

ESTUDI GENÈTIC DE LA SÍNDROME DE WILLIAMS-
BEUREN I DE LES PATOLOGIES ASSOCIADES AL
GEN DE L'ELASTINA

Tesi presentada per
Laia Rodríguez-Revenga Bodi

Per optar al grau de
Doctor en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Ana Carrió Ybáñez al Servei
de Genètica de l'Hospital Clínic de Barcelona

Tesi adscrita al Departament de Ciències Fisiològiques I, Facultat de
Medicina, Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorat: Genètica (Bienni 1999-2001)

Tutor: Prof. Dr. Ferran Climent Romero

Dra. Ana Carrió Prof. Dr. Ferran Climent Laia R-Revenga Bodi

Als meus pares

Aquesta tesi no hauria estat possible sense l'aportació de molta gent i per això considero necessari donar el meu agraïment a tots aquells que d'alguna manera hi han contribuït.

En primer lloc vull agrair el finançament de la Fundació Marató de TV3 i l'aportació de tota aquella gent anònima que hi va contribuir. Sense ells, el treball realitzat no hauria estat possible.

Gràcies als pacients i a les seves famílies que han col·laborat en aquest estudi.

A la meva directora de tesi, la Dra. Ana Carrió, per haver-me donat l'oportunitat de participar en aquest projecte i a les Dres. Montserrat Milà i Cèlia Badenas que m'han ajudat en tot moment.

A tota aquella gent del Servei de Genètica de l'Hospital Clínic de Barcelona que m'han ensenyat com treballar en un laboratori o que m'han ajudat quan els he necessitat. Especialment vull donar les gràcies a les que són o han estat companyes meves.

Finalment agraeixo el suport rebut en tot moment per part de la meva família i amics.

ÍNDEX

PRESENTACIÓ	1
ABREVIATURES	3
INTRODUCCIÓ	5
1. La síndrome de Williams-Beuren	7
1.1. Història de la síndrome de Williams-Beuren	7
1.2. Característiques clíniques	9
1.2.1. Manifestacions neurològiques i de comportament	9
1.2.2. Trets dismòrfics	11
1.2.3. Manifestacions cardiovasculars	13
1.2.4. Manifestacions endocrinometabòliques	13
1.2.5. Manifestacions musculoesquelètiques	14
1.2.6. Manifestacions gastrointestinals	14
1.2.7. Manifestacions genitourinàries	14
1.2.8. Manifestacions oftàlmiques	15
1.2.9. Altres manifestacions	15
1.3. Tractament i seguiment dels pacients	17
1.4. Aspectes moleculars	17
1.5. Diagnòstic i consell genètic	21
1.6. Mecanisme mutacional	23
1.7. Gens de còpia única descrits en la regió SWB	28
1.8. Correlació genotip-fenotip	35
2. Elastina	38
2.1. El gen de l'elastina	39
2.2. La proteïna elastina	41
2.3. Estenosi supralvular aòrtica	44
2.4. Cutis laxa	47
OBJECTIUS	49
MATERIAL I MÈTODES	53
1. Obtenció de mostres	55
2. Extracció d'àcids nucleics	56
2.1. Extracció de DNA genòmic a partir de sang perifèrica	56

2.2. Extracció de DNA genòmic a partir de biòpsia de corion i líquid amniòtic	57
2.3. Extracció d'RNA total	59
3. Lectura de la concentració d'àcids nucleics	59
3.1. Lectura de la concentració del DNA	59
3.2. Lectura de la concentració de l'RNA	60
3.3. Càlcul de la concentració dels oligonucleòtids	60
4. Amplificació de fragments mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa	60
4.1. Disseny dels oligonucleòtids	61
4.2. Amplificació a partir de DNA genòmic	62
4.3. Amplificació a partir d'RNA total. Transcripció reversa	63
5. Electroforesi de DNA	64
5.1 Electroforesi en gels d'agarosa/TBE/Bromur d'etidi	64
5.2. Electroforesi en gels d'acrilamida	65
6. Manipulació enzimàtica del DNA	67
7. Anàlisi mutacional del gen elastina (<i>ELN</i>)	68
7.1. Condicions de PCR dels 34 exons del gen <i>ELN</i>	68
7.2. <i>Single Strand Conformation polymorphism analysis</i> (SSCP)	68
7.2.1. Gels per SSCPs 20x20 cm	69
7.2.2. Gels per SSCPs comercials (Amersham-Pharmacia)	72
8. Seqüenciació automàtica de productes de PCR	73
9. Anàlisi mitjançant marcadors microsatèl·lits	74
9.1. Anàlisi mitjançant microsatèl·lits no marcats fluorescentment	75
9.2 Anàlisi mitjançant microsatèl·lits fluorescents	76
10. Establiment de cultius cel·lulars	79
10.1. Cultiu de limfòcits	79
10.2. Cultiu de fibroblasts	79
11. Hibridació <i>in situ</i> Fluorescent (FISH)	80
11.1 Preparació del substrat d'hibridació	81
11.2 Hibridació, detecció i observació al microscopi d'epifluorescència	82
RESULTATS	85
Capítol 1 Caracterització dels pacients amb sospita clínica de síndrome de Williams	87
1.1. Confirmació diagnòstica	89

1.2. Casuística i classificació dels pacients	90
1.3. Caracterització de les delecions	93
1.3.1. Ampliació de l'estudi de pèrdua d'heterozigositat	97
1.3.2. Caracterització de la delecio de mida superior a les comunament descrites	98
1.4. Origen parental de les delecions	100
1.5. Avaluació de les dades clíniques	101
Capítol 2. Estudi del gen elastina	105
2.1. Estudi dels pacients amb estenosi supravalvular aòrtica o altres cardiopaties	107
2.1.1. Casuística i caracterització dels pacients	107
2.1.2. Estudi mutacional del gen <i>ELN</i>	109
2.2. Cutis laxa	115
2.2.1. <i>A novel elastin gene mutation results in an autosomal dominant form of cutis laxa</i>	116
DISCUSSIÓ	129
1. La síndrome de Williams-Beuren	131
1.1. Caracterització dels pacients	131
1.2. Origen parental de les delecions	132
1.3. Avaluació de les dades clíniques	133
1.4. Correlació genotip-fenotip i caracterització de casos amb delecions atípiques	134
2. Estudi mutacional del gen elastina en la patologia de l'SVAS i la cutis laxa	136
2.1. Caracterització molecular dels pacients amb SVAS o altres cardiopaties	137
2.2. Mutacions <i>missense</i> descrites en pacients amb SVAS	138
2.3. Cutis laxa	141
2.4. SVAS <i>versus</i> cutis laxa	144
CONCLUSIONS	147
BIBLIOGRAFIA	151
ANNEX	167

El treball que aquí es presenta es va iniciar el mes de març de l'any 1999 com a iniciativa del Servei de Genètica de l'Hospital Clínic de Barcelona i gràcies al finançament de la Fundació Marató TV3, amb la finalitat d'aprofundir en l'estudi de les bases moleculars de la síndrome de Williams-Beuren i arribar a una millor comprensió de la malaltia. De la mateixa manera, s'ha volgut estudiar la implicació del gen de l'elastina en dues patologies en les que també s'ha vist hi està associat: l'estenosi i supravalvular aòrtica i la cutis laxa.

Aquest treball s'ha estructurat en *Introducció*, on es defineix la síndrome de Williams-Beuren, el gen de l'elastina i les seves implicacions en l'estenosi supravalvular aòrtica i la cutis laxa, *Material i Mètodes*, en el que es descriuen les tècniques i els reactius emprats per a la realització d'aquest treball, així com els pacients que han estat objecte d'estudi. En l'apartat de *Resultats* es recullen els objectius assolits amb l'estudi de la síndrome de Williams-Beuren, així com els obtinguts amb l'anàlisi del gen elastina en la patologia de l'estenosi supravalvular aòrtica i la publicació derivada de l'estudi de la cutis laxa, per últim, en la *Discussió* es realitza una valoració global del treball dut a terme i de les implicacions que pot tenir en el futur dels pacients amb la síndrome de Williams-Beuren i en les seves famílies.

ABREVIATURES:

A	adenina
ADNA o DNA	àcid desoxinucleic
APS	persulfat amònic
ARN o RNA	àcid desoxiribonucleic
ATP	adenosina trifosfat
bp	parells de bases
C	citosina
cDNA	DNA còpia
cM	centiMorgan
dATP	desoxiadenina trifosfat
dCTP	desoxicitosina trifosfat
dGTP	desoxiguanina trifosfat
DEL	deleció
DMSO	dimetilsufòxid
dNTPs	desoxinucleòtids trifosfat
D.O.	densitat òptica
dTTP	desoxitimidina trifosfat
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ELN	elastina
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
g, mg, µg, ng	gram, miligram, microgram, nanogram
G	guanina
HBP	herència biparental
IQ	coeficient intel·lectual
Kb	kilobases
kDa	kiloDalton
l, mL, µL	litre, mililitre, microlitre
LOH	pèrdua d'heterozigositat (<i>loss of heterozygosity</i>)
M, mM, µM, nM	molar, milimolar, micromolar, nanomolar

Min	minut
mm Hg	mil· límetres de mercuri
mRNA	RNA missatger
nm	nanometre
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
rpm	revolucions per minut
SD	síndrome de Down
Seg	segon
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
SVAS	estenosi supravulvar aòrtica
SW	síndrome de Williams
SWB	síndrome de Williams-Beuren
T	timidina
TBE	solució Tris/EDTA/Bòric
TE	solució Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N' -tetrametiletildiamida
U	unitat
UTR	regió no traduïda

INTRODUCCIÓ

1. LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

La síndrome de Williams-Beuren (SWB) és un trastorn del desenvolupament caracteritzat per uns trets facials distintius, retard mental amb un determinat i únic perfil cognitiu i de personalitat, hipercalcèmia infantil i anomalies en el teixit conjuntiu que inclouen arteriopaties. És per tant, un desordre multisistèmic que es presenta amb una incidència de 1/20.000 nascuts vius i que és conseqüència d'una deleció hemizigota de la regió 7q11.23. Fins ara s'ha descrit l'existència de més de 15 gens en la regió comunament delecionada, entre els quals es troba el que codifica per la proteïna anomenada elastina. Mentre que la SWB és el resultat de l'haplinsuficiència del gen elastina i d'altres situats al voltant, mutacions en aquest mateix gen donen lloc a dos desordres autosòmics dominants diferents: l'estenosi supraavalvular aòrtica (SVAS) i la cutis laxa. El descobriment de mutacions, delecions i traslocacions en aquesta regió del cromosoma 7 ha ajudat a esclarir les relacions genètiques d'aquestes tres condicions clíniques: SWB, SVAS i cutis laxa.

1.1. HISTÒRIA DE LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

Les primeres descripcions que es tenen de la SWB es situen al Regne Unit durant una epidèmia d'hipercalcèmia infantil. Aquesta, es va donar tot just després de la 2ona Guerra Mundial i com a conseqüència d'un enriquiment en la dieta dels infants de vitamina D per tal d'evitar el raquitisme (Stapleton *et al.*, 1957). Una vegada es va deixar de suplementar la dieta, la incidència d'hipercalcèmia en els infants va disminuir. Tot i així, encara existia un remanent de nens amb elevats nivells de calci que a més, també presentaven uns inusuals trets facials, comuns entre tots ells, que es varen definir com "*cara de gnom*". Posteriorment, es va veure que aquests nens també presentaven associat com a tret distintiu, una anomalia de les artèries, l'SVAS.

El primer autor en descriure la síndrome com una entitat clínicament definida va ser Williams l'any 1961 al identificar un grup de nens amb SVAS, retard mental i dismorfies facials. De manera independent, Beuren l'any 1962 també va descriure la síndrome però afegint, com a tret distintiu, la naturalesa amigable del nen i més tard, incloent-hi les anomalies dentals i l'estenosi de l'artèria pulmonar (Williams *et al.*, 1961; Beuren *et al.*, 1962 i 1964).

De fet, tots dos autors varen ser els primers en associar aquest conjunt d'alteracions a una entitat clínicament diferenciada produïda per una causa comuna i és per això, que aquesta síndrome se la coneix tant amb el nom de síndrome de Williams (SW) com amb el de síndrome de Williams-Beuren (SWB).

No va ser fins l'any 1993 i gràcies a l'estudi de l'SVAS aïllada i a la relació que aquesta semblava tenir amb la SWB, quan es va descriure la causa genètica que provoca la síndrome. En aquest any Ewart *et al.* (1993a), mitjançant estudis de lligament, van obtenir un lligament positiu per al *locus* elastina del cromosoma 7q11.2 (LOD score de 5,9) en una família amb 13 membres afectats d'SVAS autosòmica dominant. En una segona família, Olson *et al.* (1993) van trobar, per a la mateixa localització, un LOD score de 4,66 indicant, que la causa fonamental de l'SVAS estava en un gen de la regió 7q11.2 que no presentava fenòmens de recombinació entre el gen elastina (*ELN*) i el *locus* per l'SVAS.

La primera demostració clara d'existència de lligament genètic entre l'elastina i l'SVAS es va descriure gràcies a l'estudi d'una família amb SVAS portadora d'una traslocació, t(6;7)(p21.1;q11.23), que disruptonava el gen *ELN* en el seu exó 28 i que cosegregava amb la malaltia dintre de la família seguint un patró autosòmic dominant (Morris *et al.*, 1993; Curran *et al.*, 1993). Aquests treballs van conduir a postular la hipòtesi que la SWB és un desordre de gens contigus on les alteracions dels teixits conjuntiu i vascular són degudes a la delecció d'un al·lel del gen *ELN*. Aquesta hipòtesi va començar a prendre cos gràcies al treball d'Ewart *et al.* (1993b) en el què, utilitzant la tècnica de la hibridació *in-situ* fluorescent (FISH) i l'anàlisi de *Southern blot* per al *locus* del gen *ELN*, demostrava que tant els casos familiars de SWB com els esporàdics presentaven deleccionat el gen *ELN*. Això posava de manifest que la microdelecció d'un al·lel del gen *ELN* i pot ser dels gens flanquejants donava lloc a la SWB. Lowery *et al.* (1995) ho van confirmar realitzant un estudi amb 235 pacients amb sospita clínica de SWB entre els quals, el 96% presentaven hemizigositat per al *locus* de l'elastina. Per tant, es podia postular que mutacions que afectessin part del gen donarien com a resultat la patologia de l'SVAS familiar, mentre que deleccions que afectessin tot el gen *ELN* i els *loci* adjacents causarien la SWB (Ewart *et al.*, 1994).

Avui en dia es coneix que la SWB està causada per una deleció cromosòmica submicroscòpica d'aproximadament 1,5-1,6 Mb en el cromosoma 7, concretament afectant la banda 7q11.23. És una de les anomenades síndromes de gens contigus ja que la deleció afecta a varis gens veïns situats en la regió implicada, entre els quals està implicat el gen *ELN*.

1.2. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques

1.2.1. Manifestacions neurològiques i de comportament

Un dels aspectes més fascinants del fenotip de la SWB és el perfil cognitiu i de comportament que presenten els pacients afectats. Aquests, són individus amb un retard en el desenvolupament motor que els afecta l'equilibri, la força i la coordinació. Com a mitja, no comencen a caminar fins als 28 mesos i posteriorment tenen dificultats tant a l'hora de caminar per un lloc pla com per pujar escales. Són nens que presenten un debut tardà en l'aparició del llenguatge i en l'adquisició de vocabulari però que, sorprenentment i a mida que creixen, aquest retard és superat per un vocabulari gens habitual i ric en modismes (Nazzi i Karmiloff-Smith, 2002). De fet, de joves acostumen a ser bastant xerraires i loquaços.

Durant la lactància, els infants acostumen a ser bastant irritables i amb un plor freqüent però posteriorment, la seva personalitat canvia i es tornen molt amigables, desinhibits, entusiastes i gregaris. Aquest comportament i el fet de mostrar una notable preocupació pels demés i una desinhibició en situacions de grup s'ha acabat reconeixent amb el nom de comportament de "*fiesta de cocktail*".

La majoria de nens amb SWB tenen poca relació amb els seus coetanis, fet que intenten suplir buscant companyia entre els adults. En ells també és característica una pobre i distreta concentració i en el seu patró de conducta destaca la hiperactivitat, la inseguretad emocional i l'ansietat. La majoria són descrits pels seus familiars com amigables, atents i preocupats pels sentiments dels altres, mentre que un comportament agressiu és poc comú.

Globalment presenten un retard mental moderat o sever, amb un coeficient d'intel·ligència (IQ) que està al voltant de 50 a 65 (rang 30-106), tot i que emmascara un perfil cognitiu únic (Donnai i Karmiloff-Smith, 2000). Els individus amb SWB tenen una habilitat verbal i una memòria auditiva relativament bones, que els proporciona una base sòlida per a l'adquisició tant de vocabulari com per al desenvolupament gramatical. En canvi, presenten una deficient habilitat de construcció visuoespacial. Això fa que siguin incapaços de reconèixer objectes com una cosa integrada per diferents parts i per tant, no poden reconstruir-los des de les seves parts. Aquests dèficits visuoespacials es posen de manifest quan es comparen dos individus d'igual edat però un afectat de SWB i l'altre de la síndrome de Down (SD). Tot i que tots dos tenen una construcció espacial anòmala, fallen de diferents maneres. Quan se'ls fa dibuixar, es demostra com un pacient SWB es fixa en els detalls a expenses del dibuix en general, mentre que l'individu amb SD sap mantenir una configuració global però no detallada (Figura 1) (Tassabehji, 2003).

Més del 85% dels individus amb la SWB presenten una excessiva sensibilitat a certs sorolls com poden ser les aspiradores, perforadores o els produïts pels focs artificials. Aquesta hiperacúsia acostuma a millorar amb l'edat i sembla estar associada amb el gran sentit musical i amb la capacitat que tenen per aprendre i retenir la música. Arrel d'aquesta apreciació, s'han realitzat estudis que ratifiquen la possible existència d'una base biològica per al talent musical que mostren els individus amb SWB. Mitjançant estudis amb ressonància nuclear magnètica sobre les mides de les diferents àrees del cervell, s'ha comprovat que la majoria d'individus amb SWB tenen un augment relatiu del pla temporal esquerra, de manera similar al que s'observa entre els músics amb una musicalitat perfecta respecte a la població general (Hickok *et al.*, 1995; Levitin *et al.*, 2003).

En conjunt, la majoria de pacients adquireixen independència a l'hora de vestir-se i rentar-se, però la supervisió acostuma a ser sempre necessària. Pocs són capaços de cuinar o tenir cura de les finances de forma independent. Al llarg de la seva vida adulta continuen requerint vigilància i suport per això, la majoria d'individus viuen a casa dels seus pares o en residències.

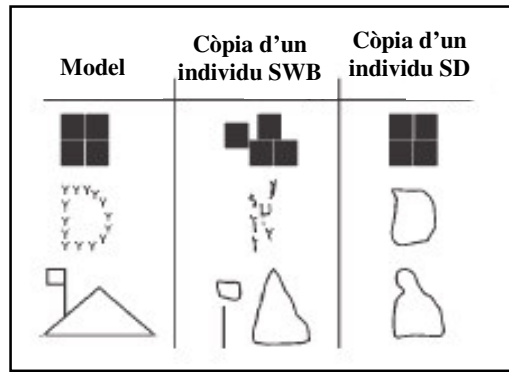


Figura 1. Exemple de tests on es demana als pacients que copiïn una figura global composta per d'altres locals. Els dos grups d'individus (SWB i SD) fallen però de diferents maneres. Els primers són capaços de reproduir els elements locals mentre que els individus SD (de la mateixa edat i igual IQ) només reproduïxen la forma global.

