

Impressão Genómica na Síndrome Metabólica de Prader-Willi

MC Rosamond Pinto^{1,2}, R Magalhães-Faria³, DM Pinto⁴, IP Maia⁵, R Moya⁶

¹Genética Humana. Professora Universitária. Faculdade de Medicina de Lisboa.

²Departamento de Endocrinologia e Metabolismo. Divisão de Biologia Molecular. Research Professor. Universidade de Miami (USA).

³Serviço de Endocrinologia. Hospital Curry Cabral. Chefe de Serviço; Lisboa.

⁴Investigador. Centro de Genética Humana; Lisboa

⁵Faculdade de Farmácia. Discente Estagiária. Universidade Lusófona de Ciências e Tecnologia; Lisboa.

⁶Departamento de Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Investigador Doutorando. Universidade de Coimbra.

Correspondência:

Professora Doutora Maria Cristina Rosamond Pinto > Genética Humana > Rua Amílcar Cabral, 21 – R/C H – 1750-018 – Lisboa
Telefone: 217 581 029. E-mail: genetica_medica@hotmail.com

RESUMO

As síndromes de Prader-Willi e Angelman (AS) são caracterizadas por alterações do desenvolvimento neuro-metabólico causadas pela perda da função e expressão de genes impressos ao nível paterno (PWS) ou materno (AS) do cromossoma 15q11-13. A deleção paterna 15q11-q13 é encontrada em aproximadamente 70% dos doentes com PWS, enquanto que 25% apresentam disomia uniparental materna (UPDm) no cromossoma 15, e, 2 a 5% defeitos relacionados com impressões genómicas aberrantes. Recorrendo a métodos de citogenética clássica e molecular, assim como a estudos de metilação do ADN, os autores tiveram como objectivo correlacionar os conhecimentos clínicos e moleculares nesta síndrome específica. Constatou-se pela análise de fluorescência por hibridização *in situ* (FISH), que todos os doentes estudados possuíam deleção 15q, encontrando-se igualmente alterado o padrão de metilação do ADN, confirmando-se, desta forma, a existência de isodisomia parental. Em conclusão, as alterações estruturais do cromossoma 15 podem modificar a metilação do ADN, com uma tradução significativa do processo da impressão genómica PWS e consequente influência nas manifestações clínicas desta síndrome.

PALAVRAS-CHAVE

Síndrome de Prader-Willi (PWS); Síndrome de Angelman (AS); Isodisomia Uniparental (UPD); Impressão Genómica; Cromossoma 15q11-q13; Metilação.

SUMMARY

The Prader-Willi (PWS) and Angelman (AS) syndromes are characterized by neurometabolic development disturbances inherited by the lost of the function and expression of imprinted genes at the paternal (PWS) or maternal (AS) level of the 15q11-13 chromosome. A paternal 15q11-q13 deletion is found in approximately 70% of patients with Prader-Willi syndrome, while 25% have uniparental maternal disomy (mUPD) 15, and the remaining 2% to 5% have defects related to the aberrant genomic imprinting. Accessing the methodology of the cytogenetic and molecular techniques, as well as DNA methylation analysis, the authors aimed to correlate the clinical and scientific knowledge of the PWS entity. The results of the fluorescent in situ hybridization (FISH) and DNA methylation tests showed that all the studied patients had a 15q deletion and the abnormal methylation pattern, confirming the parental isodisomy existence. In summary, a 15 chromosome structure disturbance can modify the DNA methylation pattern with an important PWS genomic imprinting translation and a subsequent influence on the clinical manifestation of this syndrome.

KEY-WORDS

Prader-Willi Syndrome (PWS); Angelman Syndrome (AS); Uniparental Isodisomy (UPD); Genomic Imprinting; Chromosome 15q11-q13; Methylation.

