze norabidetan transkribatzen den erakusten da. Ikur obalatuak, proteinak kodifikatzen dituzten geneak; laukizuzenak, RNA geneak; haustura guneak: BP1, BP2 eta BP3; Cen: zentromeroa; Tel: telomeroa; IC: inpronta gunea. (moldatua<sup>1</sup>)

PWS eragiten duen bigarren akats genetiko ohikoena disomia amatiarra da. Kasu horretan, banakoak amarengandik 15. kromosomaren bi kopia jasotzen ditu, eta aitarengandik kopia bakar bat ere ez.<sup>9</sup> Kontuan izanik amarengandik jasotako 15q11-13 eskualdea inpronta bidez isilarazita dagoela, disomia amatiarra pairatzen duten gaixoek ez dituzte eskualde horietako geneak adierazten. Disomia amatiarraren baitan bi mota bereizten dira: heterodisomia eta isodisomia (3. irudia). Heterodisomiaren kasuan, I. zatiketa meiotikoan akatsak gertatzen dira, kromosoma homologoak ez dira banantzen, eta beraz, ondorengoak guraso baten 2 kromosoma homologoak jasotzen ditu. Isodisomiaren kasuan, ordea, akatsa II. zatiketa



meiotikoan gertatzen da. Ondorioz, ondorengoak amaren kromosoma bakar bat jasotzen du, baina kromosoma hori bikoiztuta.<sup>10</sup>



### 3.irudia. Disomia amatiarra. Heterodisomia eta isodisomia. (moldatua<sup>11</sup>)

Arestian aipatu bezala, inpronta akatsek, hots, aitarengandik jasotako 15. kromosomako q11-13 eskualdean inprontarekin erlazionatutako mutazioek ere PWS eragin dezakete. Baina mota horretako akatsak ez dira horren ohikoak. Berez, eskualde horretako geneak, aitarengandik jasotakoak, adierazi egin behar dira. Baina esaterako mikrodelezioak edo epimutazioak gertatzen badira, eta gene horiek ez badira adierazten, PWS garatzen da.<sup>12</sup> Epimutazioak DNA sekuentzian aldaketarik eragin gabe geneen adierazpenean aldaketak eragiten dituzten mutazioak dira. Epimutazio horiek geneen sustatzailetan edota histonen itzulpen ondoko aldaketetan gertatu ohi dira.<sup>13</sup> PWSdun pazienteetan, epimutazio horien ondorioz kromosoma aitatiarrak inpronta amatiarra du, eta horrek, kromosoma aitatiarreko geneak ez adieraztea eragiten du. Bestalde, inpronta akatsak mikrodelezioen ondorioz ere gertatzen dira. Enbriogenesisian 4,3Kb inguruko galerak eman daitezke inpronta gunean, adibidez. SNURF-SNRPN genearen 1 exoian, eta, ondorioz, PWS garatu.<sup>14</sup>

#### 4.1.1. 15q11-13 eskualdeko geneak eta PWSren sintomatologiaren arteko erlazioa

15q11-13 eskualdean inpronta bidez erregulatuta dauden geneetako batzuk proteinak kodetzen dituzte (MKRN3, MAGEL2, NDN, NPAP1, SNURF-SNRPN), eta beste batzuk berriz, RNA molekulak (snoRNAs: SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109A, SNORD116, IPW, SNORD115, SNORD109B). Genotipo-fenotipo erlazioa gaur gaurkoz oraindik guztiz zehaztuta ez dagoen arren, geneak eta sintomatologia erlazionatzen dituzten hipotesi ezberdinak daude. Jarraian, gene horietako batzuetan sakonduko da.<sup>1</sup>

MKRN3 geneak kodetzen duen proteina pubertaroaren hastapenarekin erlazionatuta dago. MKRN3 proteinak hipotalamo-hipofisi ardatzean eragiten du, izan ere, gonadotropinaren hormona askatzailearen (GnRH) sekrezioa inhibitzen du hipotalamoan. GnRHak bere horretan hipofisian eragiten du pubertaroaren hastapenarekin zuzenki erlazionatuta dauden hormona luteinizatzailearen (LH) eta hormona folikulu estimulatzailearen (FSH) askapena bultzatuz. Hormona luteinizatzaileak gizonezkoetan testosteronaren eta emakumeetan progesteronaren askapena erregulatzen du. Hormona folikulu estimulatzaileak berriz, estrogenoaren askapenean eragiten du. PWSren kasuan, MKRN3 genearen adierazpena gutxituta dagoenez, GnRHren mailak handituta egon beharko lirateke, eta horren ondorioz, baita LH eta FSH mailak ere. Hormona horien desoreka legoke pubertaroaren hastapen goiztiarraren atzean. Baina PWSdun pazienteetan kontrakoa gertatzen da, alegia, pubertaroa atzeratuta egoten da. Egun, oraindik ez dago MKRN3 genearen adierazpen galeraren eta PWSren sintomatologiaren arteko kontraesanarentzako azalpenik. Hori dela eta, litekeena da pubertaroaren hastapen atzerapena beste gene batzuen adierazpen okerrarekin erlazionatuta egotea.<sup>4, 15, 16</sup>

MAGEL2 geneko mutazioak hiperfagiarekin erlazionatu dira. Izan ere, gene horrek kodetzen duen proteinak hipotalamoan jateko gogoak kontrolatzen duten zenbait molekulekin interakzionatzen du. NPY (Neuropeptide Y) eta AgRP (Agouti-related peptide) peptidoak hipotalamoan adierazten dira, eta mekanismo zentralen bidez gosearen handipena eragiten dute. Bestalde, propiomelanokortinaren (POMC) lisitik eratortzen den  $\alpha$ -MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) hormonak kontrako efektua du, hots, gose sentazioa gutxitzea eragiten du. Leptinak, besteak beste adipozitotan eta hipotalamoan ekoizten den hormonak, gosearen erregulazioan parte hartzen du POMC neuronak aktibatuz, eta NPY/AgRP neuronak inhibituz. Bada MAGEL2 proteinak, leptinak eragiten duen POMC neuronon despolarizazioa inhibituz eragiten du hiperfagia.<sup>1, 17</sup>

NDN edo NECDIN geneak NECDIN proteina kodetzen du, neuronon garapenean esku hartzen duena. Proteina horrek neuronon garapeneko fase ezberdinetan eragiten du, hala nola, proliferazioan, neuriten eta axoien hazkuntzan eta migrazioan. Ondorioz, ez da harritzekoa NECDINen adierazpena gutxituta dagoenean, esaterako PWS pazienteetan, garapen neuronalak kaltetuta egotea, eta horrek arazo kognitiboak eta garapenean atzerapenak eragitea.<sup>5</sup> Horrez gain, NECDINen adierazpena behar baino txikiagoa denean, arnas hartze irregularrak eta apneak ohikoak izaten dira. Izan ere, behatu da fetu garaian arnasketa prozesua erregulatzen duen zentruaren garapena kaltetzen dela, eta, ondorioz, hipoxia egoerei aurre egiteko zailtasunak daudela. Gainera, NDN genea adierazten duten saguak ikertuz ondorioztatu dute NECDIN sistema serotoninergikoaren garapenarekin erlazionatuta dagoela. Izan ere, sagu horiek, PWS pazienteek bezala, sistema serotoninergikoa kaltetuta

daukate.<sup>18</sup> Bestalde, NECDIN proteinak GnRHaren adierazpenean eragiten du. Ondorioz, NECDIN proteinaren adierazpena gutxituta dagoenean, GnRHaren adierazpena ere gutxitu egiten da, eta horrek hipogonadismoa eragin dezake.<sup>1</sup>

SNURF-SNRPN geneek bi proteina kodetzen dituzte. Alde batetik, SNURF, zeinaren funtzioa oraindik zehaztu gabe dagoen, eta beste alde batetik, SNRPN (SmN). Azken hori ARNm-aren moztitsasketa prozesuan parte hartzen duen proteina ez esentzial bat da. Hau da, ARNm-ren heltze prozesuaren baitan transkrito primariotik introiak ezabatu eta ondoz ondoko exoiak lotzen ditu.<sup>9</sup> Proteinaren funtzioa ezaguna izan arren, bere galeraren eta PWSren sintomatologiaren arteko erlazio zuzenik ez da zehaztu, momentuz.