1.2.2. Trets dismòrfics

La SWB es distingeix d'altres desordres neurològics per uns trets facials dismòrfics característics. En l'infant, aquests inclouen un front estret, augment del teixit periorbitari, un nas petit, curt i amb punta antevetida, el filtre llarg i llis, les galtes protuberants amb regió malar poc desenvolupada, la mandíbula petita, els llavis gruixuts i prominents i és gairebé constant el mal alineament i la mala oclusió dental (Figura 2) (Morris i Mervis, 2000). En un principi, totes aquestes manifestacions facials van ser englobades amb el nom de “*cara de gnom*” i van servir per caracteritzar la síndrome. En els adolescents i en els adults, la cara es torna prima i fina, amb pèrdua de teixit subcutani, fet que els proporciona una aparença d'envelliment prematur. És característica una prominent cresta supraorbital, una arrel nasal estreta, un nas de punta gran, poca mandíbula, boca gran i llavis gruixuts, ullals petits i persisteix la mala oclusió dental. Són individus amb un coll llarg i mans petites amb dits relativament curts. El cabell acostuma a ser arrissat i, en un 60% dels casos adults, hi ha una prematura aparició de canes. Amb els anys també desenvolupen una postura característica d'espalles caigudes, lordosi lumbar exagerada i malucs i genolls flexionats (Donnai i Karmiloff-Smith, 2000).



Figura 2. Els trets dismòrfics típics d'un pacient amb la SWB estan il·lustrats en aquestes fotografies d'una adolescent de 17 anys. S'aprecia un ampli front, un estretament bitemporal, plec epicàntic, llavis gruixuts i prominents, mala oclusió bucal, galtes abultades, nas petit i curt amb filtre llarg i llis.

1.2.3. Manifestacions cardiovasculars

Les lesions cardiovasculars són molt típiques i es troben al voltant del 75%-80% dels casos (Pérez-Jurado, 1997). Una de les més freqüents és l'estenosi supravalvular aòrtica (SVAS) tot i que, altres artèries com per exemple la pulmonar, les caròtides o les renals, també poden estar afectades. La severitat de l'SVAS és variable però pot ser progressiva i portar a una mort prematura, a no ser que sigui corregida quirúrgicament. S'ha establert un índex pronòstic segons el valor del gradient de pressió aòrtica determinat en una exploració ecocardiogràfica durant l'etapa de lactància. Si aquest valor està per sota de 20 mm Hg no acostuma a donar-se un empitjorament en un seguiment de molts anys, en canvi, si la pressió aòrtica es troba per sobre d'aquesta xifra és molt probable que la lesió s'agreugi amb el temps (Peter *et al.*, 1993; Wessel *et al.*, 1994).

L'artèria renal també pot patir estenosi i aquesta s'ha associat amb una hipertensió arterial. Un 47% dels pacients amb SWB mostren una pressió sanguínia, tant sistòlica com diastòlica, elevada i sembla que la prevalença d'aquesta hipertensió augmenta amb l'edat (Kececioglu *et al.*, 1993; Broder *et al.*, 1999).

1.2.4. Manifestacions endocrinometabòliques

Els nens amb SWB normalment neixen després d'un embaràs sense complicacions i amb un pes mig de 2760 g (Metcalf, 1999). La síndrome està associada a un patró de creixement anòmal. En el període neonatal, un 80% dels infants presenten problemes en l'alimentació que els condiciona un retard en el creixement. Aquests acostumen a anar acompanyats de vòmits, còlics, reflux gastroesofàgic i restrenyiment (Morris i Mervis, 2000). Els pares expliquen que en aquest període els nens tenen un plor freqüent i que presenten problemes en el dormir. De totes maneres, a mitja infantesa mostren una millora en el patró de creixement tot i que mai acaben assolint l'alçada que els correspondria segons el seu *background* genètic.

En l'estudi fet per Partsch *et al.* (1999) es descriu que la mitja d'alçada en els homes es troba en $165,2 \pm 10,9$ cm, mentre que en les dones està en els $152,4 \pm 5,7$ cm.

L'existència d'aquest retard en el creixement acostuma a donar una relativa obesitat en els adults. Varis estudis també han descrit una pubertat primerenca en la SWB que contribueix a la baixa estatura dels adults (Scothorn *et al.*, 1997). Segurament el desenvolupament d'aquests nens està compromès per la hipercalcèmia idiopàtica que la majoria d'ells presenten durant la infantesa. Tot i els nombrosos estudis fets sobre el metabolisme del calci en pacients amb SWB, l'etiologia d'aquesta hipercalcèmia es desconeix (Kruse *et al.*, 1992; Morris i Mervis, 2000). El que si se sap és que és transitòria i que es resol espontàniament cap als 18-24 mesos de vida de l'infant. Els pacients que la presenten responen bé al tractament d'una dieta baixa en calci i vitamina D.

1.2.5. Manifestacions musculoesquelètiques

Els problemes ortopèdics també són comuns i inclouen escoliosi en un 17% dels casos i contractures al voltant d'un 15%. Un 10% dels individus presenten sinostosi radioulnar i un 5%, desenvolupen dislocacions patellars recurrents (Metcalf, 1999).

1.2.6. Manifestacions gastrointestinals

En els primers mesos de vida gairebé sempre apareixen problemes d'alimentació i són freqüents còlics de lactants i reflux gastroesofàgic. Molts individus, ja des del període de la infantesa, desenvolupen restrenyiment que pot ser un problema crònic i arribar a causar diverticulosi en el còlon i fins i tot, prolapse rectal (López-Rangel *et al.*, 1992). Aproximadament, la meitat dels pacients presenten hèrnies inguinals i/o umbilicals.

1.2.7. Manifestacions genitourinàries

Una manifestació molt freqüent és l'alteració de la funció vesical que condiciona problemes d'incontinència, urgència i enuresi. Com a complicació d'aquests, poden aparèixer diverticles a la bufeta. La incidència d'anomalies del tracte renal en la SWB està sobre el 18% segons amplis estudis realitzats utilitzant l'ultrasonografia (Poher *et al.*, 1993; Pankau *et al.*, 1996).

Entre aquestes anomalies s'inclouen l'agenèsia renal, ronyons duplicats, reflux vesiculourinari i nefrocalcinosi. També està descrit que la funció renal d'aquests pacients decau amb l'edat.

1.2.8. Manifestacions oftàlmiques

Aproximadament un 50% dels pacients amb SWB presenten estrabisme que en alguns casos requereix de correcció quirúrgica. També és característic l'*epicantus*, un aparent hipertelorisme i un iris amb un patró estrellat. Són comuns els defectes de refracció, tant la hipermetropia com la miopia (Winter *et al.*, 1996).

1.2.9. Altres manifestacions

Molts individus amb SWB tenen una veu ronca que es manifesta ja des del plor neonatal. A més, existeixen altres problemes i anomalies associades amb la síndrome que o bé semblen ser alteracions secundàries de les manifestacions ja descrites o bé, es presenten en pacients que no reuneixen els criteris diagnòstics i que molt probablement siguin fenocòpies (Pérez-Jurado, 1997).

De tot aquest ventall de manifestacions clíniques (Taula 1), les més prevalents entre els individus amb la SWB són: la hipoplàsia malar amb galtes abultades (100%), l'augment de teixit periorbitari i llavis gruixuts (95%), nas curt amb un pont nasal pla (90%), així com el retard mental (98%) principalment en un rang de moderat a sever (78%), la personalitat extravertida i gregària (90%), la hiperacúsia (85%) i l'SVAS (75%) (Pérez Jurado, 1997). Aquestes manifestacions són les que s'han de tenir en compte a l'hora d'establir un diagnòstic clínic, ja que avui en dia i a diferència d'altres patologies, encara no s'ha arribat a determinar uns criteris consensuats per al diagnòstic definitiu de la SWB.

Taula 1. Llistat de trets clínics i de símptomes observats en algunes formes de la SWB. +++: signe molt freqüent, ++: signe freqüent, +: signe ocasional.

Trets clínics de la SWB	Freqüència
Nas pla	+++
Llavis gruixuts	+++
Filtre llarg	+++
Celles de diable	+++
Plec epicantus	+++
Retard mental/ psicomotor	+++
Ungles de les mans fines i hipoplàsiques	+++
Boca entreoberta permanentment	+++
SVAS	++
Telecantus	++
Microcefàlia	++
Hipotelorisme	++
Clinodactília del 5è dit	++
Plec palmar transversal	++
Hipoplàsia malar	++
Plor dèbil o agut	++
Alteracions de conducta/ comportament	++
Mala oclusió	+
Hallux valgus	+
Hèrnia inguinal	+
Parpelles edematoses	+
Insuficiència renal	+
Sinostosi radiocubital	+
Microdoncia total o parcial	+
Cardiopatia complexa	+
Fisura palpebral mongoloide/ ascendent	+
Front abombat/ prominències frontals	+

1.3. TRACTAMENT I SEGUIMENT DELS PACIENTS

L'únic tractament mèdic que es pot donar a aquests pacients és el de l'eliminació de la vitamina D i el control de la dieta en el cas que existeixi hipercalcèmia. També és recomanable imposar des d'un principi una dieta rica en residus per tal de combatre el restrenyiment.

El seguiment mèdic dels pacients amb la SWB ha de ser multidisciplinari i en cada cas, dependrà de la varietat i del grau dels problemes mèdics associats.

Els pacients amb SWB requereixen programes d'educació especial individualitzada. Alguns nens s'integren en escoles normals amb un ajut extra mentre que d'altres necessiten escoles especials. És convenient la instauració primerenca d'una teràpia de llenguatge, una teràpia ocupacional i a vegades, d'una teràpia física. Una de les millor teràpies ocupacionals per a molts dels individus SWB és l'estudi i pràctica de la música en qualsevol de les seves varietats instrumentals, ja que els pot ajudar a aconseguir una integració social en el futur. Un gran avantatge que tenen aquests individus a l'hora d'actuar en escenaris i davant de públic és la falta d'inhibició i de por que presenten davant de circumstàncies d'exhibició.

1.4. ASPECTES MOLECULARS

El defecte molecular associat a la SWB és una microdeleció hemizigota de la regió cromosòmica 7q11.23 que inclou, entre d'altres, el gen *ELN* (Ewart *et al.*, 1993a). Per definició, les microdelecions són delecions de mides que es troben per sota o just en els límits actuals de resolució del microscopi òptic (5 a 10 Mb mitjançant una anàlisi citogenètica rutinària amb tinció de bandes Giemsa). Per aquesta raó, la deleció de la SWB s'ha denominat submicroscòpica perquè utilitzant tècniques de citogenètica convencional no s'aconsegueix posar de manifest. Els pacients amb SWB gairebé sempre mostren un cariotip normal i per tant són necessàries tècniques més precises, com la FISH o tècniques moleculars, per poder detectar-la. Això explica perquè van haver de passar més de trenta anys des de la descripció de la SWB com una entitat clínicament diferenciada fins a la seva comprensió molecular. La majoria de casos de SWB (99%) es donen de forma esporàdica tot i que s'han documentat famílies en les que es descriu una transmissió de pares a fills seguint un

patró d'herència autosòmic dominant (Morris *et al.*,1993; Sadler *et al.*,1993).

La SWB és una síndrome que es presenta amb una incidència de 1 cada 20.000 nounats i que es dona amb igual freqüència entre homes i dones (Grimm *et al.*, 1980; Greenberg, 1991). Clínicament es manifesta ja des del període neonatal o infància i també sembla que l'edat dels pares no influeix a l'hora de tenir un fill afecte.

Els estudis moleculars realitzats per Pérez-Jurado *et al.* l'any 1996 en els que, mitjançant un mapa genètic d'alta resolució i un mapa físic de restricció de clons genòmics de la zona, van demostrar que la microdeleció té una mida d'aproximadament 2 cM (1,4 Mb) de DNA genòmic. El gen *ELN* estaria situat al mig de la regió delecionada i els punts de trencament es trobarien aproximadament 1 cM per cada banda del mateix. A més, sembla que existeix poca variabilitat en la mida de les delecions que els diferents pacients presenten i això, ha facilitat establir un interval genòmic que està comunament delecionat en la majoria d'ells (Figura 3). Aquesta apreciació suggereix que els punts de trencament són gairebé sempre els mateixos per a tots els casos de SWB, la qual cosa ens està indicant l'existència d'alguna factor que així ho predisposa (veure apartat 1.6 de la introducció, mecanisme mutacional).

Avui en dia, el nombre de gens inclosos en aquest interval s'estima que pot estar entre 25-30 (Bayés *et al.*, 2003). De moment però, només se n'han descrit 17 tot i que es coneix l'existència de varis transcrits, encara per caracteritzar (Peoples *et al.*, 2000).

El mecanisme causal en la SWB sembla ser l'haploinsuficiència gènica d'alguns d'aquests gens que es troben ubicats en la regió comunament delecionada. No obstant, és d'esperar que no tots ells tinguin una repercussió fenotípica ja que existeix una còpia salvatge en l'altre cromosoma 7. Tampoc es poden descartar altres mecanismes patogènics com: 1) que la deleció posi al descobert una mutació recessiva en l'altre al·lel del gen, 2) que la deleció pugui afectar a gens sotmesos a *imprinting*, és a dir, que normalment s'expressen des d'un dels al·lells depenent del seu origen parental o 3) que la deleció d'algun d'aquests gens afecti l'expressió d'altres ubicats en una zona genòmica diferent.

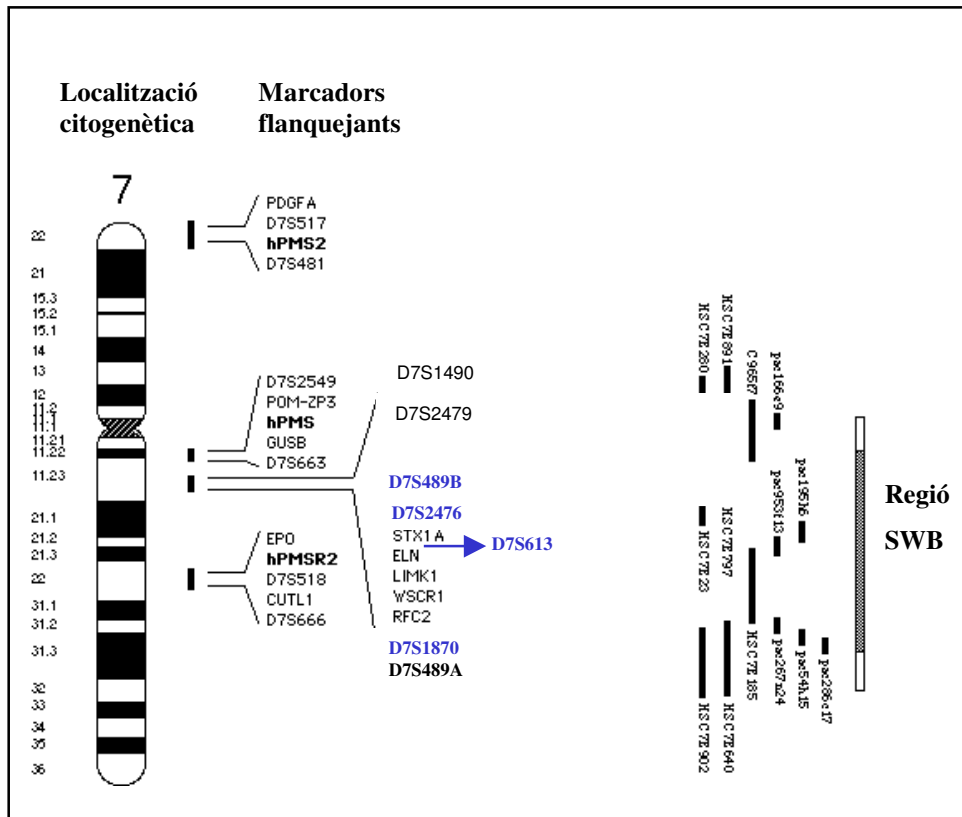


Figura 3. Ideograma del cromosoma 7 on hi està representada la regió citogenètica i la regió molecular de la SWB amb els marcadors flanquejants. En blau es mostra la localització dels marcadors microsatèl·lits situats en l'interval comunament delecionat en la majoria de pacients. Aquests són els que es fan servir en l'estudi de pèrdua d'heterozigotitat per tal de posar de manifest la deleció de la regió 7q11.23.

Dels 17 gens que actualment s'han descrit en la regió SWB, el que més estudis ha suscitat és el gen que codifica per la proteïna de l'elastina. Aquest, va ser el primer gen que es va descriure i és l'únic amb el que s'ha vist que la seva pèrdua o alteració dóna una afectació fenotípica concreta: les anomalies cardiovasculars.

En un 96% dels pacients que mostren un quadre clínic de SWB es detecta la deleció mitjançant mètodes moleculars i/o citogenètics (Lowery *et al.*, 1995). En el 4% restant, aquesta no es posa de manifest potser degut a mutacions puntuals en algun dels gens implicats o a delecions més petites. Tampoc es pot descartar que aquests pacients siguin fenocòpies degudes a mutacions en altres gens situats en una regió genòmica diferent i que creïn un quadre clínic similar.

Entre tots els individus amb SWB, existeix una significativa variabilitat pel que fa a les manifestacions fenotípiques que presenten. Per tal de resoldre aquesta qüestió es va suggerir que l'extensió de la regió delecionada podria estar directament relacionada amb el grau d'afectació i d'aquesta manera, la variabilitat fenotípica dependria del nombre de gens delecionats en cada pacient i del *background* genètic de cadascun d'ells (Osborne *et al.*, 1996). En successius estudis però, aquesta hipòtesi ha estat descartada ja que s'ha pogut comprovar que la mida de la deleció entre els diferents pacients de SWB no sembla variar gaire. Per això s'ha recorregut a analitzar altres paràmetres moleculars com l'origen parental de l'al·lel delecionat i per tant, la possibilitat d'existència de gens *imprintats* en la regió. En un treball realitzat per Pérez Jurado *et al.* (1996) es va trobar una associació significativa entre un major retard de creixement (mesurant el pes, l'alçada i el perímetre cranial de 38 pacients) i la presència de la deleció en el cromosoma matern. Per una altra banda, en una sèrie de 22 pacients SWB, Brondum-Nielsen *et al.* (1997) també van trobar una tendència a un retard de creixement en pacients amb una deleció d'origen patern. El nombre de casos informatius però era massa petit per ser conclouent. En canvi, en el treball de Wu *et al.* (1998) no van trobar cap correlació d'origen parental en 49 casos informatius dels quals, el 41% presentaven un retard de creixement. Per tant, encara s'ha d'evidenciar si existeixen o no gens *imprintats* en la regió delecionada que puguin influir en el creixement dels pacients i que expliquin el perquè de la variabilitat fenotípica d'aquests individus.

1.5. DIAGNÒSTIC I CONSELL GENÈTIC

Fins l'any 1993, moment en què es va descobrir la causa molecular de la síndrome, el diagnòstic de la SWB es feia en base a les manifestacions clíniques que presentava el pacient i a l'experiència de l'especialista clínic. L'existència de trets facials, com els anteriorment descrits, juntament amb alguna altra manifestació característica portava gairebé sempre a un diagnòstic amb alguns dubtes. Actualment i davant de la sospita clínica, l'existència de la deleció es confirma al laboratori mitjançant mètodes moleculars i/o citogenètics. Els estudis citogenètics es realitzen emprant la tècnica de la FISH, en la que s'utilitza com a sonda un cosmid del gen *ELN* i un altre de control que identifica ambdós cromosomes 7 al hibridar en la regió 7q31 (Figura 4). Molecularment es realitza un estudi de pèrdua d'heterozigositat mitjançant el tipatge de 4 marcadors microsatèl·lits que es troben situats en la regió comunament delecionada (D7S1870, D7S2476, D7S613 i D7S489B) (Figura 3). Aquest mètode i a diferència del de la FISH, no només ens mostra si existeix o no deleció, sinó que també ens aporta informació sobre la possible extensió d'aquesta i el seu origen parental (Figura 5).