INTRODUÇÃO

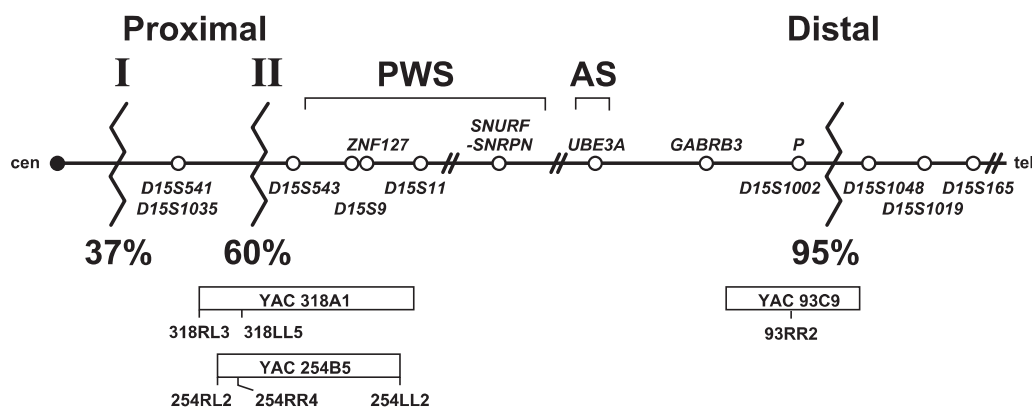
A impressão genómica refere-se à modificação epigenética do ADN nuclear que conduz à expressão diferencial dos alelos maternos e paternos durante o desenvolvimento embrionário^{1,2}. As síndromes de Angelman (AS) e Prader-Willi (PWS) constituem um modelo único para o estudo da impressão genómica^{3,4,5}. As características fenotípicas da PWS incluem hipotonia infantil ligeira, atraso mental, hiperfagia com subsequente obesidade, hipogonadismo, estatura baixa, algum dismorfismo facial e por vezes, alteração do comportamento⁶. Estas entidades (AS e PWS) clinicamente distintas sob ponto de vista neurocomportamental e de desenvolvimento podem ser diferenciadas pela origem parental da subtração ou deleção genética do cromossoma 15 na região do seu braço longo (15q11-q13)⁷. A deleção materna 15q11-q13 conduz à AS, ainda que raras vezes possa existir uma disomia uniparental paterna. A PWS resulta da perda da contribuição parental desta mesma região, quer por deleção paterna ou isodisomia parental materna⁸. A extensão da região subtraída é homogénea em cerca de 70 a 80% dos casos de AS e PWS que demonstram a deleção 15q11-q13. Na AS, cerca de 20-25% dos doentes tem uma hereditariedade biparental da subtração 15q11-q13 e não é possível distinguir estes doentes dos que tem uma isodisomia uniparental (UPD)⁹. Este facto deve-se à presença de mutações na região génica 15q11-q13. Há doentes com uma PWS atípica aparentando algumas ou todas as características fenotípicas da PWS, mas não de uma forma moderada, na medida em que tem uma hereditariedade biparental da região cromossómica 15q11-q13^{10,11,12}. Os doentes com PWS atípica podem ser o resultado de mutações conduzindo à expressão aberrante de um ou mais genes responsáveis por PWS, ou, alternativamente, de mutações não geneticamente ligadas^{13,14}. Sabe-se que a metilação do ADN é característica de uma impressão génica funcional^{15,16}. A microdissecção de clones mapeados a 15q11-q13 tem permitido a detecção de metilações do ADN impresso, específico a um determinado progenitor. A região cromossómica 15q11-q13 é meioticamente instável, com uma grande variedade de rearranjos citogenéticos, incluindo deleções PWS, duplicações invertidas