Horrez gain, SNURF-SNRPN genearen 5' muturrean inpronta gune bat dago, jarraian aipatuko diren 7 RNA nukleolar txikien (snoRNA, *small nucleolar RNA*) adierazpena erregulatuko duena.<sup>4</sup>

SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109A, SNORD116, SNORD115, SNORD109B geneek 7 snoRNA ezberdin kodetzen dituzte. RNA molekula horiek RNA nuklearren (snRNA, *small nuclear*) eta RNA erribosomalaren (rRNA, *ribosomal RNA*) heltze prozesuan parte hartzen dute.<sup>19</sup> Horrez gain, zenbait generen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen dute.<sup>4</sup>

SNORD116 genea batez ere burmuinean adierazten da, eta PWSren sintomatologiaren eragile garrantzitsutzat hartzen da. Izan ere, gose asetasuna, mina, temperatura eta loa erregulatzen duten geneen adierazpenean eragiten du. Ondorioz, SNORD116 genearen adierazpena gutxituta daukaten pazienteek minaren atalase handiagoa, lo arazoak, temperatura erregulatzeko arazoak eta asetasuna kontrolatzeko arazoak izaten dituzte.<sup>6</sup> SNORD116 genearen gabeziak, besteak beste 5q15 eskualdeko PCSK1 genearen adierazpena okerra izatea eragiten du. Gene horrek prohormona konbertasa (PC1) entzima kodetzen du, hots, POMC bezalako prohormonak hormona aktibo bilakatzen dituen entzima. Horrez gain, SNORD116 genearen adierazpena gutxituta dagoenean, ohikoa izaten da GnRH eta intsulina maila baxuak izatea, eta, aitzitik, gose sentsazioa handitzen duen grelin hormonaren mailak behar baino altuagoak izatea. Hormona horien guztien desoreka obesitatearekin eta hipogonadismoarekin erlazionatu dira.<sup>4</sup>

15q11-13 eskualdean badaude funtzio nahiko ezaguneko geneak (NPAP1, IPW, PWRN1 eta abar), baina beraien gabezia ez da PWSren sintomekin erlazionatu.<sup>1</sup>

## **4.2. DIAGNOSTIKORAKO TEKNIKA MOLEKULARRAK**

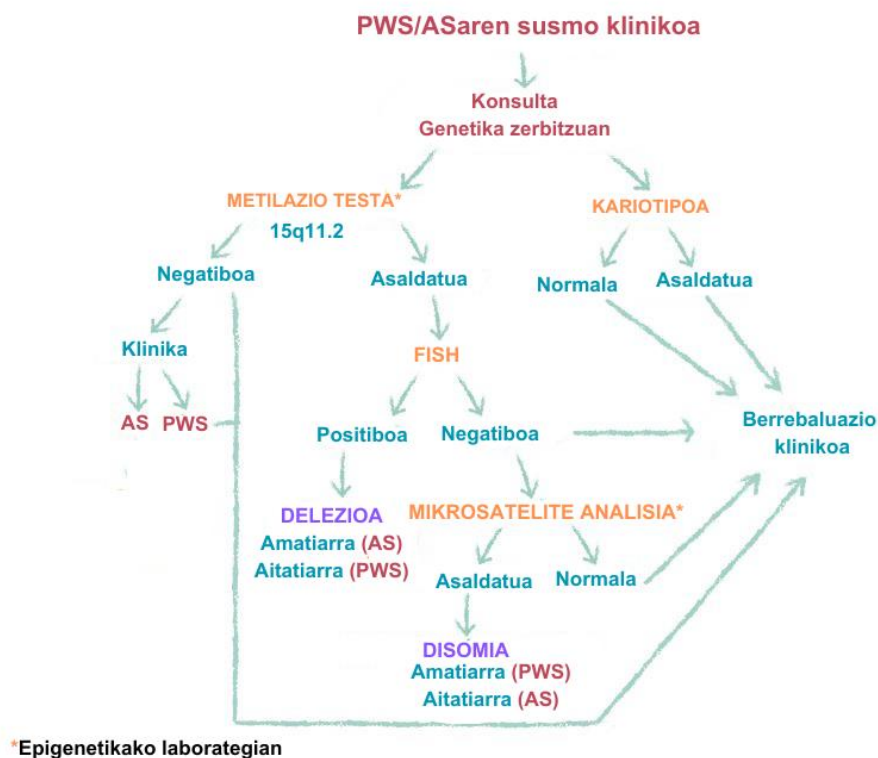
1993. urtean, PWSren diagnostiko klinikorako Holm-en irizpideak zehaztu ziren. Bertan, sintomatologian oinarritutako lehenengo mailako eta bigarren mailako irizpideak definitu ziren, eta irizpide horiek kontuan izanda diagnostiko klinikoa gauzatzen zen. 2001. urtean, ordea,

irizpide horiek berrikusi eta adinaren arabera irizpideak definitu ziren, ondorengo taulan jasota daudenak.<sup>20</sup>

1. taula. PWSren diagnostiko klinikorako adinaren arabera irizpideak.<sup>20</sup>

Adina	Sintomatologia
Haurdunaldian, jaioberritan	Fetuaren mugimendu gutxitua, hipotonia, negar ahula eta kriptorkidia
2 urtera arte	Hipotonia
2-6 urte bitartean	Hipotonia, garapen atzerapen orokorra eta aurpegiko ezaugarri bereizgarriak
6-12 urte bitartean	Hipotonia, garapen atzerapen orokorra eta hiperfagia
13 urtetik aurrera	Atzerapen mentala, hiperfagia, hipogonadismoa, portaera arazoak

Diagnostiko klinikoaz gain, ezinbestekoa da teknika molekularren bidezko konfirmazioa. Erabiltzen diren teknika molekularrak metilazio patroien analisi, FISH (*fluorescence in situ hybridization*) eta mikrosatelite bidezko analisi dira. 4. irudian jasotzen da diagnostiko molekularra egiterakoan jarraitzen diren urratsak.<sup>20</sup>