Un diagnòstic precoç és important per poder realitzar un correcte seguiment del pacient i proporcionar-li, com més aviat millor, una educació especial. De la mateixa manera, també permet facilitar un consell genètic als pares.

No hi ha pràcticament risc que es doni un segon cas de SWB en una mateixa família on anteriorment s'ha diagnosticat un individu, ja que el 99% dels casos són esporàdics. Els pares no afectats amb un fill amb SWB així com els seus fills normals, no tenen cap risc augmentat a tenir descendència amb aquesta patologia. No obstant, a l'hora d'oferir -los un consell genètic se'ls dona un risc de 1-3% perquè no es poden excloure fenòmens de susceptibilitat. De la mateixa manera, també se'ls ofereix la possibilitat d'un diagnòstic prenatal en el cas de posteriors embarassos. En canvi, les persones amb SWB transmeten la lesió molecular i per tant la malaltia d'una manera autosòmica dominant.

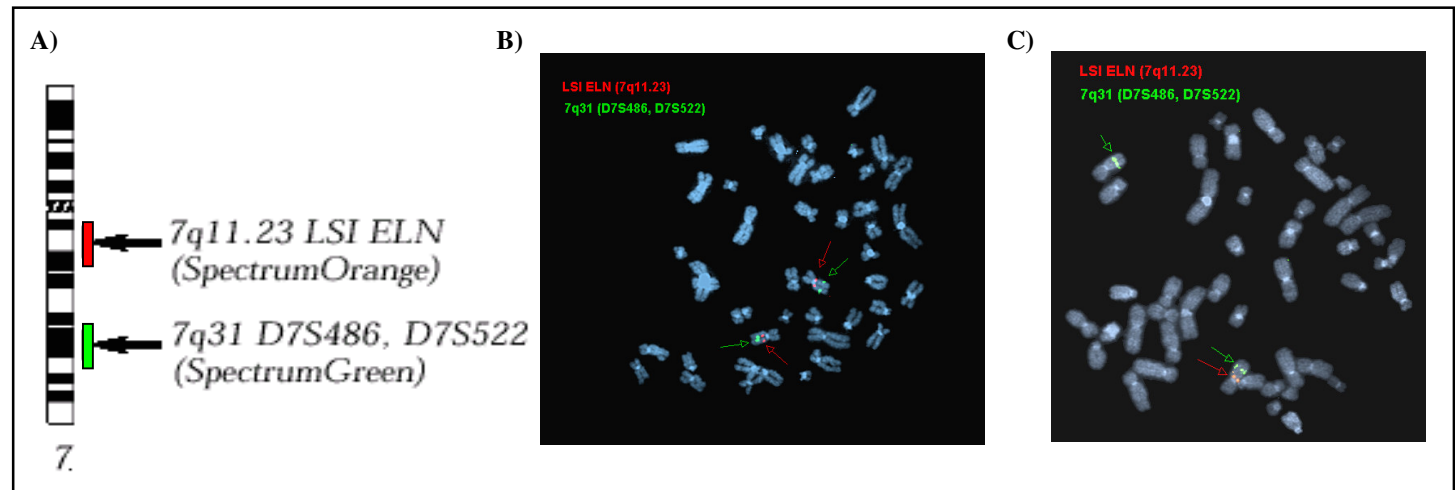


Figura 4. A) Ideograma del cromosoma 7 on hi estan representades les regions on hibrida la sonda utilitzada per a l'estudi de la FISH en la SWB. En vermell es marca la regió on hibrida el cosmid per al gen *ELN* i en verd es mostra la regió control que hibrida a 7q31. B) Hibridació amb la sonda *LSI Williams Syndrome Region Probe* (Vysis) sobre una metafase sense la deleció SWB i C) sobre una metafase amb deleció (objectiu 100x).

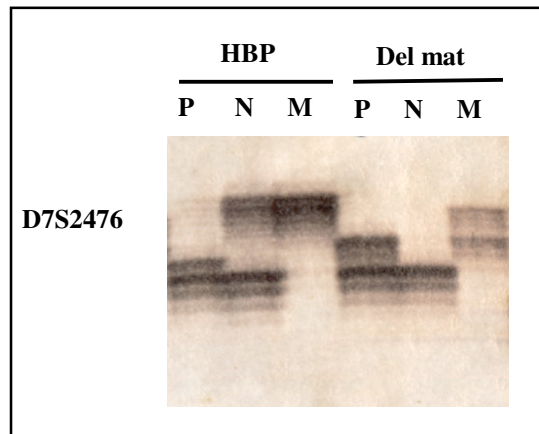


Figura 5. Resultat de l'estudi de pèrdua d'heterozigositat per al marcador polimòrfic D7S2476. En el primer exemple es posa de manifest un cas d'herència biparental (HBP) mentre que en el segon, s'aprecia una deleció d'origen matern (Del mat). P : pare; N: nen; M: mare.

1.6. MECANISME MUTACIONAL

Tenint en compte que la incidència de la SWB és aproximadament de 1 cada 20.000 naixements i que la gran majoria de casos són esporàdics, la taxa mutacional d'aquesta patologia és molt alta, propera a 5×10^{-5} . Genotipant els marcadors flanquejants en grans famílies informatives, s'ha vist que aproximadament 2/3 de les delecions són degudes a recombinacions intercromosòmiques mentre que el terç restant és conseqüència de recombinacions intracromosòmiques (Dutly i Schinzel, 1996; Baumer *et al.*, 1998). També s'ha observat que no existeix una correlació de l'edat dels pares amb una major incidència de delecions i que l'origen d'aquestes, és tan matern com patern.

La regió 7q11.23 presenta una organització complexa amb varis elements duplicats. La primera vegada que es va demostrar la seva existència va ser arran d'estudiar el marcador microsatèl·lit D7S489. Els seus primers amplifiquen al·lels amb tres rangs de mides diferents, que corresponen a tres *loci* polimòrfics situats en la zona (D7S489A, -B i -C) (Pérez-Jurado *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1996). L'al·lel més centromèric, D7S489B (170-178 bp) i el més telomèric, D7S489A (140-144 bp), mapen respectivament a prop dels extrems proximal i distal de la deleció, mentre que D7S489C (156-158 bp), es localitza fora de la regió SWB.

Actualment es coneix l'existència de tres llargs segments duplicats (centromèric, mitjà i telomèric) que flanquegen la regió anomenada SWB, cadascun dels quals està compost per tres blocs diferents anomenats "A", "B" i "C" (Valero *et al.*, 2000). El segment centromèric i mitjà estan situats en la mateixa orientació però amb els blocs en diferent ordre, mentre que el segment telomèric està orientat en sentit oposat i amb els tres blocs ordenats de la mateixa manera que el segment centromèric (Figura 6) (Bayés *et al.*, 2003). El bloc "B" del segment mitjà (Bm) conté els gens *GTF2I*, *NCF1* i *GTF2IRD2*. En canvi, el mateix bloc "B" però del segment centromèric (Bc) i del telomèric (Bt) contenen els corresponents pseudogens (*GTF2IP1*, *NCF1P1* i *GTF2IRD2P1*) (*GTF2IP2*, *NCF1P2* i *GTF2IRD2P2*). La deleció clàssica de SWB es creu que és conseqüència d'una recombinació desigual entre els blocs orientats de la mateixa manera dels segments duplicats centromèric i mitjà.

Recentment també s'ha demostrat l'existència d'un reordenament genòmic a 7q11.23 en alguns dels progenitors que transmeten el cromosoma amb la deleció SWB (Osborne *et al.*, 2001). Els autors han revelat que un 33% dels progenitors són portadors en heterozigosi d'una inversió paracèntrica al voltant de la regió SWB. Aquesta alteració polimòrfica està situada fora de la regió comunament delecionada i no afecta a cap dels gens inclosos en la regió SWB. Això concorda amb que els individus portadors de la inversió no presenten alteracions fenotípiques. Així doncs, aquest polimorfisme seria responsable de predisposar que durant la profase meiótica es doni un mal alineament dels cromosomes en aquesta regió i que com a conseqüència en resulti la deleció de la SWB. Una situació similar s'ha vist que també passa en el cromosoma 8p, on una inversió polimòrfica no patogènica,

predisposa a reordenaments en aquesta zona on es localitza el *cluster* de gens dels receptors olfactius (Giglio *et al.*, 2001).

Tot i que els punts de trencament en la regió de la SWB a la pràctica es podrien donar en qualsevol posició, en el treball realitzat per Bayés *et al.* (2003) es demostra que aquests tendeixen a situar-se entre el bloc Bc i el Bm, on hi ha un major percentatge d'identitat entre les seqüències (99,6%). Com a conseqüència, s'obtindria una deleció amb una mida d'aproximadament 1,55 Mb, que correspon a la que es detecta en un 95% dels casos. En la resta de pacients (5%), la deleció que es troba és major, d'aproximadament 1,84 Mb. Aquesta, es donaria per una recombinació aberrant entre els blocs Ac i Am els quals, tenen un percentatge d'identitat menor (98,2%) (Figura 6).

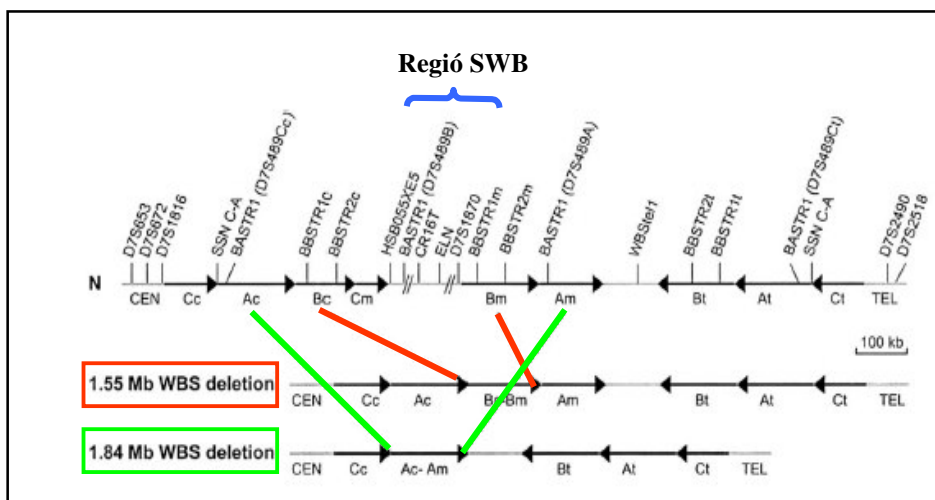


Figura 6. Representació esquemàtica de la regió genòmica de 7q11.23 en un cromosoma normal (N) i en els cromosomes amb la deleció SWB. Els blocs A, B i C de les regions centromèrica (c), mitja (m) i telomèrica (t) estan representats per fletxes negres que indiquen les seves orientacions. Les regions de còpia única estan representades per línies grises. En vermell i en verd es mostren els límits que donarien lloc a les delecions SWB de 1,55 Mb i de 1,84 Mb respectivament. També es mostra la localització de varis marcadors polimòrfics situats en la regió representada (Bayés *et al.*, 2003).

Per tant, la regió coneguda com SWB està flanquejada per elements duplicats amb elevat grau de conservació. Com a conseqüència de l'elevada incidència de delecions *de novo* i com succeeix en altres regions genòmiques ja conegudes, és lògic plantejar que entre aquestes regions properes i idèntiques hi hagi una predisposició a que es donin reordenaments dintre del mateix cromosoma o a una recombinació meiótica desigual entre els cromosomes 7 homòlegs (Figura 7 i Figura 8).

Tanmateix i coneixent l'estructura genòmica de la regió, seria propi esperar trobar altres reorganitzacions, com per exemple duplicacions. No obstant, no s'ha publicat mai cap cas on es descriu l'existència d'una alteració diferent a la deleción. Una possible explicació pot ser que aquestes duplicacions no siguin patològiques o, tot el contrari, que siguin letals. També podria succeir que els individus amb aquestes duplicacions presentessin un fenotip molt diferent al de la SWB i que encara no haguessin estat caracteritzats.

De la mateixa manera que en la SWB, recentment també s'ha vist que aquests fenòmens de recombinació desigual entre regions pròximes i duplicades es donen en altres malalties. Uns exemples són la síndrome de DiGeorge/síndrome velocardiofacial que afecta la regió 22q11.2 (Shaikh *et al.*, 2000; McDermid i Morrow, 2002), la síndrome de Prader-Willi i d'Angelman a 15q11-q13 (Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999) o la síndrome d' Smith-Magenis a 17p11.2 (Chen *et al.*, 1997).

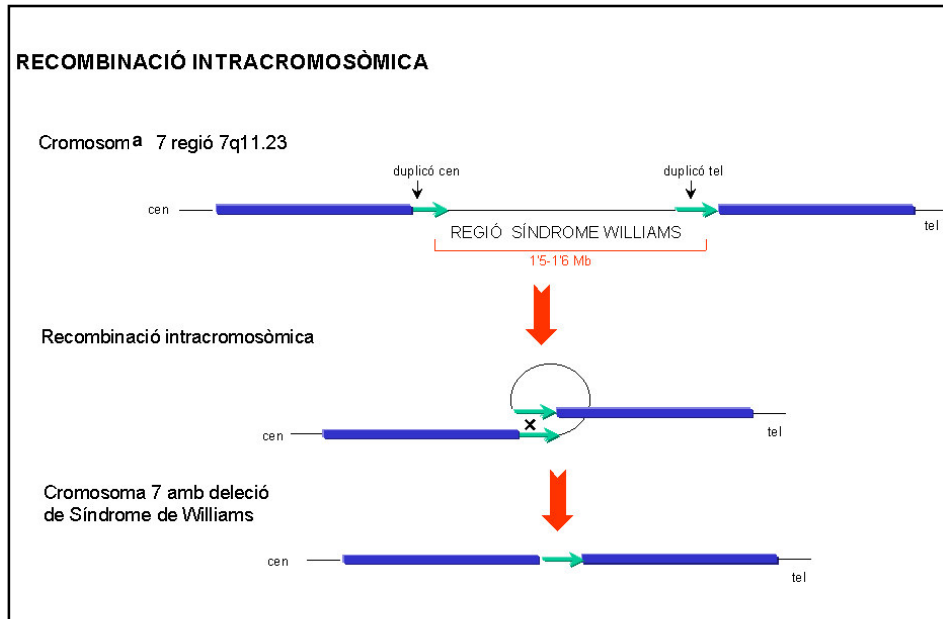


Figura 7. Esquema del mecanisme mutacional mitjançant recombinació intracromosòmica.

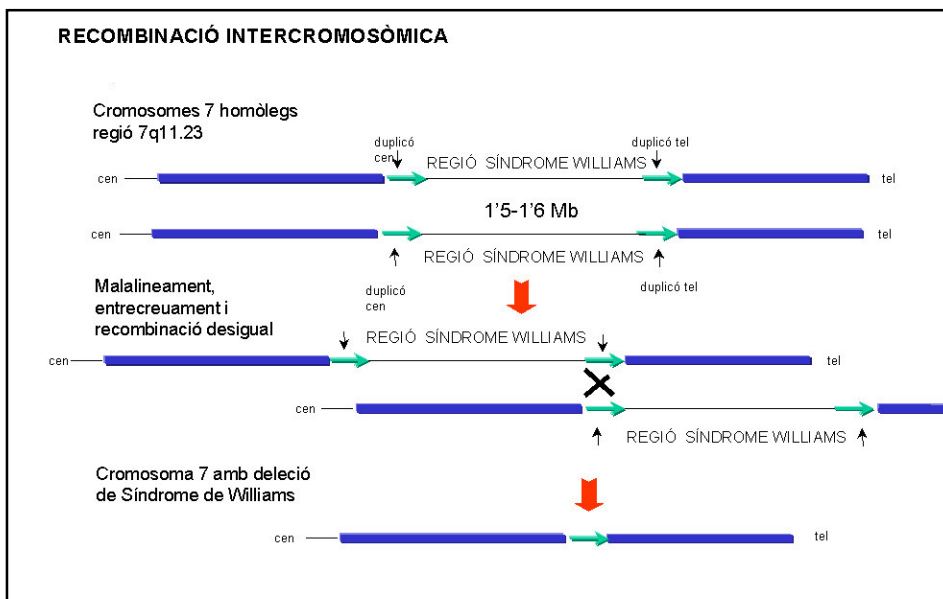


Figura 8. Esquema del mecanisme mutacional mitjançant recombinació intercromosòmica.

1.7. GENS DE CÒPIA ÚNICA DESCRITS EN LA REGIÓ SWB

Fins a l'actualitat, s'han trobat 17 gens en la zona comunament delecionada en la SWB (Figura 9 i Taula 2), tot i que s'estima que n'hi pugui haver entre 25 i 30 (Francke, 1999; Peoples *et al.*, 2000; Magano *et al.*, 2001; DeSilva *et al.*, 2002; Merla *et al.*, 2002).

Elastina (*ELN*) és el gen que codifica per la tropoelastina, una proteïna que és secretada fora de la cèl·lula on forma xarxes amb ella mateixa per donar lloc al que es coneix com elastina. Aquesta, és el principal component de les fibres elàstiques que existeixen en la pell, les articulacions, la paret dels vasos sanguinis i altres teixits, aportant-los la capacitat de distendre's.

El gen *ELN* està format per 34 exons distribuïts al llarg d'aproximadament 40 kb al mig de la regió de la SWB. S'ha demostrat que mutacions puntuals en aquest gen causen manifestacions cardiovasculars idèntiques a les de la SWB (Tassabehji *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Urbán *et al.*, 1999 i 2000; Metcalfe *et al.*, 2000). Això ens indica que les alteracions cardiovasculars que presenten els pacients afectats de la SWB són degudes a la pèrdua d'una de les còpies de gen *ELN* i per tant, a la seva haploinsuficiència. La disminució en la producció d'elastina condiciona una menor elasticitat i una major rigidesa a la paret dels vasos sanguinis, essent les zones més afectades aquelles que estan sotmeses a una major pressió. Altres aspectes que també semblen estar causats per l'haploinsuficiència d'aquest gen són els problemes de les articulacions, les hèrnies, els diverticles de còlon i bufeta, l'envelliment prematur de la pell, la veu ronca i alguns dels trets dismòrfics (Morris i Mervis, 2000). Actualment s'està investigant la possibilitat d'intervenir terapèuticament en base a aquests coneixements. Se sap que l'elastina és degradada per les elastases, si es pogués disminuir amb algun fàrmac l'activitat d'aquestes elastases s'aconseguiria incrementar la vida mitja de l'elastina i d'aquesta manera suplir la falta de dosi d'aquests individus.

El gen *ELN* no només està involucrat en la SWB, sinó que mutacions puntuals en la seva seqüència donen lloc a dues entitats clíniques diferents: l'SVAS no-sindròmica i la cutis laxa.