do cromossoma 15, duplicações raras e até triplicações da região 15q11-q13¹⁷; têm sido ainda descritas inversões e translocações equilibradas ou não equilibradas^{18,19,20,21}. Várias regiões 15q foram implicadas como predisponentes a estes rearranjos cromossómicos, incluindo pontos de clivagem proximais e distais a PWS^{22,23,24}. Está comprovada a existência de cópias de ADN repetitivos na região 15q11-q13. As deleções cromossómicas “de novo” 15q11-q13 implicam recombinações génicas nas unidades repetitivas END (duplicações) homólogas, postulando-se que a transição activa nas células germinais facilita essas mesmas recombinações²⁵. Neste trabalho, os autores descrevem a aplicação da citogenética clássica, molecular e da tecnologia do ADN recombinante, bem como de estudos de metilação para uma melhor definição das correlações clínicas/moleculares neste síndrome de genes contíguos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os doentes estudados, durante um período de quatro anos, pertencentes a três agregados familiares distintos, tinham o fenótipo clínico de PWS, com idades compreendidas entre os sete e os quinze anos, sendo do sexo masculino. Exibiam algumas características dismórficas, tendo sido referenciados ao Centro de Genética, quer por hipogonadismo, quer por excesso ponderal BMI (*Body Mass Index*) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, com ingestão alimentar compulsiva. A citogenética clássica com recurso ao elevado poder de resolução, revelou em cerca de 50% dos 10 casos estudados, alterações estruturais 15q11-q13 (resultados não apresentados); Para a Fluorescência por Hibridização *in Situ* (FISH), recorreu-se a sondas YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), segundo protocolos estabelecidos no Laboratório. Analisaram-se pelo menos 10 metafases para detectar a sonda, tanto no cromossoma normal como nos cromossomas apresentando deleção ou duplicação. As imagens foram obtidas a partir de um microscópio de epi-fluorescência *Olympus* com equipamento *Photometric CH250* acoplado a um computador *Apple Macintosh*. As imagens foram captadas em separado com filtro DAPI, fluorescina e rodamina. Procedeu-se à detecção das sondas marcadas com biotina bem como com avidina marcada com fluorescina. A detecção das sondas marcadas com digoxigenina

FIGURA 1 – Deleções mais prevalentes no cromossoma 15q11-q13 em doentes com PWS ou AS, evidenciando-se os microclones na proximidade dos pontos de clivagem (linhas em zig-zag). Os círculos referem-se aos genes e marcadores relevantes. A parte subjacente do diagrama mostra a localização dos YACS (Adaptado com autorização de Gottlieb, W – Universidade da Florida, Gainesville).



foi efectuada com anti-digoxigenina marcada com fluorescina ou anti-digoxigenina marcada com rodamina. Os estudos de metilação fizeram-se a partir de ADN isolado dos leucócitos do sangue periférico dos doentes, progenitores e controlos normais, segundo métodos padronizados, aplicados igualmente à hidrólise do ADN, transferência Southern e hibridização das sondas. A presença ou ausência de deleção 15q11-q13 foi determinada pela combinação de estudos de fragmentos de restrição polimórfica e estimativas quantitativas do ADN doseado a partir da densitometria laser. Para a análise da disomiase uniparental, recorreu-se a sondas repetitivas mapeadas à região telomérica 15q. A detecção de polimorfismos foi feita com as seguintes endonucleases de restrição: D15S18/BgIII, D15S9/ScaI, D15S11/RsaI, D15S13/TaqI, MspI; D15S12/ScaI, D15S86/AluI. O doseamento dos loci 15q11-q13 fez-se por densitometria laser. As sondas PW (D15S9 e outras) obtiveram-se a partir da microdissecção leucocitária de clones mapeados a 15q11-q13. A metilação do ADN foi analisada por hidrólise de 10 µg de ADN leucocitário com EcoRI ou Hind III, e posteriormente com a endonuclease de restrição HpaII que reconhece as sequências 5'-CCGG-3' não se observando hidrólise nas citosinas metiladas.