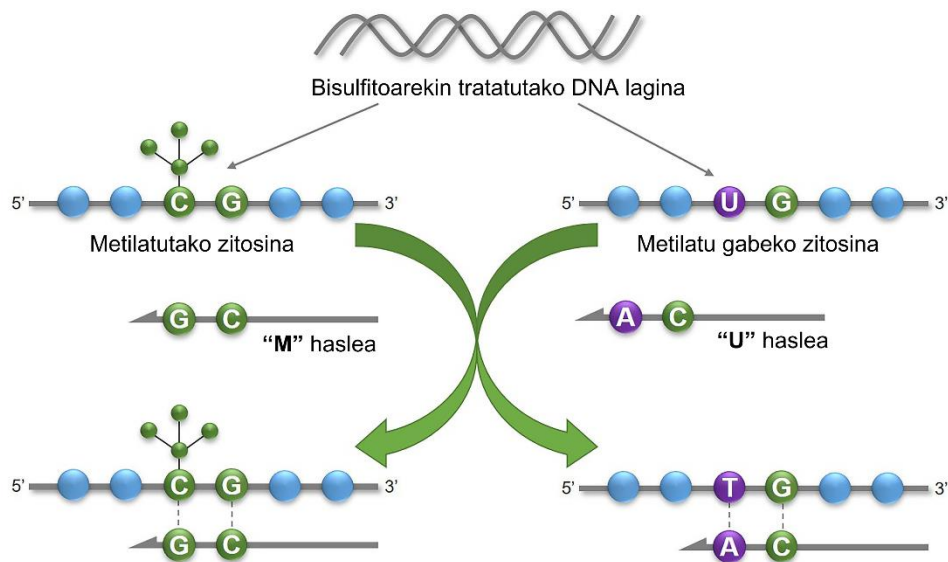


4. irudia. Teknika molekularren bidezko diagnostikoa gauzatzeko urratsak. (moldatua<sup>20</sup>)

#### 4.2.1. Metilazio patroiarene analisi

Diagnostiko molekularren lehenengo pausua 15q11-13 eskualdeko metilazio patroia aztertzea izaten da. DNAREN metilazio patroia aztertzen duten tekniken helburua akatsdun metilazio patroiak detektatzea da. Banako osasuntsuetan amaren aleloa metilatuta dagoenez eta aitarena ez, metilazio patroia % 50koa da. PWSdun pazienteen kasuan, ordea, metilazio patroia % 100koa izan ohi da, hots, hipermetilazioa atzematen da.<sup>7, 12</sup> Teknika horren bidez, delezio, guraso bakarreko disomia eta inpronta akatsak atzeman daitezke, eta kasu batzuetan soilik, mutazio konkretua ezagutu daiteke.<sup>21</sup> Metilazio probetan CpG irlak ezagutzen dituzten entzimak erabiltzen dituzte. DNA metilatuta bada, entzimak ez dira gai DNA digeritzeko. Beraz, PWSdun pazienteen kasuan ez da DNAREN digestiorik ematen.<sup>7</sup>

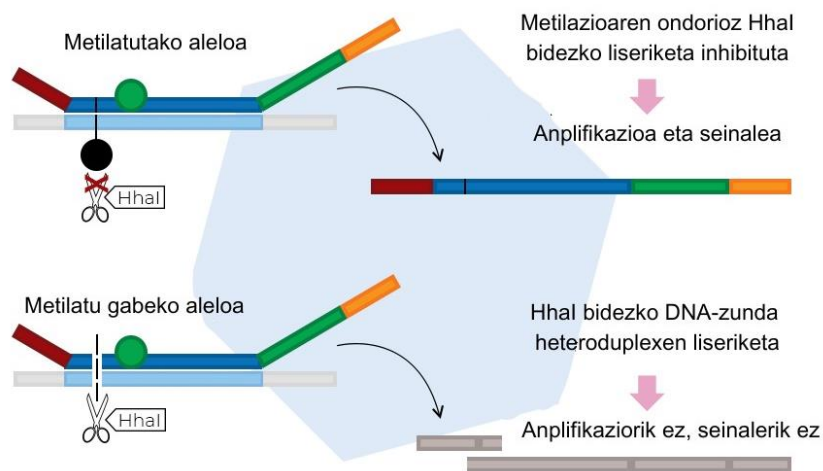
Metilazio patroia detektatzeko teknika arruntenak MS-PCR (*methylation-specific PCR*) eta MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*) dira. MS-PCRan, metilatu gabeko eta metilatutako CpG irlak ezagutzen dituzten hasleak erabiliz, SNRPN genearen 5' muturreko CpG irlen metilazio patroia aztertzen da. Lehenik, DNA lagina sodio bisulfitoarekin tratatzen da, eta CpG irlako zitosenak, baldin eta metilatu gabe badaude, urazilo bilakatzen dira (UpG irlak). Ondoren, DNA lagina PCR bidez anplifikatzen da metilatutako (CpG) eta metilatu gabeko irlak (UpG) ezagutuko dituzten M eta U hasleak erabiliz, hurrenez hurren. DNA anplifikatzeko ahalmena duen haslearen arabera ondorioztatzen da jatorrizko DNA lagina metilatuta edo metilatu gabe dagoen (5. irudia).<sup>22, 23</sup> Teknika horrek ezin du delezio, disomia edota inpronta akatsen artean bereizketarik egin.<sup>2</sup>



5. irudia. MS-PCR tekniken oinarria. (moldatua<sup>23</sup>)

MS-MLPA teknikak 15q11 eskualdeko 5 gune ezberdinetako metilazio patroia detektatzen du. Teknika horretan, aztertu nahi diren sekuentziak zunda espezifikoekin hibridatzen dira.

Jarraian, HhaI endonukleasarekin tratatzen dira, eta azkenik, DNA amplifikatu egiten da. HhaI endonukleasarekin metilatu gabeko DNA-zunda heteroduplexak digeritzen dira. Hortaz, aztergai den sekuentzia metilatu gabe badago, zunda digeritu egiten da, eta osteko amplifikazioak ez du seinalerik ematen. Aitzitik, intereseko sekuentzia metilatuta badago, zunda ez da digeritzen, eta intereseko sekuentzia amplifikatu egiten da (6. irudia). Modu horretan bereiz daiteke intereseko sekuentzien metilazio patroia nolakoa den. MS-MLPA teknikak delezioak detekta ditzake, baina ezin du disomia amatiarraren eta inpronta guneko mutazioen arteko bereizketarik egin.<sup>21, 24</sup>



6. irudia. MS-MLPA teknikaren oinarria. (moldatua<sup>24</sup>)

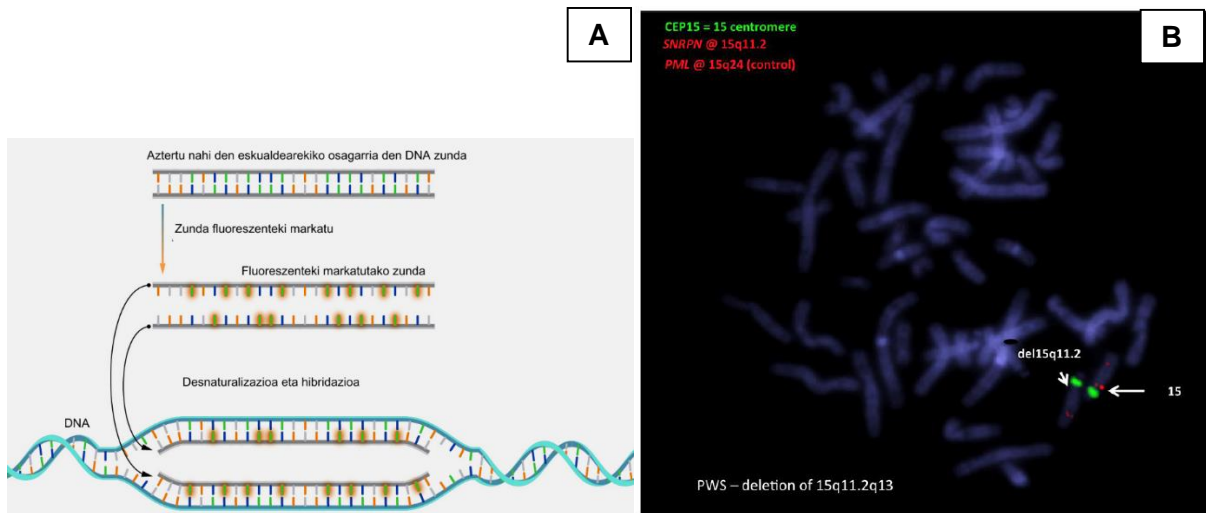
#### 4.2.2. FISH

Metilazio patroia azterketek asaldaduraren bat atzematen badute, jarraian FISH teknika bidezko azterketa egiten da. Kasu horretan, aztertu nahi diren eskualde genetikoko osagarriak diren DNA zundak erabiltzen dira sekuentzia horien ausentzia edo presentzia detektatzeko.<sup>2</sup>