LIM Kinasa-1 (*LIMK-1*) és un gen que codifica per una proteïna quinasa que fonamentalment s'expressa en cèl·lules neuronals i que la seva funció sembla estar relacionada amb la formació del citoesquelet d'actina (Stanyon i Bernard, 1999). Aquest gen va adquirir una gran importància quan la seva hemizigositat en els pacients amb SWB, es va relacionar amb els problemes d'integració visuoespacial que presenten. Frangiskakis *et al.* l'any 1996 van descriure dues famílies que presentaven SVAS i un perfil cognitiu visuoespacial idèntic al de la SWB però sense retard mental ni cap altra manifestació característica. L'estudi molecular d'aquestes famílies va revelar l'existència, en totes dues, d'una deleció hemizigota que incloïa exclusivament els gens *ELN* i *LIMK-1*. Més tard, Tassabehji *et al.* (1999) van descriure una altra família amb la mateixa deleció, on *LIMK-1* també estava afectat, però que no presentaven el mateix fenotip. L'obtenció d'aquests resultats en principi contradictoris, fa que encara siguin necessaris més estudis per acabar de definir la implicació de *LIMK-1* en el fenotip de la SWB. Recentment però, Meng *et al.* (2002) han obtingut un ratolí *knockout* per *LIMK-1* (*Limk-1^{-/-}*) en el que s'aprecia una disminució en la plasticitat neuronal, la qual cosa recolzaria el paper crític d'aquest gen en el fenotip de la SWB.

Replication factor complex subunit 2 (*RFC2*) codifica per la segona subunitat (la d'unió a ATP) del complex proteic essencial per l'elongació del DNA durant la replicació (RFC: Replication factor C) (Osborne *et al.*, 1996; Peoples *et al.*, 1996). La pèrdua d'una de les còpies del gen *RFC2* podria afectar a l'eficiència de la replicació del DNA i contribuir en els defectes de creixement i de desenvolupament que els pacients amb SWB presenten. De totes maneres però, no existeixen resultats concloents que demostrin un paper específic del gen *RFC2* en el fenotip SWB (Martindale *et al.*, 2000).

Frizzled 9 (*FZD9*) codifica per una proteïna homòloga al gen *frizzled* de *Drosophila melanogaster* (Wang *et al.*, 1997). S'ha comprovat que *frizzled* actua com a receptor per *wingless*, una proteïna que s'expressa durant el desenvolupament embrionari. L'homòleg de *wingless* també s'ha trobat en mamífers, són les proteïnes wnt. De fet existeix un ratolí *knockout* per wnt que presenta anomalies en el desenvolupament del mesencèfal. *FZD9* lliga la proteïna wnt i es pot postular que en els éssers humans

tingui una funció similar com a receptor d'aquestes proteïnes que controlen el desenvolupament embrionari. De totes maneres està per demostrar quina és la seva possible implicació en les manifestacions de la síndrome.

Sintaxina 1 A (*STX1A*) codifica per una proteïna que s'ha trobat gairebé exclusivament en les membranes presinàptiques, on interactua amb altres components de la maquinària presinàptica, suggerint que aquesta proteïna és essencial per a l'alliberament del neurotransmissor (Sudhof, 1995). Els nivells màxims d'expressió de *STX1A* s'han trobat en neurones, sobretot del còrtex cerebral i del cervellet (Botta *et al.*, 1999). Degut al seu patró d'expressió i a que es perd en la SWB s'ha hipotetitzat que tingui un paper en certes característiques del comportament observades en individus amb SWB com per exemple, la gran memòria auditiva que tenen els pacients (Yamaguchi *et al.*, 1996). Per això, Wu *et al.* (2002) van fer un estudi mutacional del gen en pacients amb trets fenotípics de SWB però sense la deleció. No obstant, els resultats obtinguts no recolzaven aquesta hipòtesi ja que no van detectar cap mutació puntual tot i que no varen estudiar els elements reguladors del gen.

Eukaryotic initiation factor 4H (*EIF4H*) inicialment conegut com a *WBSCR1*, dóna lloc a una proteïna que actua com a regulador en la síntesi de proteïnes a nivell d'inici de traducció gràcies als motius d'unió a RNA que presenta (Osborne *et al.*, 1996). Aquest gen, es troba localitzat entre els gens *LIMK-1* i *RFC2*, en la regió crítica delecionada. Tot i que la seva implicació en la SWB és totalment especulativa, s'han establert comparacions amb la síndrome del cromosoma X fràgil, on l'expressió reduïda d'una proteïna d'unió a RNA condiciona un quadre clínic de retard mental.

Cytoplasmic linker 2 (*CYLN2*) codifica per una proteïna conservada, CLIP-115, que predominantment s'expressa a cèl·lules neuronals i que es creu està implicada en la formació de les unions tipus *gap* (De Zeeuw *et al.*, 1998). Recentment s'ha pogut tenir accés a un ratolí amb haploinsuficiència per *Cyln2* que ha permès aportar indicis que suggereixen que aquesta proteïna, tot i no ser essencial per a la vida

(ratolí *Cyln2^{-/-}* és viable), és important per a un correcte desenvolupament neuronal (De Zeeuw *et al.*, 1998; Hoogenraad *et al.*, 2000).

FK506-binding protein 6 (*FKBP6*) codifica per una proteïna amb similitud estructural amb les immunofilines, les quals són receptors cel·lulars per drogues immunosupressores com FK506 i la rapamicina (Meng *et al.*, 1998). La funció cel·lular de molts dels membres d'aquesta família avui en dia encara es desconeix.

BAZ1B (*WBSCR9/WST*) codifica per una nova proteïna que conté dos dominis (PHD *zinc finger* i el *bromodomain*) que normalment es troben en proteïnes reguladores de la transcripció ja que permeten que la maquinària de la transcripció s'uneixi als *enhancers* dels gens que regulen. És per això que s'ha predit que la funció de BAZ1B sigui la de regulador transcripcional (Lu *et al.*, 1998; Peoples *et al.*, 1998). A part d'aquests dos motius, la resta de la proteïna presenta una seqüència completament nova i per tant, una confirmació de la seva implicació en la SWB s'obté quan s'aconsegueixi el ratolí *knockout* (Jones *et al.*, 2000).

BCL7B és un gen de funció desconeguda que es va anomenar així degut a l'homologia que presenta amb *BCLA* (Jadayel *et al.*, 1998). Aquest *BCLA* és un gen que es veu disruptat en línies cel·lulars de limfoma de Burkitt. Tot i això, *BCL7B* no té cap motiu funcional reconegut, la qual cosa dificulta fer una predicció sobre la seva funció (Meng *et al.*, 1998).

Transducin b-like 2 (*TBL2* o *WS-βTRP*) codifica per una proteïna que conté quatre repeticions *β-transducin* (Meng *et al.*, 1998). La seva funció es desconeix però altres proteïnes que contenen aquests mateixos dominis, altament conservats, se sap que estan involucrades en la regulació de varis processos com la transducció de senyals, la transcripció, l'organització del citoesquelet i la fusió vesicular. La pèrdua d'una còpia d'aquest gen en la SWB podria tenir un paper en el fenotip, ja que l'haploinsuficiència d'un altre gen (*LISI*) que també conté aquestes mateixes repeticions causa la síndrome de Miller-Dieker.

WBSCR14 (*WS-bHLH*) gen que conté motius d'unió al DNA i d'interacció proteïna - proteïna anomenats *basic-helix-loop-helix leucine zipper* (bHLHzip). Altres proteïnes amb aquests mateixos dominis són importants reguladors de la neurogènesi, la miogènesi, la proliferació cel·lular i de la diferenciació i determinació del llinatge cel·lular (Meng *et al.*, 1998; Cairo *et al.*, 2001). Tot i això, la funció cel·lular de WBSCR14 és incerta, només se sap que s'expressa predominantment en fetge d'adults. L'haploinsuficiència d'altres gens que codifiquen per factors de transcripció del tipus bHLH s'ha demostrat que són la causa de desordres genètics en humans. Un exemple és la síndrome de Waardenburg tipus 2A (causada per mutacions a *MIFT*) que cursa amb sordesa i alteracions en la pigmentació, o la síndrome Saethre-Chotzen, una forma relativament freqüent de craniosinostosi deguda a l'haploinsuficiència del gen *TWIST*. Per això se suposa que la pèrdua d'un al·lel de *WBSCR14* pugui tenir conseqüències fenotípiques en la SWB (De Luis *et al.*, 2002).

Claudin 4 i Claudin 3 (*CLDN4/CPETRI* i *CLDN3/CPETR2*) tots dos pertanyen a una mateixa família de gens, amb trànscripats de mides similars, que codifiquen per proteïnes integrals de membrana. Aquesta família també inclou el gen *TMVCF* la deleció de qual, està implicada en la síndrome velo-cardio-facial (Sirotkin *et al.*, 1997). La funció de *CLDN4* i *CLDN3* es desconeix, però se sap que codifiquen pel receptor de l'enterotoxina de *Clostridium perfringens*. Aquesta enterotoxina causa diarrees presumiblement gràcies a la formació de porus en la membrana de l'epiteli intestinal on *CLDN4* i *CLDN3* s'expressen. Es pot especular que una disminució en el nombre d'aquests receptors pugui conduir a una reducció de les secrecions intestinals i contribuir d'aquesta manera, al restrenyiment característic de molts pacients amb SWB (Paperna *et al.*, 1998).

General transcription factor 2-I (*GTF2I*) codifica per dues proteïnes, BAP-135 i el factor de transcripció TFII-I, que s'expressen sobretot a cervell (Pérez-Jurado *et al.*, 1998). Aquest gen es troba interromput pel punt de trencament telomèric de la deleció i existeixen evidències, extretes a partir d'estudis de delecions atípiques amb una mida inferior a la clàssica, que el relacionen amb el retard mental que els individus SWB presenten (Morris *et al.*, 2003; Karmiloff-Smith *et al.*, 2003).

GTF2IRD1 (*WBSCR11*) va ser identificat gràcies a la seva similitud amb *GTF2I*. Tots dos gens es troben localitzats en la mateixa orientació i molt pròximament. *GTF2IRD1* presenta dominis HIH i per això s'ha predit que codifica per una proteïna que actua com a factor de transcripció (Osborne *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 1999).

WBSCR15 codifica per una proteïna de funció desconeguda que no té cap domini ni motiu característic. Per això, és difícil postular el paper que pot desenvolupar en humans (Doyle *et al.*, 2000).

La cerca sistemàtica de trànscripats en la regió de la SWB mitjançant mètodes de selecció de cDNA ha revelat l'existència d'onze trànscripats nous que han estat anomenats: *WBSCR5*, *WBSCR16*, *WBSCR17*, *WBSCR18*, *WBSCR19*, *WBSCR20A*, *WBSCR20B*, *WBSCR20C*, *WBSCR21*, *WBSCR22* i *WBSCR23* (Merla *et al.*, 2002). La majoria d'ells encara estan per caracteritzar i no tots es localitzen dintre de la regió comunament delecionada. És possible que la transcripció d'altres gens situats en la regió estudiada estigui regulada en un estadi del desenvolupament o de manera teixit-específica i que per tant, no puguin ser detectats pels mètodes utilitzats. També podria ser que no es detectessin altres trànscripats perquè els seus nivells d'expressió fossin massa baixos.

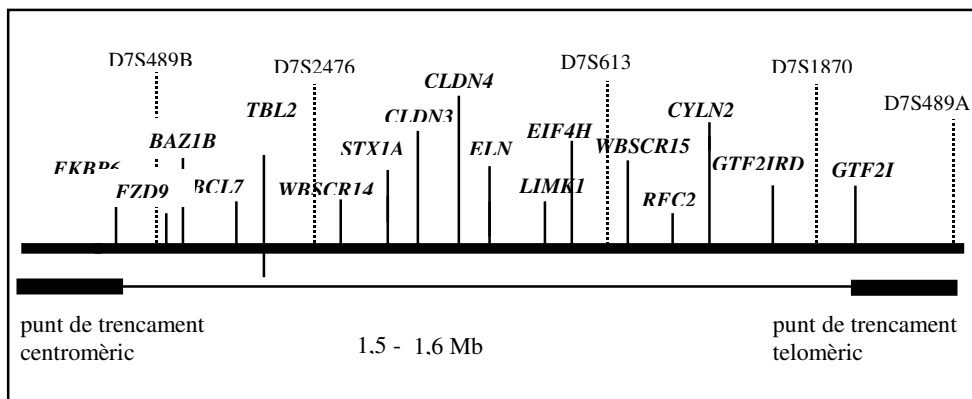


Figura 9. Mapa dels gens que es troben en la regió comunament delecionada en la SWB. Les distàncies entre els *loci* no estan a escala.

Taula 2. Resum dels gens descrits fins ara en la zona comunament deletada de la SWB.

<i>ELN</i>	Elastina	Proteïna estructural, forma xarxes de fibres que proporcionen flexibilitat i elasticitat. Important pel desenvolupament arterial
<i>RFC2</i>	Factor de Replicació 2, subunitat C	Component del complex de replicació C, paper essencial en l'elongació del DNA
<i>LIMK1</i>	LIM Kinasa 1	Proteïna involucrada en la reorganització del citoesquelet d'actina, essencial pel moviment de les neurones
<i>FZD9</i>	Frizzled 9	Proteïna receptora del lligand de WNT
<i>STX1A</i>	Sintaxina 1A	Part d'un complex de la membrana pesinàptica implicat en l'exocitosi del neurotransmissor
<i>EIF4H</i>	Factor 4H d'iniciació de la traducció en eucariotes	Proteïna amb domini d'unió a RNA
<i>GTF2I</i>	Factor 2-I de transcripció	Codifica pel factor general de transcripció TFII-I
<i>CYLN2</i>	Proteïna-115 d'unió citoplasmàtica	Proteïna del sistema nerviós central que uneix organel·les cel·lulars al citoesquelet via microtúbuls
<i>FKBP6</i>	Proteïna-6 d'unió a FK506	Funció desconeguda però amb homologia amb immunofilines
<i>BAZ1B</i>	Factor de transcripció	Conté un bromodomini i un domini PHD. Podria ser un activador de la transcripció
<i>BCL7B</i>	Membre de la família de proteïnes BCL7	De funció desconeguda
<i>WBSCR14</i>	Proteïna de la SW amb un <i>helix-loop-helix</i>	Factor de transcripció, les proteïnes amb les que interactua es desconeixen
<i>TBL2</i>	Proteïna β -transducines	Podria ser una proteïna de senyalització intracel·lular
<i>CLDN4</i>	Receptor 1 de l'enterotoxina de <i>Clostridium Perfringens</i>	Funció fisiològica desconeguda
<i>CLDN3</i>	Receptor 2 de l'enterotoxina de <i>Clostridium Perfringens</i>	Funció fisiològica desconeguda
<i>GTF2IRD1</i>	Proteïna conté semblant a <i>GTF2I</i>	Semblant a <i>GTF2I</i> . Podria ser un factor de transcripció
<i>WBSCR15</i>	Proteïna de la SW n° 15	Funció fisiològica desconeguda

1.8. CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

La majoria d'individus que reuneixen els criteris diagnòstics per la SWB presenten una deleció de mida consistentment similar d'aproximadament 1,5 Mb i per tant, tots ells tenen els mateixos gens deleccionats en el cromosoma afectat. Existeixen documentats uns quants casos de pacients SWB amb deleccions més petites (Osborne *et al.*, 1999; Botta *et al.*, 1999; Tassabehji *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2003; Karmiloff-Smith *et al.*, 2003) i d'altres amb una deleció de mida major (Morris *et al.*, 2000). En canvi, en la literatura no existeix cap cas creïble de SWB que no presenti la deleció, la qual cosa suggereix que l'haploinsuficiència d'un únic gen no explicaria el fenotip i que per tant, la SWB es tracta d'una síndrome de gens contigus.

En els casos en què la mida de la deleció és major a la comunament descrita (però sense arribar a poder ser detectada citogenèticament) s'ha vist que els pacients tenen uns valors d'IQ me'nors a la mitjana d'individus SWB. Això suggereix que un o més dels gens situats telomèricament dintre de la regió comunament deleccionada juguen un paper en el correcte desenvolupament cognitiu (Morris *et al.*, 1999). Els pacients amb deleccions que sí s'han pogut identificar per citogenètica convencional, mostren un fenotip comú amb el de la SWB però més sever que el clàssic (Zackowski *et al.*, 1990).

En els casos descrits de pacients amb deleccions parcials, que inclouen el gen *ELN*, o d'individus amb mutacions puntuals en aquest mateix gen, s'ha pogut veure que a part de les manifestacions cardíagues, sovint presenten altres anomalies del teixit conjuntiu característiques del fenotip SWB, com són alguns trets facials, la veu ronca, hèrnies i pell laxa (Morris i Mervis, 2000). Aquests casos en canvi, no presenten cap de les altres manifestacions fenotípiques típiques de la SWB i això ha permès correlacionar l'hemizigositat del gen *ELN* amb aquests trets fenotípics.

Gràcies a la caracterització de pacients amb deleccions SWB atípiques, on només els gens *ELN* i *LIMK-1* estaven afectats, s'ha postulat que *LIMK-1* podria ser el responsable de la incapacitat de construcció visuoespacial que manifesten (Frangiskakis *et al.*, 1996). Els estudis d'expressió aporten evidències que recolzen aquest paper de *LIMK-1*, ja que aquest gen codifica per una proteïna quinasa que

s'expressa durant el desenvolupament del cervell, especialment en el còrtex cerebral. La proteïna interactua amb el receptor transmembrana *neuregulin* i fosforila la cofilina, un regulador del citoesquelet d'actina important en el moviment cel·lular i en el creixement axonal de les neurones (Wang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). De manera contrària Tassabehji *et al* (1999) van descriure tres individus amb delecions de la regió SWB més petites en les que el gen *LIMK-1* també hi estava implicat. Cap d'ells però, presentava el perfil cognitiu característic de la SWB amb deficiència de construcció visuoespacial i en canvi mostraven uns IQs superiors a la mitja de pacients SWB. Morris i Mervis (2000) expliquen que segurament aquests tres pacients utilitzen les estratègies de comprensió verbal per resoldre els problemes de construcció visuoespacial i que per tant, emmascaren el seu fenotip original. També s'ha de tenir en compte que la construcció visuoespacial segurament segueix un model de *loci* quantitatiu en el que, múltiples gens contribueixen individualment a una distribució normal i molt probablement *LIMK-1* sigui un d'aquests tot i que no l'únic (Mervis *et al.*, 1999).

De la mateixa manera, Morris *et al.* (2003) van caracteritzar les delecions de cinc famílies SWB atípiques. Aquestes, fenotípicament manifestaven anomalies del teixit conjuntiu (trets facials, veu ronca, hèrnies, SVAS) relacionades amb l'haploinsuficiència del gen *ELN* i el perfil cognitiu característic (relativament bona memòria verbal i poca capacitat de construcció visuoespacial). En canvi, cap dels afectats presentaven retard mental. L'estudi de la mida de les delecions va revelar que no tenien deleccionat els gens *FKBP6* (en el punt centromèric de trencament) ni el *GTF2I* (en el punt telomèric de trencament) i per tant, això suggeria que els gens situats en els punts de ruptura de les delecions clàssiques de SWB eren els responsables del retard mental dels pacients. Més endavant, Karmiloff-Smith *et al.* (2003) van descriure el cas d'una pacient SWB sense retard mental i amb una deleció petita que únicament no incloïa el gen *GTF2I*. Això ha fet que en l'actualitat, aquest gen se'l consideri el principal candidat pel retard mental que els pacients amb SWB presenten.