RESULTADOS

A análise FISH com o clone YAC (YAC 264 A1) revelou deleção 15q nos doentes estudados (figs. 2 e 3). O sinal de hibridização nas preparações FISH mostrou-se diminuído de uma forma consistente em um dos cromossomas homólogos estudados. Sendo os YAC's relativamente extensos (cerca de 125 kb), os sinais de hibridização nos núcleos em interfase têm propensão a serem difusos, observando-se sinais relativamente discretos (conquanto ofereçam uma triagem mais rápida e possibilitem uma sequência ordenada por FISH multicolor a partir da região centromérica com mapeamento entre duas sondas flanqueadas), daí a razão de se apresentar a FISH aplicada aos cromossomas em metáfase. Os proposita com características fenotípicas PWS resultantes de uma pequena subtração 15q11-q13 definiram deleções para as sondas D15S9 e D15S11 (figs. 2 e 3). Os progenitores maternos evidenciavam também a mesma deleção. A transmissão materna desta deleção para os descendentes estaria na base do quadro clínico PWS. O locus D15S9 que codifica o gene da protease zinco ZNF127 tem o seu padrão de metilação alterado nos doentes PWS. A fig. 4 demonstra o progenitor paterno (lóculo 1) de um dos agregados familiares, com um padrão de metilação normal; o lóculo 2, apresentando igualmente um padrão de

FIGURA 2 – Fluorescência por Hibridização *in situ* (FISH) aplicada a placa metafásica de um dos doentes – A seta a cheio evidencia o cromossoma com deleção 15q11-q13.

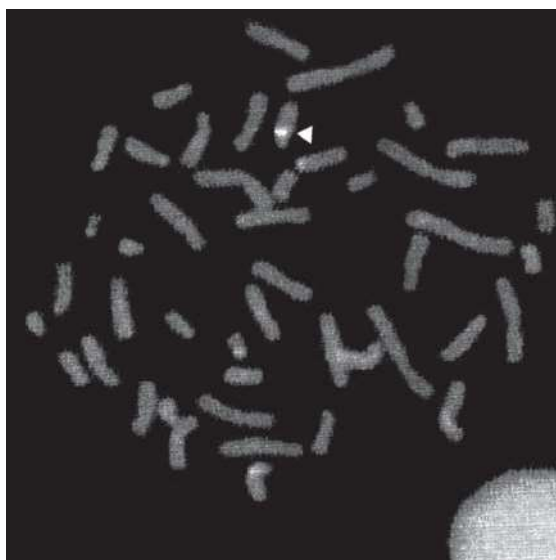


FIGURA 3 – Fluorescência por Hibridização *in situ* (FISH) – Cromossomas PWS em metáfase. A seta não preenchida indica a deleção 15q11-q13; a seta a cheio demonstra a presença do cromossoma 15 normal

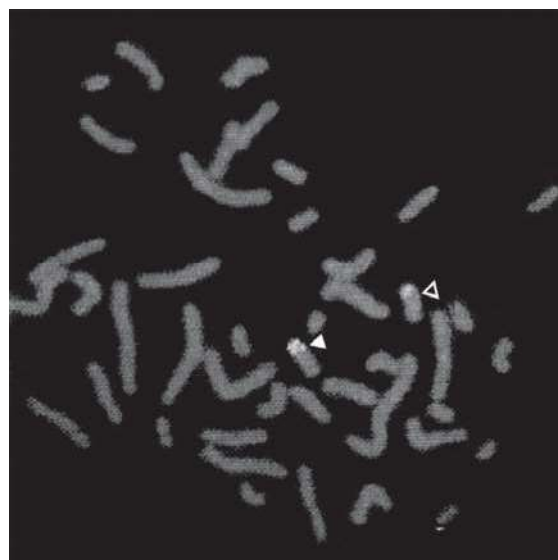
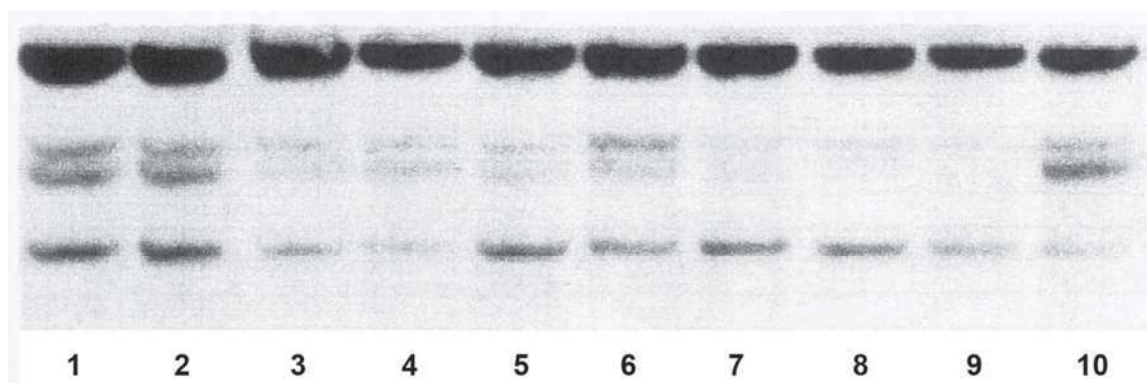