FISH teknika aplikatzeko metafasean dauden linfuzitoen kromosomak aztertzen dira. Izan ere, metafasean material genetikoa guztia kromosometan kondentsatuta dago, eta gainera, kromosomak zelularen plaka ekuatorialean lerrotatzen dira. Beraz, kromosoma mailako akatsak egonez gero, errazago detektatzen dira. G banding deituriko metodologia erabiliz kondentsatutako kromosomak tindatzen dira, eta, ondorioz, kariotipoa ikuskor bilakatzen da. Azkenik, lagina desnaturalizatu (formamida eta temperatura altuak erabiliz), eta kate bakarreko DNA harizpiak intereseko zundekin hibridatzen dira.<sup>2, 25</sup>

Hibridaziorako fluoreszente markatutako zundak erabiltzen dira, detektatu nahi den DNA eskualdearekiko osagarriak direnak. PWSren kasuan, 15q11-13 eskualdearekiko osagarria den DNA zundak erabiltzen dira, eta seinalea fluoreszentsia mikroskopioz aztertzen da.

Zundaren eta laginaren arteko hibridazioa ematen bada, 15q11-13 eskualdearen presentzia konfirmatzen da, eta beraz, delezio kasuak baztertzeko dira. Hibridaziorik ematen ez bada, ordea, 15q11-13 eskualdearen delezioa konfirmatzen da.<sup>26</sup>



**7. irudia. (A) FISH teknikaren oinarria (moldatua<sup>26</sup>) eta (B) FISH teknikaren bidezko PWSren diagnostikoa (moldatua<sup>27</sup>).** Seinale berdea (zentromeroa), seinale gorria kromosomaren bukaera adierazteko (kontrola, PML), seinale gorria zentromeroaren azpian (15q11.2 eskualdea). Seinale gorriaren falta zentromeroaren azpian, PWS.<sup>27</sup>

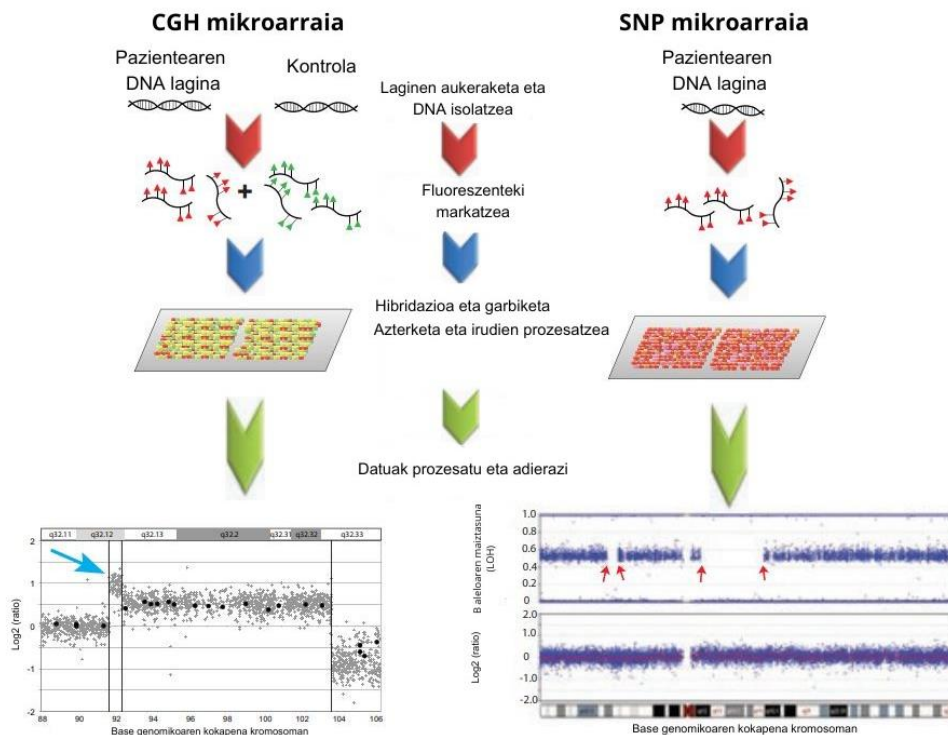
#### 4.2.3. Mikroarrai kromosomikoak

Mikroarrai teknika desoreka genomikoak detektatzeko erabiltzen da, eta CGH (*comparative genomic hybridization*) edo SNP (*single nucleotide polymorphism*) erakoa izan daiteke.

CGH teknikak genomako toki espezifiko batean dagoen DNA kopurua dektatzeko balio du. Horrela, bikoizketen ondoriozko irabaziak edota delezioen ondoriozko galerak atzeman daitezke. Horretarako, fluoreszentezki markatutako pazientearen DNA, beste fluoroforo batekin markatutako kontrol batekin alderatzen da. Bi laginak nahastu egiten dira, eta zundadun porta baten gainean jartzen dira hibridazioa eman dadin. Jasotako fluoroforoen seinaleak interpretatuz ondorioztatu daiteke eskualde horretan aztergai den laginean DNA irabaziak edo galerak dauden.<sup>28</sup>

SNP erako mikroarraiari dagokionez, pazientearen DNA lagina zunda alelo espezifikoak dituen porta baten gainean jartzen da hibridazioa eman dadin. Teknika espezifikoagoa da, delezioak eta bikoizketak detektatzeaz gain, base pare konkretuen aldaketak, hots, polimorfismoak detektatu ditzakeelako.<sup>28, 29</sup>





**8. irudia. CGH eta SNP mikroarraia.** Lehenean, pazientearen DNA eta DNA kontrol bat fluoroforo ezberdinekin markatu eta zunda espezifikoekin hibridatuarazten dira. Seinalearen koloreak erakusten du DNA eskualde ezberdinen ugaritasuna zenbatekoa den pazientearen DNA kontrolarekin alderatuz. SNP mikroarraian berriz, pazientearen DNA zunda alelo espezifikoekin hibridatuarazten da. Jasotako seinalearen arabera, pazientearen polimorfismoak, eta kasu batzuetan delezioak ere detektatzen dira. (moldatua<sup>30</sup>)

#### 4.2.4. Mikrosateliteen analisia

Metilazio testa asaldatu eta FISH emaitz negatiboa lortzen diren kasuan, mikrosateliteen analisia gauzaten da disomia amatiarra dagoen aztertzeke.