De moment però, dels 17 gens que fins ara s'han descrit en la regió SWB actualment només l'hemizigotisme de l'*ELN* s'ha associat, sense cap mena de dubte, amb alguns aspectes de la SWB com són l'SVAS, hèrnies, veu ronca i possiblement

l'envelliment prematur. Això indica que, en solitari o en combinació, algun dels gens restants de la regió delecionada són els responsables de la resta de trets fenotípics de la SWB però la possible relació que tenen es desconeix per a la majoria d'ells. A part de la correlació amb el gen *ELN*, actualment se sap que els gens *FZD3*, *BCL7B*, *STX1A*, *LIMK-1* i *CYLN2* tenen una expressió neuronal i això els fa ser candidats per explicar els trets característics neurològics i de comportament de la SWB (Morris i Mervis, 2000).

Com que el 98% dels individus que reuneixen els criteris diagnòstics per la SWB tenen els mateixos gens delecionats s'ha de recórrer a altres factors i no a la mida de la deleción, per tal d'explicar la variabilitat fenotípica que presenten els pacients. Totes les síndromes mostren una expressivitat variable segons els individus que la pateixen, i molts són els factors que poden influenciar la presència o el grau de severitat de les diferents manifestacions fenotípiques. L'ambient per exemple, pot ser un d'aquests factors. Els individus amb SWB i un nivell socioeconòmic baix estan més exposats a obtenir uns pitjors resultats en els tests estandarditzats que els psicòlegs els sotmeten. Un altre possible factor és l'edat de l'individu. Es coneix que algunes complicacions de la SWB són més prevalents a certes edats, com per exemple la hipercalcèmia en la infància o les contractures de lligaments en l'etapa adulta. Factors genètics addicionals també poden tenir el seu paper ja que les accions d'altres gens poden tenir un efecte tan positiu com negatiu en el fenotip. D'aquesta manera, si existeix una mutació deletèria en un dels gens de la regió SWB en el cromosoma 7 no delecionat, es dona una condició de recessivitat en aquell individu. Finalment, el *background* genètic de cada individu pels trets multifactorials com poden ser l'alçada, la intel·ligència o la hipertensió idiopàtica segur que també té una implicació a l'hora d'explicar la variabilitat fenotípica que existeix entre els pacients amb la síndrome.

En resum, els estudis de les delecions i de les mutacions en els gens de la regió SWB han permès avançar en la comprensió dels mecanismes genètics que impliquen el fenotip de la SWB. D'aquesta manera es coneix que el gen *ELN* és responsable dels aspectes del teixit conjuntiu i de les característiques compartides entre la SWB, l'SVAS i la cutis laxa. *LIMK-1* ha estat implicat en la incapacitat d'una construcció visuoespacial gràcies a estudis d'expressió i als estudis clínics familiars. De la

mateixa manera al gen *GTF2I* se'l considera el principal candidat pel retard mental que els pacients amb SWB presenten. Els altres aspectes del fenotip de la SWB s'aniran resolent a través de l'estudi continuat de les famílies amb delecions atípiques que es vagin detectant en les caracteritzacions dels diferents pacients i tanmateix, amb el desenvolupament d'estudis funcionals dels gens situats en la regió comunament delecionada.

2. ELASTINA

La principal importància que té la proteïna elastina rau en la seva funció biològica, la qual és la d'impartir elasticitat a òrgans i teixits com la pell, els vasos sanguinis i els pulmons, que requereixen elasticitat i resistència a la tensió. L'elastina s'organitza formant una xarxa de fibres altament extensibles en la matriu extracel·lular d'aquests òrgans, als que confereix la capacitat de recuperar la seva conformació inicial després d'una deformació transitòria. La concentració d'aquestes fibres elàstiques en els diferents òrgans i teixits és variable. Les majors concentracions es troben en l'aorta on més del 50% del seu pes en sec és elastina. Aquesta també està present en gran quantitat en les parets d'altres artèries i vasos sanguinis, en la pell i en pulmons; on s'encarrega de donar suport a l'expansió i retrocés dels alvèols durant el procés de la respiració (Alberts *et al.*, 1994).

L'examen ultraestructural de les fibres elàstiques revela l'existència d'una estructura complexa formada per dos components morfològicament diferents: l'elastina i les microfibril·les. El primer d'ells representa el component majoritari, té una aparença estructural amorfa i es troba envoltat per les microfibril·les que, tot i ser el component minoritari, estan formades per varies proteïnes entre les quals s'inclouen les fibril·les i les glicoproteïnes associades a microfibril·les (Debelle i Tamburro, 1999). Les concentracions relatives d'elastina i del component microfibril·lar varien durant el desenvolupament embrionari. En els primers estadis del desenvolupament, les fibres elàstiques que es troben en els embrions estan formades gairebé exclusivament per component microfibril·lar mentre que, a mida que el desenvolupament avança, la proporció d'elastina incrementa progressivament de tal manera que les noves fibres que es formen estan compostes en un 90% per aquesta proteïna (Uitto *et al.*, 1982). Actualment, es coneix poca cosa sobre la bioquímica

del component microfibril·lar però en canvi, l'estructura de l'elastina està ben caracteritzada i se sap que la seva unitat bàsica és un polipèptid que rep el nom de tropoelastina.

2.1. EL GEN DE L'ELASTINA

El gen de l'elastina (*ELN*) és un gen de còpia única que en humans es localitza en el cromosoma 7q11.23 i que sota condicions normals, és expressat per varis tipus cel·lulars durant els estadis del desenvolupament pre- i neonatal. El principal tipus responsable de la seva síntesi són les cèl·lules del múscul llis (Uitto *et al.*, 1982).

El producte que codifica el gen *ELN* és la tropoelastina, una proteïna de 750-800 residus, la seqüència completa de la qual és coneguda per a l'espècie humana i per a d'altres com la bovina. El gen humà de l'*ELN* té un total de 34 exons que s'expandeixen en aproximadament 40-45 kb de DNA genòmic i que codifiquen, de forma alternada, per seqüències hidrofòbiques i per seqüències riques en residus de lisina (Figura 10). Aquest patró es conserva entre les diferents espècies estudiades. No obstant, s'ha observat que alguns exons no es troben representats en determinades espècies com és el cas dels exons 35 i 36 de l'espècie bovina que no es troben en el gen humà (Rosenbloom *et al.*, 1995; DeBelle i Tamburro, 1999).

El gen *ELN* de l'espècie humana té una sèrie de particularitats. Els seus introns són molt més llargs que els exons i els extrems exó-intró sempre produeixen l'*splicing* de la mateixa manera. Aquesta característica, permet que es donin *splicings* alternatius del transcrit primari sense que la pauta de lectura es vegi alterada i per tant, que existeixin varies isoformes de la proteïna tropoelastina. S'ha vist que aquest fenomen està regulat en l'espai i durant el desenvolupament i és de suposar que això tingui un significat funcional que avui en dia es desconeix (Heim *et al.*, 1991). També s'ha descrit que de forma abundant i sobretot cap a la regió 3' del gen es localitzen seqüències repetides de tipus *Alu* (Christiano i Uitto, 1994). En el genoma humà, aquestes repeticions *Alu* es troben amb una freqüència d'una cada 4 kb mentre que en el gen de l'*ELN*, es presenten amb una freqüència quatre vegades superior (Bashir *et al.*, 1989). Tot i que la funció precisa dels elements repetitius *Alu* no es coneix, se sap que faciliten els esdeveniments de recombinació i que aquests són causants de lesions genètiques en varies malalties hereditàries. El fet que en el

gen *ELN* de l'espècie humana es perdin dos exons (34 i 35) de la regió 3' confirma la inestabilitat d'aquesta regió.

La caracterització del gen *ELN* humà ha revelat l'existència de dos motius predominants, codificats per diferents exons, en la molècula de tropoelastina:

- 1) Dominis hidrofòbics, rics en residus alifàtics com la prolina, alanina, isoleucina, valina o glicina, aquest dos últims són els que més abunden. Aquestes seqüències mostren una considerable variabilitat entre les diferents espècies sense que la seva funcionalitat es vegi compromesa.
- 2) Dominis d'unió *cross-link*, rics en residus de lisina. En general són seqüències riques en lisina que es troben altament conservades al llarg de l'evolució, concretament les codificades pels exons 33 i 34 (homòleg a l'exó 36 de vaca).

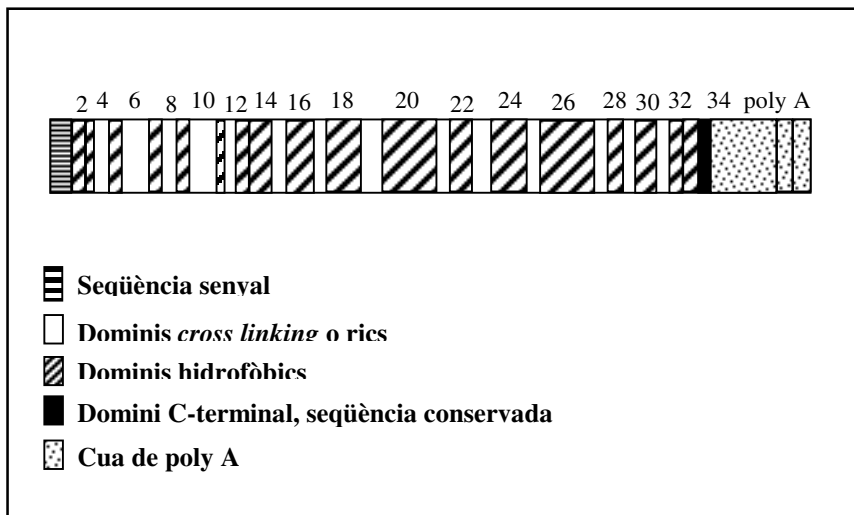


Figura 10. Esquema del cDNA de l'*ELN* on es mostren els diferents exons (només enumerats els parells) i els dominis funcionals pels quals codifiquen.

2.2. LA PROTEÏNA ELASTINA

L'elastina madura és un polímer insoluble constituït per varies molècules de tropoelastina unides, les unes amb les altres, per enllaços covalents creuats. D'aquesta manera es genera una trama elàstica que permet que, teixits com ara les artèries i els pulmons, es deformin i es dilatin sense patir cap mal. Com s'il·lustra en la Figura 11, l'elasticitat d'aquesta trama és deguda a la capacitat de les diferents molècules proteïques de descarregar-se de forma reversible cada cop que se'ls hi aplica una força de tensió.

El procés d'ensamblatge de la fibra d'elastina comença dintre de la cèl·lula amb la síntesi del seu precursor, la tropoelastina (Figura 12). A mida que aquesta és sintetitzada, se li uneix una galactoelectina que actua com a xaperona i que impedeix que es doni una prematura agregació intracel·lular de la proteïna. Aquesta associació es manté fins que el complex és excretat a l'espai extracel·lular on, la xaperona acompanyant interactua amb un galactosucres de les microfibril·les de tal manera que la seva afinitat per la tropoelastina decreix i és aleshores quan aquesta última és alliberada. Es creu que el component microfibril·lar, present en la matriu extracel·lular, actuaria com una estora per la deposició de l'elastina i, molt probablement, tindria una paper crític en la correcta organització de les molècules de tropoelastina. De fet, la interacció de la part N-terminal de les glicoproteïnes associades a microfibril·les amb el domini C-terminal de la tropoelastina és necessària per a una correcta elastogènesi (Brown-Augsburger *et al.*, 1996). Una vegada les molècules de tropoelastina estan alineades, la majoria dels seus residus de lisina són deaminats i oxidats a alisina (el seu corresponent aldehid) gràcies a l'enzim lisil-oxidasa depenent de coure. És aleshores quan es formen els enllaços covalents mitjançant la reacció de les alisines amb elles mateixes o amb les lisines no modificades. Aquestes unions intermoleculares, responsables de les propietats elàstiques de les fibres, són conegudes amb el nom de desmosines i condueixen a la formació d'unes fibres elàstiques altament insolubles que s'entrellacen per donar lloc a la xarxa d'elastina, la qual forma el teixit conjuntiu. Intercalades entre les fibres elàstiques es troben llargues fibres de col·lagen, inelàstiques, que limiten la capacitat d'extensió de les fibres prevenint així, que el teixit es trenqui (Debelle i Tamburro, 1999; Kielty *et al.*, 2002).

L'elastina madura és extremadament estable i el seu recanvi és tan lent que es pot considerar que roman en l'individu al llarg de tota la seva vida. De totes maneres, sí que existeix un cert recanvi que és dut a terme per uns enzims proteolítics anomenats elastases.

Recentment, dues malalties genètiques, l'SVAS no-sindròmica i la cutis laxa autosòmica dominant han estat associades a mutacions en el gen *ELN*. Aquestes són per tant, dues variants al·lèliques amb un fenotip clínic diferent.

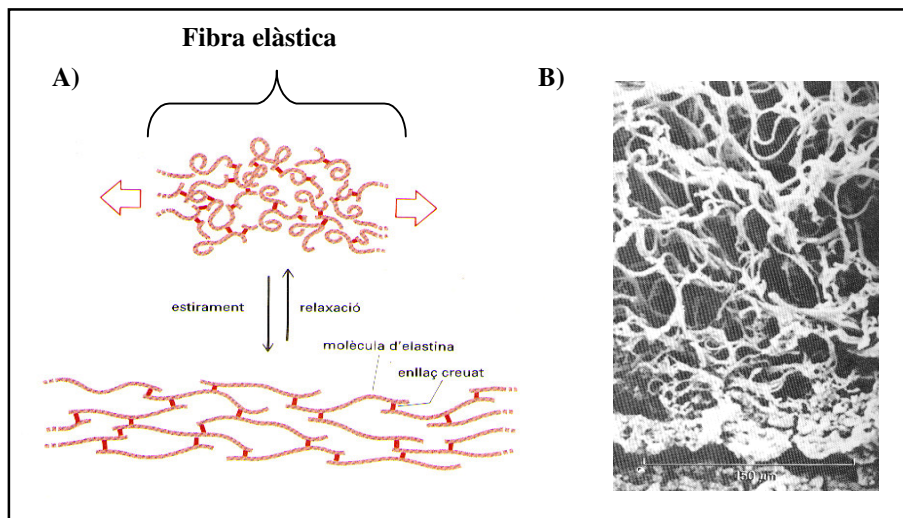


Figura 11. A) Les molècules d'elastina estan unides entre elles mitjançant enllaços covalents (indicats en color vermell) formant fibres elàstiques. Quan la fibra és estirada, cada molècula d'elastina es descargola adoptant una conformació més estesa (Alberts *et al.*, 1994). B) Micrografia electrònica de rastreig d'una secció de teixit conjuntiu de pell humana en què s'observa una extensa xarxa de fibres elàstiques. El teixit ha estat escalfat sota pressió per tal d'extreure el col·lagen i els glicosaminoglicans. (De Tsuji *et al.*, 1978).

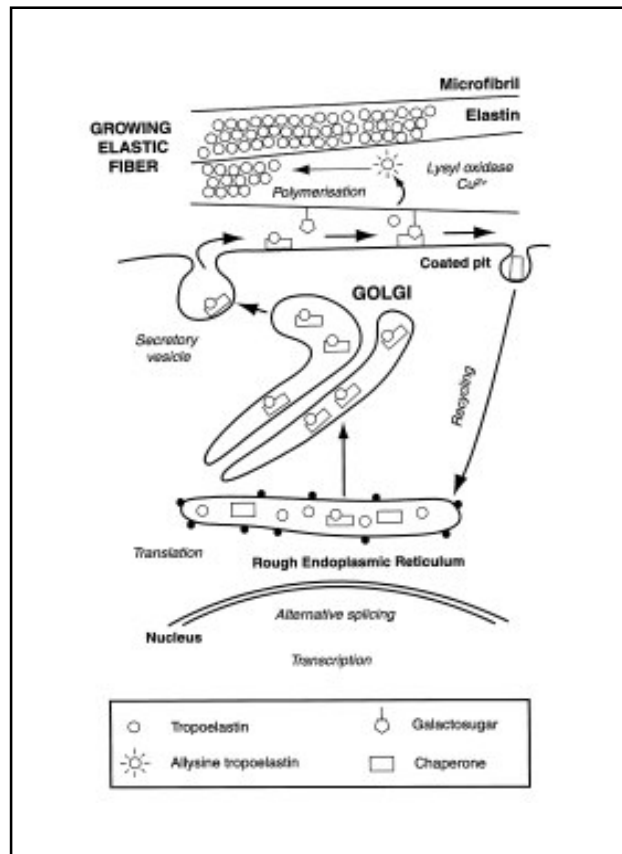


Figura 12. Descripció esquemàtica del procés de deposició de l'elastina (Debelle i Tamburro, 1999). Immediatament després de la traducció i dintre del reticle endoplasmàtic, la molècula de tropoelastina és "capturada" per una xaperona. Aquesta associació, que evita la prematura agregació de la tropoelastina, perdura en l'aparell de Golgi fins que el complex (tropoelastina-xaperona) és secretat. Una vegada a l'espai extracel·lular, el complex es localitza en la superfície cel·lular i la xaperona és reciclada (gràcies a la interacció amb un galactosucre del component microfibril·lar) quan la molècula de tropoelastina interactua amb la fibra d'elastina naixent. Aleshores, la molècula de tropoelastina és alineada correctament i modificada per la lisil-oxidasa. Finalment, és incorporada dintre la xarxa elàstica mitjançant una polimerització irreversible i consecutivament, va creixent entre el component microfibril·lar.

2.3. ESTENOSI SUPRAVALVULAR AÒRTICA

L'estenosi supravalvular aòrtica (SVAS) és una forma poc comuna però ben caracteritzada d'obstrucció de la circulació sanguínia en l'aorta ascendent i que es dona a resultes d'un estretament de caràcter local o difús de la mateixa aorta (Wessel *et al.*, 1994). La lesió de l'SVAS va ser reconeguda per primera vegada per un patòleg d'origen italià, Mencarelli, l'any 1930. Des d'aleshores i sobretot en els últims 30 anys, ha estat diagnosticada amb una major freqüència. A part de l'aorta, altres artèries majors com la pulmonar, la caròtida, la cerebral, la renal i la coronària poden veure's afectades de la mateixa manera. Clínicament es caracteritza perquè durant l'examinació física, els pacients presenten un murmurí sitòlic sever. L'edat en què es manifesta per primera vegada, així com la severitat amb que ho fa, varien segons el pacient però, si no es tracta, pot donar lloc a una aturada cardíaca, un infart de miocardi i la mort prematura. Actualment, l'única opció terapèutica que existeix per als casos simptomàtics és la intervenció quirúrgica (Chowdhury i Reardon, 1999).

Amb els anys, l'SVAS s'ha reconegut com una malaltia que no només es pot presentar com a tret característic dintre del fenotip de la SWB sinó també, com una malaltia no-sindròmica esporàdica (Eisenberg *et al.*, 1964) o heretada seguint un patró d'herència autosòmic dominant (Schmidt *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1993; Rastelli *et al.*, 1996). En les tres situacions clíniques però, les característiques de l'aorta són les mateixes. Gràcies a l'estudi dels casos familiars s'ha vist que l'SVAS és un desordre que es manifesta amb una penetrança incompleta i amb una expressivitat variable de la mateixa manera que passa quan es dona dintre de la SWB (Chiarella *et al.*, 1989).

Les primeres evidències que recolzaven el paper de l'elastina en la patologia de l'SVAS es van obtenir a partir d'estudis patològics i fisiològics en els que es veia que pacients amb SVAS presentaven anomalies en l'estructura i funció de l'elastina. O'Connor *et al.* (1985) al examinar teixit muscular llis de 6 pacients amb SVAS (esporàdica, familiar heretada o dintre de la SWB) van demostrar que en tots ells existia una anomalia histològica comuna que comprometia una organització desestructurada i quantitativament deficient de les fibres d'elastina, un excés de col·lagen i una atrofia del teixit en general.