FIGURA 4 – Estado de metilação no *locus* D15S9 (Gene ZNF127) dos doentes com PWS. Lóculo 1 e 2 padrão de metilação normal de um progenitor paterno e materno, respectivamente; nos lóculos 3 a 5 dos seus descendentes, observa-se um padrão de metilação anormal; lóculos 6, 7 e 8, evidenciam metilação anormal tanto no progenitor materno (6), como nos seus filhos (7 e 8); no lóculo 9 (doente PWS) a redução da banda 3,5 kb é compatível com o padrão do progenitor materno (10), traduzindo também uma isodisomia parental. À esquerda encontram-se referenciados os pesos moleculares dos fragmentos de ADN em kilobases.



metilação normal, corresponde ao progenitor materno do mesmo agregado, demonstrando esse mesmo progenitor um fenótipo PWS. No entanto, o ADN do *locus* ZNF127 encontra-se alterado nos seus descendentes afectados (lóculos 3 a 5). No lóculo 6 (progenitor materno de outro agregado), observa-se uma redução da banda 4,3 kb. O fenómeno de impressão génica materna é bem visível nos lóculos 7 e 8, correspondentes aos respectivos descendentes. No lóculo 9, referente a outro doente PWS

é igualmente visível a redução da banda 3,5 kb com um padrão sobreponível ao seu progenitor materno (lóculo 10). Os lóculos 7, 8 e 9 correspondentes a um doente clássico e dois PWS clinicamente atípicos, demonstram uma hereditariedade uniparental ZNF127, traduzindo metilação no respectivo locus. Em resumo, o *locus* D15S9 (gene ZNF127) revelou o padrão de metilação dos doentes estudados, detectando igualmente a impressão da metilação específica do progenitor materno.