Mikrosateliteak genomatik errepikatzen diren DNA sekuentzia laburrak dira (1-6 base pare), normalean ez kodifikatzaileak izaten direnak. Locus konkretu bateko mikrosateliteen errepikapen kopurua espezifikoa izaten da genomatik bakoitzerako, eta beraz, markatzaile genetiko gisa erabili daitezke gaixotasunen diagnostikoan.<sup>31</sup>

Mikrosateliteen analisisiko lehenengo pausua errepikatzen den DNA sekuentzia zein den identifikatzea da. Behin hori ezagututa, errepikatzen den sekuentzia amplifikatzeko hasleak diseinatzen dira, eta PCR emaitzak elektroforesi bidez bistarazten dira.<sup>32</sup>

Elektroforesian lortutako emaitzak interpretatuz, guraso bakarreko disomia eta inpronta akatsak detektatu daitezke. PCR ostean, tamaina ezberdineko 2 aplikoi bereizten badira, alelo bakoitzerako bat, bi kromosomak jatorri ezberdinekoak direla ondorioztatzen da. Kasu horretan, inpronta akatsen ondoriozko PWS kasu baten aurrean egongo ginateke. Aitzitik,



tamaina bakarrek anplikoia detektatzen bada, kromosomak jatorri berekoak izan daitezke, eta, ondorioz, disomia amatiarraren kasu baten aurrean egongo ginateke.<sup>33</sup>

### **4.3. TERAPIA GENIKOAK GARAPEN BIDEAN**

Gaur gaurkoz, PWS soilik farmakologikoki tratatzen da. Alegia, ez dago gaitza errotik sendatzeko gai den farmakorik. Baina helburu hori duten zenbait terapia geniko garapen bidean daude.

Terapia genikoen artean, terapia epigenetikoek garrantzia handia hartu dute ikerketa munduan. Izan ere, PWS bezalako gaixotasun genetikoek ezaugarri epigenetiko bereizgarriak dituzte, eta, beraz, ikerketen iturri bilakatu dira.<sup>34</sup> Terapia epigenetikoak epigenoma zehazten duten, eta beraz, geneen adierazpenean eragiten duten konposatuak identifikatu eta horiekin lan egitean datza, eta bere helburu nagusia ondokoa da: geneen adierazpena modulatzeko, DNA sekuentzian aldaketarik egin gabe.<sup>35</sup> PWSko inpronta gunean 3 aldaera epigenetiko daude, eta horrenbestez, horietariko bakoitza terapia genikorako iturri interesgarriak dira. PWSko inpronta guneko aldaera epigenetiko horiek ondokoa dira: DNAREN metilazioa, histonen metilazioa eta histonen azetilazioa.<sup>34</sup>

#### 4.3.1. Terapia epigenetikoaren iturri: Inpronta guneko CpG irlen metilazioa

Arestian aipatu bezala, PWSrekin erlazionatutako 15q11-13 eskualdeak inpronta amatiarra pairatzen du. CpG irlen metilazioaren ondorioz, gene amatiarrak isilarazita daude. Disomia amatiarraren kasuan, gene amatiar horiek aktibatuz gaixotasuna ekidin ahal izango litzateke. Hori gene amatiarrak demetilatuz lortuko litzateke.<sup>7,9</sup>

CpG irlen metilazioa DNA metiltransferasen (DNMTs) bidez gauzatzen da. DNA metiltransferasek (DNMT1 eta DNMT3A/B) DNAREN metilazio patroia zehaztu eta mantentzen dute, eta horien gabeziak saguetan enbrioi garaiko hiltzea edota jaio osteko hiltzea eragiten du. Metilazio patroia gametogenesisian zehazten da. Oro har, amarengandik jasotako genoma metilatuta egoten da, eta aitarengandik jasotakoa demetilatuta. Aitarengandik jasotako genomaren demetilazioa TET3 (tet methylcytosine dioxygenase 3) entzimaren bidez ematen da. Entzima horrek DNAREN metilatuta dauden 5-metil zitosinak (5mC) 5-hidroximetil zitosina (5hmC) bilakatzen ditu.<sup>34</sup>

DNA metiltransferasaren inhibitzailea den molekula bat erabiliz, inpronta guneko metilazioa modula daiteke, eta, ondorioz, amarengandik jasotako geneen adierazpena ahalbidetu. Esaterako, 5-azadeoxizitidina DNA metiltransferasa inihibitzen du, eta, beraz, isilarazitako gene amatiarrak aktibatuzeko terapia gisa erabili ahalko litzateke. *In vitro* egindako esperimenduetan ikusi da PWSdun pazienteen zelulak DNA metiltransferasaren inhibitzaileak diren 5-azazitidina eta 5-aza-2'-deoxizitidinarekin kultibatuz, amarengandik jasotako SNRPN

genearen aktibazioa ematen dela. Emaizak itxaropentsuak izan arren, gaur gaurkoz, oraindik ez da *in vivo* saiakerarik egin.<sup>34</sup>

CRISPR/Cas9 sistema ere erabiltzen da terapia epigenetikoan demetilaziorako. Oro har, sistema hori ondorengo osagaiez osatuta dago: intereseko DNA sekuentzia ezagutzen duen RNA sekuentzia gidari bat (gRNA) eta DNA kate bikoitza moztuko duen Cas9 endonukleasa. Baina CRISPR/Cas9 sistema demetilaziorako erabiltzen denean, Cas9 endonukleasa inaktibatuta egoten da. Hala ere, CRISPR/Cas9 sistemak gRNAri esker eraldatu nahi den DNA sekuentzia ezagutzeko ahalmena mantentzen du. Egin nahi den aldaketa epigenetikoa gauzatzeko, aldaketa hori katalizatuko duen entzima gehitzen zaio CRISPR/Cas9 sistemari, eta interesatzen zaigun DNAREN zonaldera garraiatzen da bere funtzioa bete dezan. Arestian esan bezala, demetilazioaz arduratzen diren entzimak demetilasak dira.<sup>36</sup> Horien artean, TET (tet methylcytosine dioxygenase) entzimak erabili izan dira, gai baitira DNAREN eskualde espezifikoetan demetilazioa eragiteko. Xu eta lankideek bideraturiko ikerketek frogatu dute CRISPR/Cas9 sistemari lotutako TET1-CD (TET-1 catalytic domain) konplexuak *in vitro*<sup>37</sup>, hala nola, dCas9-TET3CD konplexuak *in vivo*<sup>38</sup> CpG irlen demetilazioa eragiten duela.

#### 4.3.2. Histonen modifikazioa terapia epigenetiko gisa

Histonetan gertatzen diren itzulpen ondoko aldaketak, besteak beste metilazioak eta azetilazioak, geneen adierazpena erregulatzen dute, eta PWSren garapenean eragina dutela ikusi da. Histona metiltransferasak (HMT) eta histona demetilasak (HDM) arduratzen dira histonen metilazio patroia zehazteaz. Aldiz, histonen azetilazio maila histona azetiltransferasaren (HAT) eta histona desazetilasaren (HDAC) aktibitatearen arabera da. Metilo eta azetilo taldeak histonetan gehitu eta kentzeko ahalmena daukaten entzima ezberdin ugari daude, eta terapia epigenetikoaren iturri izan daitezke jarraian azalduko diren kasuetan ikus daitekeen bezala.<sup>35</sup>