Aquestes evidències inicials, que implicaven a l'elastina com a causa patogènica de l'SVAS, es van veure recolzades quan es va mapar el fenotip a prop del *locus ELN* i quan posteriorment, es van trobar mutacions en el gen entre els pacients amb SVAS no-sindròmica.

Des d'aleshores, s'ha identificat un ampli espectre de mutacions entre les quals s'inclouen delecions intragèniques (Olson *et al.*, 1995), traslocacions (Curran *et al.*, 1993; Ewart *et al.*, 1994) i més freqüentment, mutacions puntuals del tipus *nonsense*, *frameshift*, *missense* i d'*splicing* (Figura 13) (Li *et al.*, 1997; Tassabehji *et al.*, 1997; Urbán *et al.*, 1999; Metcalfe *et al.*, 2000).

Actualment però, encara no es coneix del tot la seqüència exacta d'esdeveniments que porten a la manifestació de l'SVAS com a conseqüència d'una mutació en el gen *ELN*. S'ha postulat que les mutacions poden produir un defecte quantitatiu o qualitatiu en la síntesi de la proteïna.

- a) Defecte quantitatiu: es produiria per la síntesi d'un transcrit d'mRNA inestable que causaria una hemizigositat funcional o haploinsuficiència del gen (com passa en el cas de l'SVAS deguda a la SWB on hi ha una pèrdua total d'un al·lel).
- b) Defecte qualitatiu: la síntesi d'un transcrit aberrant d'mRNA donaria lloc a un producte proteic incapaç d'ensamblar-se correctament a l'hora de formar la fibra d'elastina madura durant el desenvolupament vascular.

També s'ha intentat establir una correlació entre el tipus de mutació i la severitat de la lesió vascular però no s'ha pogut arribar a cap conclusió ja que un fenotip sever d'SVAS es troba tant en casos amb mutacions de tipus *missense* o d'*splicing*, com en casos de mutacions que trunquen la proteïna (Li *et al.*, 1997; Metcalfe *et al.*, 2000). Tampoc es troba cap explicació a la gran variabilitat que el fenotip SVAS pot mostrar entre diferents famílies o dintre d'una mateixa família, on la severitat de la malaltia varia des de portadors asimptomàtics de la mutació fins a individus que moren durant la infància com a conseqüència d'una lesió cardíaca severa (Metcalfe *et al.*, 2000).

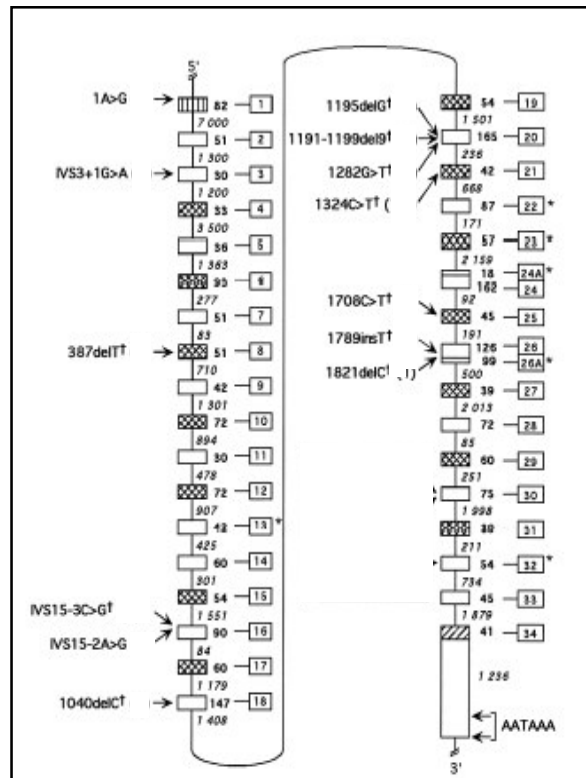


Figura 13. Espectre mutacional del gen *ELN*. Les mutacions caracteritzades en pacients amb SVAS estan indicades a l'esquerra del diagrama del gen. Les mutacions que generen un proteïna truncada estan indicades per †. Els rectangles amb un número dret representen els exons del gen, la seva mida està indicada al costat amb negreta. La mida dels introns també hi figura, a sota i en cursiva. Els asteriscs assenyalen els exons que poden patir *splicing* alternatiu. Els rectangles blancs volen representar els dominis hidrofòbics mentre que els ratllats, els dominis rics en lisina. Els corresponents a l'exó 1 i al 34 estan representats de diferent manera per destacar que el primer conté la seqüència senyal i l'últim codifica pel domini C-terminal (Milewicz *et al.*, 2000).

2.4. CUTIS LAXA

La cutis laxa és un desordre rar del teixit conjuntiu que es caracteritza perquè la pell es torna inelàstica i redundant (Schreiber i Jilley, 1961). Existeixen varies formes descrites de cutis laxa i totes elles mostren una considerable heterogeneïtat pel que fa a les manifestacions clíniques. La cutis laxa pot ser hereditària o adquirida i des del punt de vista genètic, s'han descrit formes amb un patró d'herència autosòmic dominant, recessiu o lligat al cromosoma X. En tots els casos però, el primer tret diagnòstic és la hiperextensibilitat de la pell i una aparença d'envelliment prematur (Figura 14). El fet que totes les formes de cutis laxa siguin molt rares fa que no es disposi de dades precises sobre la seva prevalença (Fazio *et al.*, 1989; Sephel *et al.*, 1989).

La forma adquirida de cutis laxa és normalment deguda a la pèrdua de fibres elàstiques cutànies com a conseqüència de processos inflamatoris generalitzats o locals. La cutis laxa que antigament s'havia definit com a lligada al cromosoma X (altrament coneguda amb el nom de síndrome d'Ehlers-Danlos tipus IX) està causada per mutacions en el gen *ATP7A* el qual, codifica per un transportador de coure. Els pacients que la pateixen presenten unes fibres elàstiques anòmales degudes a una incorrecta formació dels enllaços covalents. Actualment aquest desordre es classifica dintre del grup de les síndromes amb deficiència de coure i s'ha vist que és una variant al·lèlica de la malaltia de Menkes (Loeys *et al.*, 2002).

Pel que fa a les formes autosòmiques, aquestes es diferencien perquè la recessiva es manifesta ja des del període perinatal i perquè cursa amb greu afectació dels òrgans interns que condueixen a una mort prematura del pacient. El defecte genètic per aquesta forma de cutis laxa ha estat recentment descrit i es tracta de mutacions en el gen *FBLN-5* (Fibulin-5) (Loeys *et al.*, 2002; Markova *et al.*, 2003). Gràcies als resultats obtinguts en experiments realitzats amb ratolins *knockout* (*fibulin-5^{-/-}*), s'ha pogut demostrar que aquest gen, que codifica per una proteïna de la matriu extracel·lular, té un paper important en el desenvolupament normal de les fibres elàstiques ja que participa directament en el seu ensamblatge (Yanagisawa *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002).

La forma autosòmica dominant de cutis laxa aparentment no presenta anomalies sistèmiques i el debut de les manifestacions cutànies es dona normalment en el període de la infància a la pubertat (Damkier *et al.*, 1991; Loeys *et al.*, 2002).

L'examen histopatològic de la pell d'aquests pacients revela una quantitat reduïda de fibres d'elastina i una fragmentació de les existents. S'ha descrit que mutacions en el gen *ELN* són les causants d'aquesta patologia. De totes maneres, en la literatura únicament existeixen tres casos familiars que hagin estat correlacionats amb mutacions en aquest gen. Totes elles però, corresponen a delecions d'un nucleòtid en la regió 3' del gen *ELN* (de l'exó 30 al 34) que donen lloc a una seqüència peptídica més llarga que s'extén cap a la regió 3' no traduïda (Tassabehji *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). El mecanisme patogènic exacte de la malaltia no es coneix però es creu que alteracions en aquest domini C-terminal de la proteïna, implicat en la correcta formació de les fibres elàstiques, puguin interferir en la deposició normal de la proteïna.



Figura 14. Fotografia de l'esquena d'un pacient afectat de cutis laxa autosòmica dominant. En aquesta imatge s'aprecia la redundància i de la pell i com aquesta forma plecs (fotografia obtinguda de Molis T i Hogan D, <http://www.emedicine.com/derm/topic93.htm>).

OBJECTIUS

Objectiu principal

L'objectiu principal d'aquesta tesi és el d'aprofundir en el coneixement de les bases moleculars de la síndrome de Williams-Beuren i del gen elastina, determinant l'espectre mutacional de les anomalies cardiovasculars i dels pacients afectats de cutis laxa.

Objectius concrets

- Caracteritzar i delimitar molecularment les delecions de la regió 7q11.23 en tots aquells pacients confirmats com a positius per a la síndrome de Williams-Beuren.
- Establir l'origen parental de les diferents delecions i detectar si existeixen diferències en les manifestacions clíniques dels pacients segons l'origen parental de la delecio.
- Avaluat la clínica dels pacients amb la síndrome de Williams-Beuren i establir quins dels trets fenotípics són els més prevalents.
- Valorar la implicació del gen de l'elastina en dues patologies diferents a la síndrome de Williams-Beuren: l'estenosi supravalvular aòrtica i la cutis laxa.

MATERIAL I MÈTODES

1. OBTENCIÓ DE MOSTRES

S'han estudiat 200 pacients amb sospita clínica de SWB que han estat remesos al Servei de Genètica de l'Hospital Clínic des de diferents serveis de genètica, pediatria i neurologia infantil d'altres hospitals nacionals, per tal d'obtenir una confirmació diagnòstica. De cadascun d'ells, s'ha sol·licitat un protocol clínic que requeria informació sobre retard mental, fàcies característica de SWB, esotopia dental, mala oclusió bucal, veu ronca, estenosi supravalvular aòrtica, hèrnies, limitació de les articulacions i personalitat característica de SWB. Juntament amb el protocol degudament complimentat per l'especialista, de cada pacient i dels seus progenitors s'ha demanat una mostra de 10 mL de sang amb EDTA i una altra de 5 mL amb heparina, aquesta última només de l'afectat.

Dels 200 casos estudiats, 70 han estat confirmats com a positius mitjançant diagnòstic molecular i/o citogenètic. D'aquests 70 pacients, s'han acotat els límits de la regió delecionada a través d'un estudi de pèrdua d'heterozigositat amb marcadors microsatèl·lits localitzats dintre i als voltants de la zona descrita com a comunament delecionada en la SWB. A la vegada, també s'ha estudiat l'origen parental de la deleción en tots ells.

Per una altra banda, amb els pacients que en la clínica presentaven alguna cardiopatia (SVAS, comunicació intraventricular o auricular, buf cardíac, ...) i que el seu diagnòstic no ha confirmat la deleción, s'ha realitzat un estudi mutacional del gen *ELN*. Aquests pacients sumen un total de 28.

Tanmateix i amb col·laboració amb el Servei de Dermatologia del mateix Hospital Clínic, s'ha disposat d'una família amb dues generacions clínicament diagnosticada de cutis laxa autosòmica dominant a la que també s'ha realitzat un estudi mutacional i funcional del gen *ELN*.

2. EXTRACCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

2.1. Extracció de DNA genòmic a partir de sang perifèrica

Per a l'obtenció del DNA genòmic s'ha utilitzat un mètode d'extracció estàndard (Miller *et al.*, 1988) seguint el següent protocol:

- ◆ Mostra de 10-20 mL de sang perifèrica recollida amb EDTA (màxim 24 h).
- ◆ Afegir sèrum fisiològic fins a un volum de 50 mL (Tubs *Nunc* de 50 mL).
- ◆ Centrifugar a 2000 rpm durant 10 min a 4°C (Centrífuga *Jouan CR 422*).
- ◆ Eliminar la fase superior amb cura, evitant arrossegar la interfase de leucòcits.
- ◆ Afegir solució de lisi d'eritròcits fins a un volum de 50 mL i agitar.
- ◆ Centrifugar a 3500 rpm durant 15 min a 4°C.
- ◆ Desestimar el sobrenedant per decantació i tornar a afegir solució de lisi d'eritròcits fins a un volum de 50 mL.
- ◆ Centrifugar a 3500 rpm durant 15 min a 4°C.
- ◆ Desestimar el sobrenedant per decantació.
- ◆ El precipitat es pot guardar a -20°C o bé continuar amb el procés d'extracció.
- ◆ Afegir 3 mL de solució de lisi de leucòcits, 0,2 mL de SDS 10% i 0,5 mL de solució de Proteïna K.
- ◆ Agitar fins que la mostra adquireixi un aspecte homogeni.
- ◆ Incubar a 37°C en agitació durant tota la nit.
- ◆ Afegir 1 mL de NaCl 5M i agitar bé.
- ◆ Centrifugar a 4000 rpm durant 20 min i a 4°C.
- ◆ Traspasar el sobrenedant a un tub net i tornar a repetir la centrifugació amb la finalitat d'eliminar al màxim les sals que després podrien interferir en les posteriors tècniques a realitzar.
- ◆ Afegir un volum de cloroform i barrejar. El cloroform ajuda a precipitar les proteïnes i les restes cel·lulars que puguin quedar.
- ◆ Centrifugar a 4000 rpm durant 20 min a 4°C.
- ◆ Recuperar la fase superior evitant endur-nos part de la interfase.

- ◆ Afegir 2 volums d'etanol absolut i barrejar suaument per tal que el DNA es vagi compactant.
- ◆ Recuperar el DNA amb una pipeta Pasteur de vidre i rentar-lo amb etanol 70% per eliminar l'excés de sals.
- ◆ Ressuspendre el DNA amb 1 mL de solució TE 10/0,2 (depenent de la quantitat de DNA obtinguda) a 37°C durant unes hores.

Solucions:**Tampó de lisi d'eritròcits**

Tris-HCl (pH 7,5) (Merck) 2 M
 MgCl₂ (Merck) 1 M
 Solució extemporània

Tampó de lisi de leucòcits

NaCl (Merck) 5 M
 EDTA (pH 8,0)(Merck) 0,25M
 Tris-HCl (pH 7,5) 2 M

Solució de Proteïnasa K

Proteïnasa K (Roche Diagnostics) 2 mg/mL
 SDS (dodecil sulfat sòdic, Sigma) 10 %
 EDTA (pH 8,0) 0,25 M
 Guardar a -20°C

TE 10/0,2

Tris-HCl (pH7,5) 2 M
 EDTA (pH 8,0) 0,25 M

SDS 10%

Dodecil sulfat sòdic 10 g
 Aigua destil·lada fins a 100 mL

2.2.Extracció de DNA genòmic a partir de vellositats corials o líquid amniòtic

Per a l'obtenció de DNA de vellositats corials s'ha seguit el protocol descrit per Kunkel *et al.* (1977).

Preparació de les mostres:Vellositats corials:

- ◆ En una placa de Petri es separen les restes maternes de la vellositat. És important que la mostra s'obtingui a partir del trofoblast i és necessari evitar al màxim les possibles contaminacions maternes.

- ◆ Col·locar les vellositats netes en una gota de sèrum fisiològic i homogeneïtzar la mostra.
- ◆ Si hi ha molta contaminació hemàtica, realitzar una lisi d'eritròcits amb el tampó corresponent i centrifugar a 14000 rpm (microcentrífuga) en un tub eppendorf durant 2 minuts, decantar el sobrenedant.

Líquid amniòtic:

- ◆ Centrifugar el líquid amniòtic i desestimar el sobrenedant.

Obtenció del DNA:

- ◆ Afegir 300 µL de tampó d'urea tant a les vellositats com al líquid amniòtic.
- ◆ Afegir 6 µL de Proteïnasa K (10 mg/mL).
- ◆ Incubar a 56°C durant 2 h (o tota la nit a 37°C).
- ◆ Afegir un volum de fenol-cloroform-isoamílic i barrejar.
- ◆ Centrifugar 2 min a 14000 rpm.
- ◆ Transferir la fase superior a un altre tub eppendorf.
- ◆ Afegir un volum de cloroform-isoamílic i barrejar.
- ◆ Centrifugar 2 min a 14000 rpm.
- ◆ Transferir la fase superior a un altre tub eppendorf.
- ◆ Afegir 1/10 (v/v) d'acetat sòdic 3M (pH 5,2) (Merck).
- ◆ Precipitar amb dos volums d'etanol absolut fred.
- ◆ Rentar amb etanol al 70%.
- ◆ Assecar el pellet.
- ◆ Ressuspendre el DNA en TE 10/0,2.

Solucions:

Tampó d'urea

24 g Urea (Merck)
3 mL NaCl 5M
2 mL EDTA 0,25M (pH 8,0)
250 µL Tris-HCl 2M (pH 7,5)
10 mL SDS 10%
Aigua destil·lada fins 50 ml

Proteïnasa K

10 mg Proteïnasa K
1 mL Tris-HCl 10mM (pH 7,5)

TE 10/0,2

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
0,2 mM EDTA (pH 8,0)

Solució de fenol equilibrat

La solució de fenol (Merck) es prepara saturant fenol líquid - al què prèviament s'hi ha afegit 8-hidroxiquinolina (Sigma Chemical Co.) a una concentració final de 0,1% - amb una solució que conté: 0,22 M NaCl, 55 mM Tris-HCl (pH 8,0), 11 mM EDTA. Aquesta solució s'emmagatzema a 4°C i protegida de la llum.

Solució de cloroform-alcohol isoamílic:

Aquesta solució es prepara barrejant cloroform (Merck) i alcohol isoamílic (Panreac) en una relació 24:1.

Solució de fenol-cloroform:

Es prepara a parts iguals una barreja de fenol equilibrat amb cloroform:isoamílic (24:1). Es guarda dintre d'una ampolla fosca afegint un volum de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) i a 4°C.

2.3. Extracció d'RNA total

L'extracció d'RNA s'ha realitzat a partir d'un cultiu de fibroblasts procedents d'una biòpsia de pell. L'RNA s'ha obtingut utilitzant el RNeasy midi Kit (QIAGEN) seguint les indicacions del fabricant. Amb aquest procediment s'obtenen fins a 200 µg d'RNA total.

3. LECTURA DE LA CONCENTRACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Els àcids nucleics absorbeixen la llum ultraviolada entre 250 i 271 nm a causa de la presència de bases púriques i pirimidíniques. Per això, l'absorbència d'una dissolució per les longituds d'ona 260 nm i 280 nm, ens dona informació sobre la concentració i puresa dels àcids nucleics que hi hagi.

3.1. Lectura de la concentració del DNA

Per mesurar la concentració del DNA s'ha utilitzat un espectrofotòmetre Perkin-Elmer. Normalment es fa una dilució 1:20 de les mostres i es mesura la densitat òptica (D.O.) a 260 nm i a 280 nm de longitud d'ona. La mesura que ens dona a 260 nm és proporcional a la quantitat de DNA. Per calcular la concentració de DNA s'ha

de multiplicar el valor de la D.O.₂₆₀ per la dilució feta i per 50 (1 unitat de D.O. correspon a 50 µg/mL de DNA de doble cadena). La mesura del quocient D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ indica la proporció de proteïnes i per tant, la puresa del DNA. S'aconsella treballar amb DNAs de pureses entre 1,7 i 2.