DISCUSSÃO

É sabido que as sequências repetitivas homólogas nas regiões proximais e distais, nas quais os doentes PWS demonstram agregados de clivagens, são responsáveis pela subtração ou deleção cromossomática. Está comprovada a existência de cópias de ADN repetitivo na região 15q11-q13. Estes segmentos duplicados do genoma têm sido designados de “duplicções” (END), distinguindo-se dos segmentos repetitivos ao longo do genoma humano. As deleções cromossomáticas 15q11-q13 “de novo” duplicam recombinações génicas nas unidades repetitivas END homólogas, postulando-se que a transcrição activa nas células germinais facilita essas mesmas recombinações. Efectivamente, as sequências repetitivas END derivam numa perspectiva evolutiva a partir da duplicação genómica de genes ancestrais únicos localizados distalmente ao ponto de clivagem PWS/AS^{25,26}. As sequências repetitivas END são activas sob o ponto de vista da transcrição, e, desta forma, directamente implicadas no não alinhamento das cromátides do cromossoma 15 durante a meiose. Tal facto permite uma recombinação homóloga entre as unidades repetitivas END proximais e distais que geram as deleções mais frequentes na PWS. Da mesma forma, idêntica situação está associada a algumas duplicações. Finalmente, tendo sido observadas deleções 15q11-q13 tanto intra como inter-cromossomáticas, uma extensa ansa cromatínica de cerca de 4 mb (megabases) seria, desta forma, responsável pela inserção das sequências repetitivas END nos fenómenos intra-cromossómicos (intra-meióticos)²⁷. Os genes responsáveis pelos fenótipos AS e PWS estão mapeados a *loci* distintos. Os estudos efectuados confirmam que as alterações estruturais do cromossoma 15 podem afectar a metilação do ADN ao longo de *loci* numa extensão de várias megabases. A modificação na impressão da metilação do ADN em *loci* distantes dos rearranjos cromossómicos dos doentes PWS investigados sugere mecanismos semelhantes aos efeitos posicionais da *drosophila*, regulação génica defeituosa nas translocações em vários cancros humanos, alastramento da inactivação génica em translocações autossómicas e translocações sexuais²⁸. As alterações características do cromossoma 15 nos doentes PWS podem levar a uma rotura

do local de conformação cromatínica que pelo seu lado, poderá alterar “de novo” ou manter a metilação do ADN em *loci* distantes da alteração cromossomática em causa. As modificações na metilação parecem ocorrer em *loci* com um padrão parental específico. É curioso notar que nos casos apresentados, o fenómeno de impressão génica é atribuível ao progenitor materno ao contrário da disomia uniparental paterna, descrita mais frequentemente no PWS. Geneticamente, a alteração do padrão da metilação normal dos proposita é significativo e reprodutível, embora no primeiro agregado familiar estudado, o progenitor materno tenha um padrão de metilação normal, sugerindo a existência de outros genes próximos da região delecionada, que, não se encontrando impressos, necessitem de uma expressão bialélica²⁹. O processo de impressão génica poderá ser melhor clarificado a partir de outros doentes com fenótipos ou manifestações clínicas distintas das descritas neste estudo. A impressão do ADN metilado parental encontra-se também alterado noutros *loci* que não os estudados e em descendências com deleções não detectáveis ou não evidenciando disomia uniparental¹⁵. Em conclusão o resultado da deleção materna 15q11-q13 nestes doentes difere da PWS típica com deleção cromossómica paterna, implicando uma inactivação parcial estocástica de genes importantes para esta síndrome¹².