ZNF274 (Zinc Finger Protein 27) proteinak alelo amatiarreko geneen adierazpena inhibititu dezakeela ikusi da. Izan ere, proteina horrek, SETDB1 (SETDB1 histona metiltransferasa) bezalako proteinekin konplexu bat eratu eta SNORD 116 gunera bideratzen ditu.<sup>9</sup> SETDB1 proteinak H3 histonaren 9. lisina 3 aldiz metilatzen du (H3K9me3), eta horrek HP1 bezalako proteinak (heterochromatin protein 1) metilo talde horietara lotzea eragiten du. Ondorioz, DNA heterokromatina eran aurkitzen da, eta ezin da geneen transkripzioa eman, polimerasek ezin baitute beraien funtzioa bete.<sup>39</sup> ZNF274 proteina inhibitzeak alelo amatiarreko SNORD 116 genearen aktibazioa eragin dezakeela frogatu da. ZNF274 knock out PWSdun induzitutako ama zelula pluripotenteetatik (iPSC, *induced pluripotent stem cell*) eratorritako neuronetan alelo amatiarreko SNORD 116 gunearen aktibazioa ikusi da, inpronta guneko metilazioan aldaketarik jasan gabe. Baina, ZNF274 proteinaren guztizko delezioa kaltegarria izan daiteke

proteina horrek PWSko eskualdetik aparte, funtzio gehiago betetzen dituelako. Hori dela eta, ZNF274ren guztizko delezioaren orde, proteina horren hartzaileak diren alelo amatiarreko SNORD 116 genearen 6 guneak blokeatzea probatu da. Horrela PWS pazienteen iPSC zeluletatik eratorritako neuronetan SNORD 116 genea aktibatzea lortu da.<sup>40</sup>

Bestalde, 15q11-q13 eskualdeko geneen adierazpenean eragina duten beste 2 histona metiltransferasa ezagutzen dira: G9a (Euchromatic histone lysine N-methyltransferase-2) eta GLP (Euchromatic histone lysine N-methyltransferase-1).<sup>8</sup>

G9a eta GLPren bi inhibitzaile aurkitu dira, UNC0642 eta UNC0638, eta beraien efektua aztertu da PWSdun saguetan eta gizakien fibroblastoetan. Inhibitzaile horiek erabiliz, isilarazita dauden alelo amatiarreko geneen aktibazio partziala lortu da. Saguei inhibitzaile horiek jaio osteko 5-12 egunetan administratuz, SNRPN eta SNORD116 geneen aktibazioa ematen dela ikusi da. Horrez gain, tratamendu bera sagu helduetan erabili denean ere emaitza berdinak lortu dira.<sup>34</sup> G9a/GLP inhibituz gero, H3K9me3 markatzaileak gutxitzen direla ikusi da, baina, inpronta guneko CpG irlen metilazioa ez da aldatzen. Beraz, alelo amatiarren aktibazioa H3K9ren metilazio mailarekiko dependentea dela ondorioztatu da.<sup>8</sup>

G9a/GLP eta ZNF274/SETDB1 konplexuak erlazionatuta egon daitezkeenaren zantzuak daude, nahiz eta oraindik bien arteko lotura ez den guztiz frogatu. SETDB1ek H3 trimetilatzeko (H3K9me3) G9a/GLP konplexuaren beharria izan dezakeela ikusi da. Horrez gain, lortutako emaitzen arabera, bai SETDB1 eta bai G9a/GLP konplexuak, biek, ZNF274ren beharria izan dezakete beraien jarduna burutuko duten DNAREN gune espezifikora bertaratzeko.<sup>8</sup>

Histonen azetilazio patroia ere terapia genikoaren itu da. Izan ere, geneen adierazpenarekin zuzenki erlazionatuta dago. Histonetako lisinen albo kateetako amino taldeak azetilatuta daudenean, histonen karga positiboa murriztu egiten da, eta, ondorioz, DNA eta histonen arteko elkarrekintza erlaxatu egiten da. Alegia, DNAREN konpaktazio maila arindu egiten da, eta horrenbestez, eskualde hori eskuragarri dago transkripzio makinaria bertan sartu, eta geneen transkripzioa gerta dadin. Histonen azetilazio maila baxua den kasuetan, ordea, histonak positiboki kargatuta egoten dira, eta negatiboki kargatutako DNAREkin estuki interakzionatzen dute. Ondorioz, DNAREN kondentsazio maila altua da, eta ez dago eskuragarri DNAREN transkripzioaz arduratzen den makinariarentzat.<sup>41</sup> Hori dela eta, histona deazetilasen inhibitzaileak erabiliz, alelo amatiarreko geneen adierazpena bermatu ahalko litzateke.

#### 4.3.3. SMCHD1en inhibizioa terapia epigenetiko gisa

SMCHD1 geneak kodetzen duen SMCHD1 proteinak (Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain-Containing Protein 1) epigenetikan eragiten du.

MKRN3, MAGEL2 eta NDN geneen adierazpenarekin zuzenki lotuta dago. Gene horien adierazpenaren erregulazioa hein handi batean inpronta guneari dagokion arren, SMCHD1 geneak 3 gene horien metilazio patroia zehazten du.<sup>8</sup>

SMCHD1 genearen ausentziak, DNAREN patroia hipometilatua eragiteaz gain, H3 histonaren 4. en arginina metilatzea eragiten du (H3K4me3). Ondorioz, DNA deskondentsatu egiten da, eta transkripzioaren makinariak bere funtzioa bete dezake.<sup>8</sup>

Beraz, aurrez aipatutako bi arrazoiak direla eta, SMCHD1 genearen ausentzian MKRN3, MAGEL2 eta NDN geneen adierazpena nabarmen handitzen da. Ondorioz, terapia epigenetikoaren iturri izan liteke SMCHD1 genearen isilarazpena.<sup>8</sup>

#### 4.3.4. Adenobirusen bidezko terapia genikoa

Adenobirusak bektore gisa erabiliz PWS tratatzeko saiakerak egin dira MAGEL2 adierazten ez duten saguetan (KO, *knock out*). Sagu horietan garapen neuronalarekin lotutako geneen gutxipen nabaria ikusi zen, horien artean, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) faktorea kodetzen duen genearena eta baita faktore horren hartzailarena ere, TrkB (tropomyosin receptor kinase B). BDNF faktoreak neuronon hazkuntza eta diferentziazioa erregulatzen ditu, besteak beste. Horrez gain, hiperfagiarekin eta obesitatearekin ere erlazionatzen da. Ondorioz, MAGEL2 KO sagu horietan PWSn ohikoak diren ondorengo sintomak ikusi ziren: obesitatea, hiperfagia, sedentarismoa, antsietatea, depresioa, portera arazoak, ehun adipotsuaren handipena, gluzemiaren kontrol galera eta erantzun neuroendokrinoen alterazioak, besteak beste.<sup>42</sup>

Adenobirusak bektore gisa erabiliz BDNF genea transferitu zitzaizen (AAV-BDNF) MAGEL2 knock out saguei hipotalamoan, bertan BDNF genea adieraz zezaten. Horrek pisuaren handipena kontrolatzeaz gain, glukosaren metabolismoa hobetu zuen, intsulinarekiko sentzibilitatea handitu zuen, eta adipozito zirkulatuak maila kontrolatu zuen. Injekziotik 2 astera, saguen pisua nabarmen gutxitu zen, eta 6 astera ehun adipotsuaren gutxipen nabaria behatu zen. Beraz, BDNF bidezko terapiak funtzio metabolikoak hobetzeko gaitasuna daukala frogatu da. Gainera, nabarmentzekoa da tratamenduaren eraginkotasuna eta segurtasuna oso altuak izan zirela egindako lehen saiakera horretan.<sup>42</sup>