3.2. Lectura de la concentració de l'RNA

La mesura de la concentració de l'RNA també es realitza a l'espectrofotòmetre i normalment es llegeix una dilució 1:50. En aquest cas, la mesura que ens dóna la D.O. a 260 nm és proporcional a la quantitat d'RNA. Per calcular la concentració d'RNA cal multiplicar el valor de D.O.₂₆₀ per la dilució feta i per 40 (1 unitat de D.O. correspon a 40 µg/mL d'RNA). La mesura del quocient D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ indica la proporció de proteïnes i per tant, la puresa de l'RNA. S'aconsella treballar amb RNAs de pureses $2 \pm 0,5$.

3.3. Càlcul de la concentració dels oligonucleòtids

Per tal de determinar la concentració a la que es troba un oligonucleòtid o *primer* es fa una dilució del mateix (en el nostre cas 1:200) i es llegeix la seva D.O. de la mateixa manera que en el cas del DNA genòmic. La concentració es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$(D.O._{260}) \times (\text{factor de dilució}) / (Y \times 10^{-6}) = [\text{pmol/l}]$$

On la Y és la suma dels pesos moleculars dels nucleòtids que componen el *primer*:

$$Y = (n^{\circ} \text{ A} \times 15200) + (n^{\circ} \text{ C} \times 7050) + (n^{\circ} \text{ G} \times 12010) + (n^{\circ} \text{ T} \times 8400)$$

4. AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTS MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'utilitza per amplificar *in vitro* un fragment de DNA existent entre dues regions de seqüència coneguda. S'utilitzen dos oligonucleòtids o *primers* com a encebadors per a una sèrie de reaccions sintètiques que són catalitzades per una DNA polimerasa. Aquests oligonucleòtids, amb seqüències diferents, són complementaris a la seqüència que volem amplificar i per una banda, pertanyen a cadenes oposades del motlle de DNA i per una altra banda,

limiten el fragment de DNA que es vol amplificar. El DNA motlle és primerament desnaturalitzat mitjançant calor i en presència d'un excés d'oligonucleòtids i dels quatre dNTPs. A continuació, la barreja de reacció es refreda a una temperatura que permeti la hibridació dels oligonucleòtids a les seves seqüències complementàries (temperatura d'*annealing*). Per últim, els oligonucleòtids encebadors permeten l'actuació de la DNA polimerasa. El cicle de desnaturalització, hibridació i síntesi de DNA es repeteix entre 30-35 vegades. Com els productes d'un cicle complet d'amplificació serveixen com a motlles pel següent, en principi cada cicle successiu duplica la quantitat del producte de DNA desitjat.

L'any 1988, Saiki *et al.*, van descriure la utilització de la tècnica de PCR de la DNA termoestable purificada a partir de la bactèria termòfila *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerasa). El fet que aquesta no resulti inactiva en l'etapa de desnaturalització (95°C) implica que no s'hagi de substituir al començament de cada cicle d'amplificació.

4.1. Disseny dels oligonucleòtids

L'encebament per part dels oligonucleòtids amb seqüències homòlogues presents en un gen o cDNA té una sèrie de consideracions que s'han de tenir en compte a l'hora de dissenyar un oligonucleòtid.

- a) La longitud de l'oligonucleòtid ha de tenir present la següent fórmula empírica: longitud = 18+1 base extra per cada 2% de baixada respecte al 50% G+C. Percentatges elevats d'A+T en molts casos no enceben adientment. Excedir-se en el percentatge G+C és també perillós perquè homologies accidentals amb regions riques G+C en el DNA motlle poden provocar amplificacions inespecífiques. El rang de G+C ha de ser del 40-60%.
- b) Provar l'oligonucleòtid dissenyat contra el DNA motlle per tal de detectar homologies internes o adjacents a les que es desitja amplificar.
- c) Comprovar els 10 últims nucleòtids (3'). Aquesta és la part més important de l'oligonucleòtid ja que és aquí on es comença la síntesi. És desitjable que aquesta zona tingui una composició equilibrada de G+C.

4.2. Amplificació a partir de DNA genòmic

Cada regió del genoma té unes característiques determinades i això fa que no existeixin unes condicions úniques d'amplificació sinó que aquestes, s'han d'ajustar en cada cas per tal d'obtenir la màxima eficàcia en cadascuna de les regions a analitzar. Tot i això, existeixen unes condicions estàndard d'inici que es modifiquen depenent del fragment a analitzar.

Afegir a un tub eppendorf de 200 µL els reactius següents:

- ◆ 1 µL de DNA.
- ◆ 0,75 µL de *primers* (10 pmol/µL).
- ◆ 3 µL d'una barreja equimolar dels quatre tipus de desoxinucleòtids (1,25 mM) (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs).
- ◆ 1,5 µL de tampó (10x) amb o sense magnesi segons el fragment a amplificar.
- ◆ 0,15 µL de l'enzim *Taq polimerasa* (Perkin-Elmer, Boehringer-Manheim).
- ◆ Clorur de magnesi (Cl₂Mg) si les condicions de la PCR ho requereixen o si el tampó no en porta.
- ◆ DMSO 50% (dimetil sulfòxid, Sigma) o qualsevol altre agent desnaturitzant si les condicions de la PCR ho requereixen.
- ◆ Aigua destil·lada fins a un volum final de 15 µL.
- ◆ La barreja d'aquestes substàncies es posa en un termociclador (Thermocycler 9700, 9600 ó 2400 Perkin-Elmer i Progene-Techne). Al tractar-se d'aparells amb tapa termoestable es suprimeix la gota d'oli mineral.

Les condicions de la reacció de PCR són les següents:

Desnaturització inicial	95° C durant 5 min
30-35 cicles de:	
Desnaturització	30-60 seg a 95° C
<i>Annealing</i> del <i>primer</i>	30-60 seg a la temperatura específica
Extensió	30-60 seg a 2 min a 72° C (1 min/KB)
Extensió final	72° C durant 5 min

La temperatura teòrica d'*annealing* de cada *primer* es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$[(n^{\circ} G + n^{\circ} C) \times 4 + (n^{\circ} T + n^{\circ} A) \times 2] - 4^{\circ} C$$

4.3. Amplificació a partir d'RNA total. Transcripció reversa

La transcripció reversa (RT-PCR) és un tècnica que ens permet retrotranscriure l'RNA a cDNA gràcies a la capacitat que l'enzim transcriptasa reversa té per copiar molècules d'RNA a DNA. Per obtenir cDNA a partir de l'RNA total s'ha utilitzat el *kit* comercial Taq Man[®] Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Inicialment, s'ha partit d'1 µg d'RNA total. Com a *primers* s'han utilitzat hexanucleòtids a l'atzar i com enzim la transcriptasa reversa. El protocol seguit ha estat el recomanat per la casa comercial. Un vegada obtingut el cDNA, s'ha realitzat una *nested*-PCR per amplificar els exons 30-34 del gen *ELN*, utilitzant els *primers* i condicions que figuren en la taula 3.

Taula 3. Seqüències dels *primers* utilitzats per amplificar el cDNA dels exons 30-34 del gen *ELN*, mides dels productes resultants i temperatures d'*annealing*.

*la temperatura d'*annealing* per aquest *primer* és de 10 cicles a 72°C seguit de 25 cicles a 52°C.

Seqüència <i>primer</i> (5'-3')	Mida (bp)	T ^a <i>annealing</i>
F GCTGGGCTCGGAGGACTCGGAGTC R1 ATTTTCTCTCCGGCCACA	241	72/52°C*
F GCTGGGCTCGGAGGACTCGGAGTC R2 CACCTGGGAAAATGGGAGAC	202	58°C

5. ELECTROFORESI DE DNA

Els fragments de DNA amplificats per PCR són analitzats mitjançant electroforesi en gels d'agarosa o d'acrilamida.

5.1. Electroforesi en gels d'agarosa/TBE/Bromur d'etidi

L'electroforesi en gels d'agarosa és un tècnica útil per a la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mides entre 100 pb i 25 Kb. La visualització dels fragments de DNA obtinguts s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel d'un colorant fluorescent que s'intercala entre les dues cadenes del DNA. Aquest colorant (en el nostre cas el bromur d'etidi) revela la presència d'una banda de DNA o RNA amb una fluorescència taronjada quan és il·luminat amb llum ultraviolada de longitud d'ona curta (310 nm). La tècnica és molt sensible i permet detectar en un gel 5 ng de DNA.

La resolució dels gels d'agarosa ve modulada per la seva concentració, d'aquesta manera es pot discriminar entre bandes de mides moleculars properes mitjançant un increment en la concentració d'agarosa. Per aquest treball s'han utilitzat de forma rutinària gels amb una concentració d'agarosa que oscil·la entre 0,7% i 4%. El pes molecular de les bandes obtingudes s'interpola sobre una recta de regressió realitzada mitjançant dades de migració electroforètica de bandes de pes molecular conegut, ja que la migració és proporcional al logaritme del pes molecular. S'ha utilitzat el marcador de pes molecular de 1 Kb (Gibco-BRL).

Preparació del gel

Per a gels d'entre 0,7-2% d'agarosa, l'agarosa utilitzada va ser Serva (Boehringer Ingelheim). En els gels de major concentració 3-4% s'ha utilitzat, a parts iguals, agarosa UltraPure (Gibco BRL) i agarosa de baix punt de fusió UltraPure (Gibco BRL).

◆ Fondre l'agarosa necessària en una solució que conté el tampó d'electroforesi (TBE 1x). Afegir a la solució atemperada, el bromur d'etidi necessari per tal d'arribar a una concentració final de 0,5 µg/mL. Aquest gel també es pot preparar

sense el bromur d'etidi realitzant, una vegada acabada l'electroforesi, una tinció submergint el gel en una solució de bromur d'etidi i aigua destil·lada.

- ◆ Dipositar l'agarosa fosa en un motlle amb la pinta corresponent la qual, formarà els pous on es carregarà la mostra una vegada l'agarosa estigui solidificada.
- ◆ Col·locar el gel en una cubeta d'electroforesi i afegir TBE 1x fins que quedi cobert.
- ◆ Preparar les mostres barrejant-les amb una solució de blau de bromofenol que ens servirà com a colorant i que proporcionarà pes a les mostres per tal que aquestes caiguin dintre del pou.
- ◆ Carregar les mostres juntament amb un marcador de pes molecular.
- ◆ Connectar al corrent tenint en compte que el DNA té càrrega negativa i que per tant, migrarà sempre des del pol negatiu al positiu.
- ◆ Visualitzar en un transil·luminador de llum ultraviolada.
- ◆ Fotografiar el gel.

Solucions

TBE 10x		Blau de bromofenol	
Tris	900 mM	Blau de Bromofenol	0,25%(BioRad)
Àcid Bòric (Merck)	720 mM	Sacarosa (Merck)	40%
EDTA	24 mM	Carregar 1:5; blau:mostra	
Ajustar pH 8,3 amb àcid acètic (Merck)			
TBE 1x: dilució TBE 10x 1:10			

5.2. Electroforesi en gels d'acrilamida

De la mateixa manera que amb els gels d'agarosa, la utilitat d'aquests gels és la de separar per mida les molècules de DNA quan aquestes estan sotmeses a un camp elèctric. Els gels d'acrilamida es fan servir quan la mida dels fragments que es pretén visualitzar és molt petita, o bé quan es vol separar fragments que es diferencien per un o molt pocs parells de bases. La manera de visualitzar el DNA en aquests gels pot variar depenent de la seva aplicació: tinció amb bromur d'etidi, radioactivitat, tinció amb nitrat de plata, quimioluminiscència o fluorescència.

Els gels d'acrilamida es poden realitzar en condicions desnaturalitzants o no desnaturalitzants, depenent de la tècnica que es realitzi. La temperatura a la qual la meitat de les molècules de DNA han passat al estat desnaturalitzat, es denomina temperatura de fusió (T_m) i varia segons el percentatge de G+C. Com major sigui aquest percentatge major és la T_m . Per desnaturalitzar el DNA es poden utilitzar diversos mètodes:

- ◆ Calor.
- ◆ Compostos químics: la urea i la formamida són agents desnaturalitzants perquè interfereixen reaccionant directament amb les bases impeding un correcte aparellament entre elles a temperatures a les que normalment estarien aparellades. La T_m es redueix proporcionalment amb la concentració d'agent desnaturalitzant. El formaldehid és un agent desnaturalitzant amb una acció irreversible, ja que estableix unions covalents amb els grups NH_2 de les bases impeding l'aparellament entre elles. A més, pot reaccionar amb el DNA a temperatura ambient. La renaturalització és un procés a l'atzar en el que les molècules desnaturalitzades no renaturalitzen amb els seus complementaris originals, sinó que ho fan amb qualsevol molècula present formant un híbrid estable. Aquest fenomen s'utilitza en diverses tècniques.

En general, el protocol de preparació d'aquests gels és el següent:

- ◆ Netejar bé, amb aigua i sabó, els vidres a utilitzar. Assecar i netejar-los vigorosament amb etanol absolut per tal d'evitar que quedin partícules de gels anteriors.
- ◆ Muntar els vidres amb els separadors adients i subjectar amb pinces (gels petits) o amb una goma (gels grans).
- ◆ Afegir a la solució d'acrilamida que volem utilitzar APS al 0,5% (Persulfat amònic, Rio-Rad) i TEMED també al 0,5% (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina, Bio-Rad).
- ◆ Carregar immediatament aquesta barreja entre els vidres utilitzant una xeringa i col·locar la pinta.
- ◆ Deixar polimeritzar a temperatura ambient (aproximadament 1 hora).
- ◆ Col·locar el gel en la cubeta d'electroforesi corresponent i afegir TBE 1x.

- ◆ Preequilibrar el gel a les condicions en les que es realitzarà l'electroforesi durant 15-20 min.
- ◆ Desnaturalitzar les mostres durant 2 min a 95°C amb el tampó de càrrega corresponent i mantenir-les en gel fins al moment de carregar-les. Aquest tampó pot contenir com a colorant blau de bromofenol únicament o barrejat amb xil·lè cianol (Bio-Rad).
- ◆ Es carreguen les mostres en el gel i es posa en marxa l'electroforesi.
- ◆ La solució d'acrilamida, el tampó de càrrega i les condicions d'electroforesi variaran segons l'estudi.

6. MANIPULACIÓ ENZIMÀTICA DEL DNA

Endonucleases de restricció

Les endonucleases de restricció són enzims purificats a partir de bacteris o fongs que presenten una marcada especificitat per a determinades seqüències curtes de DNA sobre les que actuen trencant els enllaços fosfodièster.

Cada enzim de restricció presenta uns requisits de força iònica i condicions de reacció determinats, és per aquesta raó que en cada cas particular s'ha seguit el protocol recomanat per la casa comercial. En general, es digereix el DNA a una concentració menor de 5-200 ng/μL, amb una relació d'aproximadament 3-5 unitats d'enzim per μg de DNA (sense sobrepassar una concentració de glicerol en la reacció del 5%) amb el tampó i la temperatura recomanats i durant 2-3 hores. Els productes de reacció s'analitzen en gels d'agarosa/TBE/br omur d'etidi.

Digestió de productes de PCR

Quan es tracta de productes de PCR es digereix 1-2 μg de DNA.

El protocol és el següent, tot i que existeixen variacions segons l'enzim de restricció:

- ◆ Preparar en un tub eppendorf el DNA a digerir.
- ◆ Afegir 1/10 part del tampó 10x específic per cada enzim de restricció.
- ◆ Afegir BSA (1/10 part) si així ho requereix l'enzim.

- ◆ Afegir 1U d'enzim de restricció.
- ◆ Completar amb aigua destil·lada fins al volum final desitjat.
- ◆ Incubar a la temperatura corresponent per a cada enzim de restricció durant 2 hores.

7. ANÀLISI MUTACIONAL DEL GEN ELASTINA (*ELN*)

7.1. Condicions de PCR dels 34 exons del gen *ELN*

La reacció de PCR en cada cas es va realitzar en un volum final de 15 µL que contenia: 1x Boehringer-Mannheim PCR *Buffer*, 5 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada *primer*, 1.5 mM MgCl₂, 1 U de Taq Polymerase Boehringer-Mannheim i 150 ng de DNA. Es van utilitzar els *primers* descrits per Tassabehji *et al.* (1997) i les condicions que es descriuen en la Taula 4.

Les condicions d'amplificació varen ser les següents:

Desnaturalització inicial	95° C durant 5 min
35 cicles de:	
Desnaturalització	1 min a 95° C
<i>Annealing</i>	1 min a la temperatura específica del <i>primer</i>
Extensió	1 min a 72° C
Extensió final	72° C durant 5 min

7.2. *Single Strand Conformation polymorphism analysis* (SSCP)

L'anàlisi mitjançant SSCP és una tècnica molt útil per a la detecció de mutacions puntuals. Aquesta es basa en la mobilitat de les cadenes de DNA a través d'un gel d'acrilamida en condicions no desnaturalitzants. Les cadenes de DNA adquireixen una conformació determinada depenent de la seva seqüència, de tal manera que un mateix fragment de DNA migrarà segons un patró de bandes determinat. Quan aquest sigui diferent serà indicatiu que en la seva seqüència existeix algun canvi, arribant-se a detectar fins i tot el canvi d'un parell de bases.

Les condicions utilitzades en aquesta tècnica són molt diverses, depenent del fragment que vulguem analitzar. En aquest treball hem utilitzat dos tipus de gels però sempre no radioactius.

7.2.1. Gels per SSCPs (20x20 cm)

S'ha partit d'una solució al 30% d'acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio -Rad).

Les condicions generals han estat:

Acilamida:Bisacilamida 30%	9,6-14%
TBE 10x	2,5 mL
Aigua dest. c.s.p.	25 mL
APS 10% (160 µL) i TEMED (16 µL)	

Preparació de les mostres

Es barregen 3-10 µL del producte de PCR (en funció del rendiment) i 10-15 µL de tampó de càrrega. Es desnaturalitzen les mostres a 96°C durant 5 min i es col·loquen en gel fins al moment de ser carregades en el gel d'acrilamida.

Tampó de càrrega

Blau de bromofenol	0,05%
Xil·lè cianol	0,05%
Formamida (Fluka)	95%
EDTA	20 mM

Les condicions d'electroforesi utilitzades en l'anàlisi d'SSCPs dels 34 exons del gen *ELN* han estat sempre les mateixes, 300 volts tota la nit i a 4°C de temperatura.

Taula 4. Seqüències dels primers utilitzats per amplificar els exons del gen *ELN*, mides dels productes resultants, temperatures d'*annealing* i condicions de la PCR per cadascun d'ells.