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nicholls RD, Rinchik EM and Driscoll DJ. Genomic imprinting in mouse and man. In Seminars Developmental Biology, MA. Surani and W Reik, Ends 1992; 3: 139-152.
2. Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaich BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. Nature Genet 1996; 17: 75-78.
3. Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. Nature Genet 1995; 9: 345-400.
4. 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): 571-7. Epub 2003 Jan 23.
5. Rapkins RW, Hore T, Smithwick M, Ager E, Pask AJ, Renfree MB, Kohn M, Hameister H, Nicholls RD, Deakin JE, Graves JA. Recent assembly of an imprinted domain from non-imprinted components. *PLoS Genet* 2006; 2(10): e182.
 6. Bittel DC, Kibiryeveva N, Butler MG. Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral outcomes in Prader-Willi syndrome. *Pediatrics* 2006; 118(4): e1276-83. Epub Sep 18.
 7. Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113(1-4): 292-9. Review.
 8. Wang YM, Chuang L, Wang BT, Kuo PL. Maternal uniparental disomy in a patient with Prader-Willi syndrome with an additional small inv dup (15) chromosome. *J Formos Med Assoc* 2004; 103(12): 943-7.
 9. Whittington JE, Butler JV, Holland AJ. Changing rates of genetic subtypes of Prader-Willi syndrome in the UK. *Eur J Hum Genet* 2007; 15(1): 127-30. Epub 2006 Sep 6.
 10. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 2006; 52(7): 1276-83. Epub 2006 May.
 11. Bärbel Dittrich, Karin Buiting, Bernd Korn, Sarah Rickard, Jessica Buxton, Shinji Saitoh, Robert D. Nicholls, Annemarie Poustka, Andreas Winterpacht, Bernhard Zabel, Bernhard Horsthemke. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nature Genetics* 1996; 14: 163-170.
 12. Maina EN, Webb T, Soni S, Whittington J, Boer H, Clarke D, Holland A. Analysis of candidate imprinted genes in PWS subjects with atypical genetics: a possible inactivating mutation in the SNURF/SNRPN minimal promoter. *J Hum Genet* 2007; 30.
 13. Kantor B, Shemer R, Razin A. The Prader-Willi/Angelman imprinted domain and its control center. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113(1-4): 300-5.
 14. Buiting K, Gross S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, el-Maari 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): 571-7. Epub 2003 Jan 23.
 15. Camprubi C, Coll MD, Villatoro S, Gabau E, Kamli A, Martinez MJ, Poyatos D, Guitart M. Imprinting center analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients with typical and atypical phenotypes. *Eur J Med Genet* 2007; 50(1): 11-20. Epub 2006 Oct 10.
 16. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends in Genetics* 1997; 13(8): 323-329.
 17. Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Penaherrera M, Michaelis RC, Abeliovich D, Schinzel AA. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet* 1998; 35(2): 130-6.
 18. Calounova G, Novotna D, Simandlova M, Havlovicova M, Zumrova A, Kocarek E, Sedlacek Z. Prader-Willi syndrome due to uniparental disomy in a patient with a balanced chromosomal translocation. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(5): 579-85.
 19. Mignon-Ravix C, Depetris D, Luciani JJ, Cuoco C, Krajewska-Walasek M, Missirian C, Collignon P, Delobel B, Croquette MF, Moncla A, Kroisel PM, Mattei MG. Recurrent rearrangements in the proximal 15q11-q14 region: a new breakpoint cluster specific to unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet* 2007; 31.
 20. Varela MC, Lopes GM, Koiffmann CP. Prader-Willi syndrome with an unusually large 15q deletion due to an unbalanced translocation t(4;15). *Ann Genet* 2004; 47(3): 267-73. Review.
 21. Schule B, Albalwi M, Northrop E, Francis DI, Rowell M, Slater HR, Gardner RJ, Francke U. Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC Med Genet* 2005; 6(6): 18.
 22. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S and Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 1999; 65(2): 370-386.
 23. Bittel DC, Kibiryeveva N, Sell SM, Strong TV, Butler MG. Whole genome microarray analysis of gene expression in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2007; 18.
 24. Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet* 2004; 75(2): 267-81. Epub 2004 Jun 11.

25. Klein OD, Cotter PD, Albertson DG, Pinkel D, Tidymann WE, Moore MW, Rauen KA. Prader-Willi syndrome resulting from an unbalanced translocation: characterization by array comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 2004; 65(6): 477-82.
26. Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD. The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* 1999; 8(3): 533-42.
27. Huang B, Crolla JA, Christian SL, Wolf-Ledbetter ME, Macha ME, Papenhausen PN, Ledbetter DH. Refined molecular characterization of the breakpoints in small inv dup(15) chromosomes. *Hum Genet* 1997; 99(1): 11-7.
28. Tartof RD and Bremer M. In Monk and Surami, A (eds) *Development. The company of Biologists* Itda, Cambridge 1990; pp 35-45.
29. Ninomiya S, Yokoyama Y, Kawakami M, Une T, Maruyama H, Morishima T. Unique maternal deletion of 15q in a patient with some symptoms of Prader-Willi syndrome. *Pediatr Int* 2005; 47(5): 541-5.