Gainera, AAV-BDNF, MAGEL2 KO eta sagu basatien gene adierazpen mailak konparatuz, AAV-BDNF saguetan gainadierazitako eta azpiadierazitako geneak identifikatu zituzten. Adierazpen handipena izan zuten geneen artean, peptido orexigenikoak (NPY eta AgRP) kodetzen dituzten geneak dauzkagu, eta baita peptido horiek hartzailak kodetzen dituzten geneenak ere, Hcr1 hartzailarena adibidez. Adierazpen gutxipena jasan zuten geneen artean, neuroinflamazioa eragiten duten geneak dauzkagu, eta baita BDNF faktorea kodetzen

duen genea ere. Azken hori, BDNF faktorea exogenoki administratzearen ondorioz ematen da.<sup>42</sup>

Beraz, lehen emaitzen arabera, adenobirusen bidezko terapia ere egokia izan daiteke PWSdun pazienteetan hiperfagia eta obesitate arazoak konpontzeko, eta baita neuroinflamazioari aurre egiteko.<sup>42</sup>

## 5. ONDORIOAK

PWS gaixotasun konplexua da, sistema ezberdinen gain eragiten baitu. Gaixotasunaren oinarrian dauden 3 alterazio genetikoek gene ezberdinen gain eragiten dute, eta horrek gaixoen artean sintomatologia oso aldakorra izatea eragiten du. Gainera, gene horien funtzioak ez dira guztiz ezagutzen gaur egun, eta horrek, zaildu egiten du geneen eta sintomatologiaren arteko erlazioa zehaztea. Izan ere, gene bakoitza sintoma ezberdinen eragile izan daiteke, eta kasu batzuetan, teorikoki pentsatzen dena ez da praktikan betetzen, MKRN3 genearen eta pubertaroaren hastapenaren atzerapenarekin gertatzen den moduan. Nire ustez, ezinbestekoa da PWSren oinarri genetikoaren inguruan gehiago ikertzea, gene bakoitzak gaixotasunaren garapenean nola eragiten duen jakin gabe ezinezkoa delako gaitza oinarritik sendatuko duen terapia genikorik aurkitzea.

Terapia genikoei dagokienez, ikerketa lerro ezberdinak martxan dauden arren, eta saiakera ezberdinak egin diren arren, bide luzea geratzen da aurretik. Lanean zehar aipatu bezala, ikerketa talde ezberdinak itu molekular ezberdinak aztertzen ari dira, baina gaixotasunaren oinarria ondo ezagutu ezean, ezinezkoa da bide horretan ere aurrerapen nabarmenik izatea. Gainera, kasu batzutan saiakerak *in vivo* egin diren arren, gehienetan soilik *in vitro* egin dira.

PWS bezalako gaixotasuna arraroek prebalentzia baxua izan arren, gizarte bezala, guztion ardura da horiei aurre egiteko baliabideak eskura izatea. PWSren kasu konkretuan, oinarri genetiko konplexua duen gaitza da, eta soilik ikerketa munduan inbertituz lortuko da gaixotasuna errotik sendatzeko gai izango diren terapia eraginkorren bat merkaturatzea.

Bestalde, ezinbestekoa da osasun zentroetan 2001.urtean zehaztutako diagnostiko klinikorako irizpideen berri izatea, eta horrekin batera, diagnostiko molekularra egiteko jarraitu beharreko urratsak zeintzuk diren ezagutzea. Horrela, edozein susmoren aurrean pazienteak dagokion zerbitzura bideratu ahalko da. Izan ere, aurrez aipatu bezala, diagnostiko goiztiarra oso garrantzitsua da pazienteen bizi maila hobetze aldera. Egun, PWSdun pazienteak nola tratatu azaltzen duten gidak daude, Gurutzetako Ospitaleak 2017. urtean argitaratutakoa, esaterako. Horien berri izatea oinarritzakoa da osasun munduan.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Costa, R. A., Ferreira, I. R., Cintra, H. A., Gomes, L. H. F., Guida, L. d. C. Genotype-Phenotype Relationships and Endocrine Findings in Prader-Willi Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10:864. doi: 10.3389/fendo.2019.00864
2. Ahakoud, M., Daha Belghiti, H., Nedbour, A., Bouramtane, A., Chaouki, S., Bouguenouch, L., Ouldin, K. The Diagnosis and Genetic Mechanisms of Prader-Willi Syndrome: Findings From a Moroccan Population Study. *Cureus*. 2023; 15(4):e37866. doi: 10.7759/cureus.37866
3. Chen, H., Victor, A. K., Klein, J., Tacer, K. F., Tai, D. J. C., de Esch, C., Nuttle, A., Temirov, J., Burnett, L. C., Rosenbaum, M., Zhang, Y., Ding, L., Moresco, J. J., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Tillman, H. S., Leibel, R. L., Talkowski, M. E., Billadeau, D. D., ... Potts, P. R. Loss of MAGEL2 in Prader-Willi syndrome leads to decreased secretory granule and neuropeptide production. *JCI Insight*. 2020; 5(17):e138576. doi: 10.1172/jci.insight.138576
4. Butler, M. G. Prader-Willi Syndrome and Chromosome 15q11.2 BP1-BP2 Region: A Review. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(5):4271. doi: 10.3390/ijms24054271
5. Mendiola, A. J. P., LaSalle, J. M. Epigenetics in Prader-Willi Syndrome. *Front Genet*. 2021; 12:624581. doi: 10.3389/fgene.2021.624581
6. Whittington, J., Holland, A. Next Steps in Prader-Willi Syndrome Research: On the Relationship between Genotype and Phenotype. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(20):12089. doi: 10.3390/ijms232012089
7. Ma, V. K., Mao, R., Toth, J. N., Fulmer, M. L., Egense, A. S., Shankar, S. P. Prader-Willi and Angelman Syndromes: Mechanisms and Management. *Appl Clin Genet*. 2023; 16:41-52. doi: 10.2147/TACG.S372708.
8. Chung, M. S., Langouët, M., Chamberlain, S. J., Carmichael, G. G. Prader-Willi syndrome: reflections on seminal studies and future therapies. *Open Biol*. 2020; 10(9):200195. doi: 10.1098/rsob.200195
9. Basak, S., Basak, A. Proteins and proteases of Prader-Willi syndrome: a comprehensive review and perspectives. *Biosci Rep*. 2022; 42(6):BSR20220610. doi: 10.1042/BSR20220610.
10. Angulo, M. A., Butler, M. G., Cataletto, M. E. Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest*. 2015; 38:1249-1263. doi: 10.1007/s40618-015-0312-9.
11. National Library of Health [Internet]. Rockville Pike, Bethesda. 2022. [konsulta, 2024/04/04]. Prader-Willi Syndrome. Eskuragarri: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/prader-willi-syndrome/#inheritance>

12. Gabau, E., Aguilera, C., Baena, N., Ruiz, A., Guitart, M. Enfermedades por alteración de la impronta genética. Síndrome de Prader Willi y de Angelman. *Pediatría Integral*. 2019. [kotsulta, 2024/04/06]; XXIII (5):249–257. Eskuragarri: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2019-07/enfermedades-por-alteracion-de-la-impronta-genetica-sindrome-de-prader-willi-y-de-angelman/>
13. Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [kotsulta, 2024/04/06]. Epimutación. Eskuragarri: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-genetica/def/epimutacion>
14. Buiting, K., Gross, S., Lich, C., Gillissen-Kaesbach, G., el-Maarri, O., Horsthemke, B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet*. 2003; 72(3): 571-577. doi: 10.1086/367926
15. Shin, Y. An update on the genetic causes of central precocious puberty. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2016; 21(2):66-69. doi: 10.6065/apem.2016.21.2.66.
16. Ehrhart, F., Janssen, K. J. M., Coort, S. L., Evelo, C. T., Curfs, L. M. G. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: Visualisation of the molecular pathways for two chromosomal disorders. *World J Biol Psychiatry*. 2019; 20(9):670-682. doi: 10.1080/15622975.2018.1439594
17. González-Jiménez, E., Schmidt Río-Valle, J. Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético: factores y mecanismos implicados. *Nutr.Hosp*. 2012; 27(6):1850-1859. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6099>
18. Zanella, S., Barthelemy, M., Muscatelli, F., Hilaire, G. Necdin Gene, Respiratory Disturbances and Prader-Willi Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 605:159-64. doi: 10.1007/978-0-387-73693-8\_28.
19. Esparza-Garrido, R. R., Velázquez-Flores, M. Á, Esparza-Garrido, R. R., Velázquez-Flores, M. Á. Los RNAs pequeños nucleolares y su participación en el cáncer. *Gac Mex Oncol*. 2019; 18(2), 102-112. doi: 10.24875/j.gamo.19000109
20. Mourelo Alvarez, E., Ruiz Ortega, M., Sardonis Ruiz, LM., Sainz Lobato, I., San Millán De Clascá, I. Guía de actuación en el Síndrome Prader-Willi. [Internet]. 1. Edizioa. Eusko Jaurlaritzako Argitalpen Zerbitzu Nagusia; 2017 [kotsulta, 2024/04/06]. Eskuragarri:[https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/guias\\_practica\\_clinica/eu\\_def/adjuntos/SPW\\_guia\\_07.pdf](https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/guias_practica_clinica/eu_def/adjuntos/SPW_guia_07.pdf)
21. Prapasrat, C., Onsod, P., Korkiatsakul, V., Rerkamnuaychoke, B., Wattanasirichaigoon, D., Chareonsirisuthigul, T. The Utilization of MS-MLPA as the First-Line Test for the Diagnosis of Prader-Willi Syndrome in Thai Patients. *J Pediatr Genet*. 2022; 12(4):273-279. doi: 10.1055/s-0041-1741008.
22. Huang, Z., Bassil, C. F., Murphy, S. K. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol*. 2013; 1049:75-82. doi: 10.1007/978-1-62703-547-7\_7

23. Creative Biomart [Internet]. New York, USA. [konsulta, 2024/04/12]. Methylation-Specific PCR Service. Eskuragarri: <https://www.creativebiomart.net/epigenetics/services/dna-methylation-analysis-service/methylation-specific-pcr-service/>
24. MRC Holland [Internet]. Amsterdam. [konsulta, 2024/04/12]. Methylation-Specific MLPA. Eskuragarri: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/ms-mlpa-technique>.
25. Suzuki, Y., Sasagawa, I., Yazawa, H., Tateno, T., Nakada, T. Detection of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome using fluorescence in situ hybridization. *Arch Androl.* 2000; 45(1):13-17. doi: 10.1080/014850100409963
26. National Human Genome Research Institute [Internet]. 2024 [konsulta, 2024/04/15]. Hibridación fluorescente in situ (FISH). Eskuragarri: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>
27. Smith, A., Hung, D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome, *Transl Pediatr.* 2017; 6(1):46-56. doi: 10.21037/tp.2016.07.04.
28. Castells-Sarret, N., Cueto-González, A. M., Borregan, M., López-Grondona, F., Miró, R., Tizzano, E., Plaja, A. Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio. *An Pediatr.* 2018; 89(1):3-11. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2017.07.011>
29. National Health Service England [Internet]. 2022 [konsulta, 2024/04/20]. Microarray (array CGH). Eskuragarri: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/microarray-array-cgh/>
30. Szuhai K, Vermeer M. Microarray Techniques to Analyze Copy-Number Alterations in Genomic DNA: Array Comparative Genomic Hybridization and Single-Nucleotide Polymorphism Array. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(10):e37. doi: 10.1038/jid.2015.308.
31. National Human Genome Research Institute [Internet]. 2024 [konsulta, 2024/04/20]. Microsatélite. Erabilgarri: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Microsatelite>
32. Picó Sirvent, MB., Esteras Gómez, C. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats). Microsatélites. 2012. [konsulta, 2024/04/10]. Eskuragarri: <http://hdl.handle.net/10251/16743>
33. Clara Gómez González, Carmen Prior de Castro. MICROSATÉLITES Y TP-PCR EN ENFERMEDADES POR EXPANSIÓN DE REPETICIONES DE ADN. Ed. Cont. Lab Clin. 2017. [konsulta, 2024/04/22]; 37:1-8. Eskuragarri: <https://www.seqc.es/download/tema/25/5619/3626021/1092831/cms/tema-1-microsatelites-y-tp-pcr-en-enfermedades-por-expansion-de-repeticiones-de-adn.pdf/>
34. Kim, Y., Wang, S. E., Jiang, Y. Epigenetic therapy of Prader-Willi syndrome. *Transl Res.* 2019; 208:105-118. doi: 10.1016/j.trsl.2019.02.012.



35. Syding, L. A., Nickl, P., Kasperek, P., Sedlacek, R. CRISPR/Cas9 Epigenome Editing Potential for Rare Imprinting Diseases: A Review. *Cells*. 2020; 9(4):993. doi: 10.3390/cells9040993
36. Alegre, I., Mazzuocolo, L., Rinflerch, A. CRISPR-Cas, el editor de genes. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires*. 2021. [kotsulta, 2024/04/22]; 41(1): 37-42. Eskuragarri: <https://www.researchgate.net/publication/351748554>
37. Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., Ruan, K., Wang, F., Xu, G., Hu, R. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov*. 2016; 2:16009. doi: 10.1038/celldisc.2016.9
38. Xu, X., Tan, X., Tampe, B., Wilhelmi, T., Hulshoff, M.S., Saito, S., Moser, T., Kalluri, R., Hasenfuss, G., Zeisberg, E.M. High-fidelity CRISPR/Cas9- based gene-specific hydroxymethylation rescues gene expression and attenuates renal fibrosis. *Nat Commun*. 2018; 9(1):3509. doi: 10.1038/s41467-018-05766-5.
39. Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R. G., Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*. 2003; 12(2):475-87. doi: 10.1016/j.molcel.2003.08.007.
40. Langouët, M., Gorka, D., Orniacki, C., Dupont-Thibert, C. M., Chung, M. S., Glatt-Deeley, H. R., Germain, N., Crandall, L. J., Cotney, J. L., Stoddard, C. E., Lalande, M., Chamberlain, S. J. (2020). Specific ZNF274 binding interference at SNORD116 activates the maternal transcripts in Prader-Willi syndrome neurons. *Hum Mol Genet*. 2020; 29(19):3285-3295. doi: 10.1093/hmg/ddaa210.
41. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. [Internet]. Clínica Universidad de Navarra, Pamplona. [kotsulta, 2024/04/26]. Tema 3: Epigenética, cáncer y farmacogenética. Eskuragarri:<https://gruposdetrabajo.sefh.es/pkgen/es/actividad-docente/curso-farmacogenetica-online>
42. Queen N. J., Huang W., Zou X., Mo X., Cao L. AAV-BDNF gene therapy ameliorates a hypothalamic neuroinflammatory signature in the *Mage12*-null model of Prader-Willi syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023; 13:31:101108. doi: 10.1016/j.omtm.2023.09.004.