Exó	Seqüència primer (5'-3')	Mida (bp)	T ^a annealing	Condicions PCR %DMSO/[Cl ₂]
1	F CAGCCGACGAGGAGGCAACAATTAGGC R TCAGCGTCTAGTCACCTGCAAAGG	228	64° C	0 / 2
2	F TCCATGTAATTGTGGGTTTTGCC R CAATGTTCTACCTTCTGTAGTG	256	63° C	0 / 1,5
3	F CTTGCCCAAGGTCACGTAGTTAG R ATGAGGGAGTCCTTGATGCTCGG	262	67° C	0 / 1,5
4	F GGTGGATAAGTAGTAGATGGAT R AGGCTAATCGGTGTCCACACCTC	244	65° C	0 / 1,5
5	F TCCAGGAGACATTTCCCACTCTG R GGCAGTTGGTATCAGCATCAGTC	264	66° C	0 / 2
6	F AGGCAGGGCCAGAGCGTAGGAGT R AAGCCTGAGTTGAGGGAAGGTTC	252	69° C	0 / 1,5
7	F TACGCAATGCCTCACCTGTCCTG R TGCCCTCTGTCTCCAGCCCCAG	256	66° C	5 / 1
8	F TACGCAATGCCTCACCTGTCCTG R TGCCCTCTGTCTCCAGCCCCAG	256	66° C	5 / 1
9	F CTGCCTGGGTGGGAAGGGCTG R GGCCTTACTATGATGCCAGGCT	270	66° C	5 / 1,5
10	F GTTCCCAGCAGGGCCTGCAAGGC R GGCCCTGAGCCAGTCCAGGATCC	231	69° C	0 / 1,5
11	F CGCAGCATGCGATGACTGGTCTG R GGAGAAATGGGCAGGCTTGGAT	260	69° C	0 / 1,5
12	F GAGATTCAGGGAGTCCCTCGAAG R CACCCGGCCGAGTGGTGCATCTT	239	69° C	0 / 1,5
13	F TGGTGGGAGCCCAGCAAGGCATG R AGATTCCCCTCAAGACCCCAA	229	64° C	0 / 2
14	F AGTGTGATGTCTGCACAGATGAC R ACCAGGGTCTGGATGCAGGGGTG	225	64° C	0 / 1,5
15	F CTGAAGCTCCCATGTATACCCAC R GTTCAATAGTAATGGGAATGGAG	244	60° C	0 / 1,5
16	F CGTCTAAGTGGCCATCCTGCCTG R AGCCACAGAGGGTGAGGTCTTGG	239	69° C	0 / 1,5

17	F CTGGCGTGCCTGGGGCAATTCCTG R TTGCGGCTAGGGTCTCCGAGGTC	239	69° C	0 / 1
18	F ATACTCTACTAACCACCCCTTCTA R TGGCAATAGTCTCAATATTTCTC	270	59° C	0 / 1,5
19	F CACAGATGGGTAGACAGAGGGAT R AGTAGAGGAGGGTCCTTTAGTTC	219	67° C	0 / 1,5
20	F CTCTTTCCCAATCCATCAGCATC R CCCATCCCTTCTCAACCCATGTC	295	66° C	0 / 1,5
21	F GAGGTCGTATCCATGCCTTACAG R TCCAGGCCATTTTCAGTCTGGAG	253	60° C	5 / 2
22	F AAAGTGAGTACTGGGAGGGGCAA R CGACCTTGGTCAACTCCAGGGAC	207	69° C	0 / 2
23	F GTCCTGGAGTTGACCAAGGTCG R CCCAGAATGTGACAGCTTAAGTG	290	68° C	0 / 1,5
24	F AGCTTCTGTCCTCTTTGATCAGG R GGGCCCTCAGGCTCATTGACTC	252	69° C	0 / 1,5
25	F TGGCTCCCGGCATTGGCCCTGGTG R CCTGGCTGTTGCCCTAACCCAGC	238	66° C	5 / 1,5
26	F GGCATGCTCCCTGCCTGCTGTCG R CCCAGATGCTTAGGAGAACCTAA	311	61° C	5 / 1,5
27	F CAGCTTCAGGGCTTGGAGGAAGC R GTGACCACCCAGTCTGTGCTG	260	68° C	5 / 1,5
28	F AACACTCATTTTCCCTCCTCTCC R GCCTGGGGGCTGGCGGCAGCTC	290	68° C	0 / 1,5
29	F AACACTCATTTTCCCTCCTCTCC R GCCTGGGGGCTGGCGGCAGCTC	290	68° C	0 / 1,5
30	F CCATCGAAGGCCAGGGGAGACC R CCATCTCTGTCTCGCATAACAC	244	68° C	0 / 2
31	F GGTGGCATTGGCATTCTGAGCCG R BGTTAAGGAATGTCCAGACAAGAT	220	68° C	0 / 1,5
32	F TTCCTTAACCCAGAACCAGCAG R CCTTGTGTGGACATGGGCTCTGG	242	66° C	0 / 1
33	F CCAGACAGAGGTCTTGGGTGAGC R CCCTTCTGAGCAGGAGATGGCAC	233	68° C	5 / 2
34	F GGGATTAGAGCCGAAACT GAGAG R TTGCCCTGTGGATCTGCAAGCGC	258	67° C	0 / 1,5

7.2.2. Gels per SSCP's comercials (Amersham-Pharmacia)

Aquests gels venen preparats comercialment a una concentració d'acrilamida al 12,5% i per tant, les úniques condicions que podem modificar són el temps (1-4 h) i la temperatura d'electroforesi (5 o 15°C). S'han utilitzat els gels d'acrilamida Gene-Gel Excel 12.5/24 comercialitzats per la casa Amersham Pharmacia Biotech, especials per GenePhor.

Preparació de les mostres

Es barregen 3 µL del producte de PCR i 3 µL de tampó de càrrega desnaturalitzant (1:1). Una vegada les mostres estan desnaturalitzades a 95°C durant 5 min, ja estan llestes per a ser carregades al gel.

Tampó de càrrega

- 23,75 mL de formamida 99%
- 1,25 mL de solució de xil·lè cianol a l'1%
- 10 mg de blau de bromofenol
- guardar durant 12 mesos a 4-8°C

En aquest cas el tampó d'electroforesi utilitzat no és TBE1x sinó el que subministra el proveïdor en forma de tires de tampó, una pel càtode i una altra per l'ànode. Les condicions d'electroforesi emprades en aquest treball han estat sempre les mateixes, 1:45-2:30 hores i a 15°C de temperatura.

La tinció dels gels d'SSCP's (els comercials i els no comercials) s'ha realitzat mitjançant el mètode de tinció de nitrat de plata.

Protocol:

- ◆ 10 min en etanol al 10%. L'etanol fixa el DNA al gel.
- ◆ 3 min en àcid nítric (HNO₃) a l'1%. L'àcid nítric oxida el DNA.
- ◆ Dos rentats ràpids amb aigua destil·lada per tal d'eliminar l'excés d'etanol i d'àcid nítric.
- ◆ 20 min en nitrat de plata (AgNO₃) al 0,2%. El nitrat s'uneix al DNA oxidat.
- ◆ Dos rentats ràpids amb aigua destil·lada per tal d'eliminar l'excés de nitrat de plata.

- ◆ Revelat del nitrat de plata amb solució de carbonat sòdic (Na_2CO_3) més formaldehid (la solució es prepara afegint 29,6 g de Na_2CO_3 , 540 μL de formaldehid al 35% en 1 L d'aigua). El carbonat s'uneix al nitrat de plata i li proporciona una coloració marronosa. Així les bandes de DNA amplificades mitjançant la PCR i separades gràcies a l'electroforesi són visibles a simple vista.
- ◆ 10 min en àcid acètic al 10% per aturar la tinció.
- ◆ Preparar els gels per ser assecats banyant-los en glicerol 10% per tal d'eliminar les restes d'àcid acètic que podrien ocasionar problemes a l'assecador de gels.

8. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE PRODUCTES DE PCR

La seqüenciació és un procés que ens permet conèixer l'ordre dels nucleòtids en un fragment de DNA. Existeixen dos mètodes el químic i l'enzimàtic. En aquest treball s'ha utilitzat el mètode enzimàtic, mètode de terminació de cadena o dels dideoxinucleòtids desenvolupat per Sanger *et al.* (1992). Per a la reacció de seqüenciació es necessita gran quantitat de material genètic i això es pot aconseguir de dues maneres: subclonant el fragment d'interès en un plàsmid o bé, amplificant-lo per PCR. En el nostre cas s'han seqüenciat únicament productes de PCR utilitzant el *kit* de seqüenciació d-Rhodamine Terminator Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tanmateix, la seqüenciació s'ha realitzat de manera automàtica en un seqüenciador automàtic ABI3100. Els dideoxinucleòtids estan marcats amb fluoresceïnes diferents que són recollides pel làser de l'aparell i analitzades mitjançant un ordinador acoblat a l'equip. El marcatge amb fluorocroms ha permès eliminar la radioactivitat i automatitzar la última part del procés, és a dir, la manipulació del gel, fixació, assecat i autoradiografia.

Protocol:

- ◆ El producte de PCR és purificat mitjançant una columna (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) amb la finalitat d'eliminar els components de la reacció de PCR (sals, glicerol, ...).

- ◆ Una vegada purificat es corre una alíquota en un gel d'agarosa per tal de determinar la concentració del DNA.
- ◆ S'utilitza el *Kit* d-Rhodamine Terminator Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguint el protocol aconsellat pel fabricant:

DNA (30-90 ng)	1-5 µL
<i>Primer</i>	3,2 pmol
<i>Buffer Kit</i>	4-8 µL
Aigua dest. c.s.p.	20 µL

Les condicions de la reacció de PCR són:

Desnaturalització inicial	96° C 4 min
Seguida de 26 cicles de:	
Desnaturalització	96° C 10 seg
<i>Annealing</i>	50° C 5 seg
Extensió	60° C 4 min

- ◆ Una vegada acabada la reacció, el producte obtingut es precipita afegint 74 µL d'una solució d'etanol 70% i 0,5 µL de Cl₂Mg 1M. Es deixa 10 min a temperatura ambient i es centrifuga a 14000 rpm a 4° C durant 20 min.
- ◆ S'elimina el sobrenedant i es deixa a ssecar a temperatura ambient.
- ◆ Es ressuspèn en 12,5 µL de formamida i s'analitza en un seqüenciador automàtic ABI3100.

9. ANÀLISI MITJANÇANT MARCADORS MICROSATÈL·LITS

L'anàlisi genètic realitzat en aquest treball consisteix en estudiar la presència o absència, en una mostra de DNA de sang perifèrica, de múltiples regions (*loci*) localitzades dintre o properes a la regió de la SWB (7q11.23). Per això és necessari disposar de DNA del pacient del què es té una sospita clínica i dels seus progenitors. D'aquesta manera es pot fer un estudi de pèrdua d'heterozigositat (LOH) i determinar si existeix o no pèrdua de material en la regió 7q11.23 i per tant, si hi ha o no deleció SWB.

Els marcadors utilitzats en aquest treball han estat del tipus microsatèl·lit. Un microsatèl·lit és un regió genòmica amb un nombre variable de repeticions d'una agrupació d'una a sis parells de bases (habitualment CA). El nombre de repeticions d'aquesta seqüència és molt variable, de tal manera que tenen un contingut d'informació polimòrfica (PIC) més elevat (generalment superior a 0,7) que d'altres marcadors genètics utilitzats tradicionalment, com RFLP o VNTR. L'anàlisi dels microsatèl·lits es fa mitjançant PCR. Una PCR que utilitzi primers localitzats a ambdues bandes de la regió $(CA)_n$ genera bandes amplificades d'una mida molt polimòrfica.

Les condicions de la reacció de PCR són les següents:

Desnaturalització inicial	95°C durant 5 min
35 cicles de:	
Desnaturalització	40seg a 95°C
<i>Annealing</i>	1 min a la temperatura específica del <i>primer</i>
Extensió	40 seg a 72°C
Extensió final	72°C durant 5 min

9.1. Anàlisi mitjançant marcadors microsatèl·lits no marcats fluorescentment

Preparació de les mostres

Es barregen els productes a analitzar amb el tampó de càrrega corresponent i es desnaturalitzen durant 2 min a 96°C. Es col·loquen en gel fins al moment de carregar-los en una electroforesi d'acrilamida. Es carrega entre 3-6 µL de mostra en cada pou. Els microsatèl·lits no marcats fluorescentment utilitzats per aquest estudi i les seves característiques venen descrits en la Taula 5.

Preparació dels gels

La concentració d'acrilamida que s'ha utilitzat varia entre 5-6% depenent de la mida del fragment a analitzar. Partim d'una solució *stock* d'acrilamida:bisacrilamida 19:1 al 40% (BioRad).

Solucions:

Gel acrilamida 5%		Gel acrilamida 6%	
Acrilamida:bisacrilamida 40%	12,5MI	Acrilamida:bisacrilamida 40%	15 mL
Urea	47,6 g	Urea	47,6 g
TBE 10x	10 mL	TBE 10x	10 mL
Aigua dest. c.s.p.	100 mL	Aigua dest. c.s.p.	100 mL
Dissoldre a 50°C i guardar a 4°C		Dissoldre a 50°C i guardar a 4°C	
APS 10% (625 µL) i TEMED (62,5 µL)		APS 10%(625 µL) i TEMED(62,5µL)	

Normalment l'electroforesi es realitza fixant la potència a 80 watts (aproximadament 1500 volts). El temps d'electroforesi varia segons la mida del fragment (2 hores per un fragment de 150 bp).

9.2. Anàlisi mitjançant marcadors microsatèl·lits fluorescents

En aquest cas, un dels *primers* utilitzats en cada reacció de PCR està marcat fluorescentment. La reacció de PCR es realitza en les mateixes condicions que per als marcadors microsatèl·lits no fluorescents però les mostres s'analitzen en un seqüenciador automàtic ABI310 amb els programes *Genetic Analyser* o *Genotyoper*. L'avantatge d'aquests marcadors respecte als no marcats fluorescentment és que permeten automatitzar i simplificar el sistema d'anàlisi, a la vegada que tenen una major sensibilitat i faciliten un resultat més ràpidament. D'aquesta manera, substituïm els gels d'acrilamida per polímers que són injectats de forma automàtica en un capil·lar a través del qual, corren les nostres mostres de PCR.

Preparació de les mostres

1 µL del producte de PCR

12 µL de formamida desionitzada

0,5-1 µL de marcador (TAMRA 250 o 500) (Applied Biosystems, Foster City, USA)

desnaturalitzar les mostres a 95°C durant 4 min i col·locar-les en el seqüenciador ABI310.

La seqüència i característiques dels marcadors microsatèl·lits marcats fluorescentment que s'han utilitzat en aquests estudi estan descrits en la Taula 6.

Taula 5. Seqüències dels *primers* emprats per amplificar els marcadors microsatèl·lits no fluorescents utilitzats en l'estudi de pèrdua d'heterozigositat per a la SWB, la temperatura d'*annealing* i les condicions de PCR. En la taula també hi figura la mida del fragment amplificat i el percentatge d'heterozigositat (heter) de cada marcador. En negreta es marquen els que habitualment s'utilitzen en l'estudi diagnòstic de SWB.

*la temperatura d'*annealing* per aquest *primer* és 5 cicles a 65°C seguit de 32 a 53°C.

Marcador	Seqüència <i>primer</i> (5'-3')	Mida (bp)	Heter	T ^a <i>annealing</i>	Condicions PCR %DMSO/[Cl ₂ g]
D7S2516	F AACTGTATGCCTGTCCTGAGTC R GCTAACTATTCAAGGGTCACG	219-227	69	59°C	0 / 1,5
D7S653	F CCTAAGCAAGGGCGAT R TTCACCATCTGGACTTCCT	201-229	74	49°C	0 / 1,5
D7S672	F ACATGAAGGTCTACCAGTAGCC R CACTTTGGTTGGAGCAAGG	132-160	83	58°C	5 / 1
D7S489B	F CTGTTGACTTTCCCACACTC R GGCAACTCGAGACGTTAGTT	170-180	37	56°C	0 / 1,5
D7S2476	F GGGCAACATAGCACGATT R CAGGAGTCAGTTAGATAAAGTCA	144-160	64	65/53°C*	0 / 1,5
D7S1870	F TTCACTCAGGAAGTGGC R TGGTGATGTGCTTTACTACG	108-132	75	55°C	0 / 1,5
D7S613	F CAGCCTGGGTAACAAAAGC R CCTCCCTCCCTAATCCATG	85-145	75	55°C	0 / 1,5
D7S489A	F CTGTTGACTTTCCCACACTC R GGCAACTCGAGACGTTAGTT	140-150	37	56°C	0 / 1,5
D7S2490	F TGTAAGCCACCGCACCT R AGCACCCGGCATAGATGT	134-156	64	57°C	0 / 1
D7S2518	F TTTGATAAAAACAAGCAAAAG R CAAAAGTAGCATCTGGGA	139-159	77	57°C	5 / 1,5
D7S2470	F GACAATTTCCCATCTGACCA R TCCTAAACTTCCAGGGGC	230-238	75	56°C	0 / 1,5
D7S2421	F TGCCACTCATTCCATC R TGTGAGGCTAATGTACCG	92-102	78	57°C	0 / 1

Taula 6. Seqüències dels primers utilitzats per amplificar els marcadors microsatèl·lits marcats fluorescentment utilitzats en l'estudi de pèrdua d'heterozigositat per a la SWB, la temperatura d'annealing i les condicions de PCR. En la taula també hi figura la mida del fragment amplificat i el fluorocrom (fluoro) utilitzat en cada cas. En negreta es marquen el que habitualment s'utilitzen en l'estudi diagnòstic de SWB.

Marcador	Seqüència primer (5'-3')	Mida (bp)	Fluoro	T ^a Annealing	Condicions PCR %DMSO/[Cl ₂ g]
D7S489B	F CTGTTGACTTTCCCACACTC R GGCAACTCGAGACGTTAGTT	170-180	FAM	56°C	0 / 1,5
D7S2476	F GGGCAACATAGCACGATT R CAGGAGTCAGTTAGATAAGGTCAC	144-160	HEX	65/53°C*	0 / 1,5
D7S1870	F TTTACTCAGGAAGTGGC R TGGTGATGTGCTTTACTACG	108-132	TET	55°C	0 / 1,5
D7S613	F CAGCCTGGGTAACAAAAGC R CCTCCCTCCCTAATCCATG	85-145	FAM	55°C	0 / 1,5
D7S489A	F CTGTTGACTTTCCCACACTC R GGCAACTCGAGACGTTAGTT	140-150	FAM	56°C	0 / 1,5
AC005102-GA	F GGACGACAAAGCAAGATTCC R AAGTTACGGATGTAAGGGCTTTT	210-270	FAM	56°C	0 / 1,5
AC005102-GT	F GGTGGATCTGGGAGGTGTTA R TCACATTCCTGCTCCAAATG	192-212	TET	60°C	0 / 1,5
AC006330-CA1	F CCATCCTGGGTGATAAGAGC R CAAGGGATCTTTCCCTCCTC	163-173	TET	62°C	0 / 1,5
AC006330-CA2	F GGGTGACAAGAGCGAAACTC R TTTCAGGTTTGCAAGATGGA	210-230	HEX	66°C	0 / 1,5
AC005077-GT2	F CTCTAGCACAGGGCCAAGTC R GCCTGGGCAATAAGAGTGAA	220-230	TET	62°C	0 / 1,5
AC006388-GT	F TTTGGAGCTGTGGCATGTAG R ACGCGTTTTGGTCATCATTT	195-213	HEX	58°C	0 / 1,5
D7S1816	F GGGACTACAGGTGCCTGC R AACTGAGGCTCCACAAAGTG	118-222	FAM	56°C	0 / 1,5

10. ESTABLIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS

10.1 Cultiu de limfòcits

Per establir el cultiu es necessiten 0,8 mL de sang perifèrica del pacient (recollida en heparina sòdica, mai amb EDTA) que s'afegeixen a un flascó estèril en el que prèviament hi hem posat:

8 mL RPMI 1640 (GIBCO)

1 mL Sèrum fetal boví (GIBCO)

0.2 mL Glutamina (GIBCO)

0.15 mL Fitohemaglutinina (GIBCO)

Un cop establert el cultiu es deixa 72 hores a l'estufa de 37°C. És preferible utilitzar una incubadora de CO₂ (5% de CO₂ i 90% d'humitat) i deixar mig oberts els flascons per afavorir l'entrada del gas.

10.2. Cultiu de fibroblasts

Es practica una biòpsia de pell al pacient i un cop al laboratori i sota campana de flux laminar horitzontal, s'aboca la mostra en una placa de Petri estèril on es renta varies vegades amb medi RPMI per tal d'eliminar possibles restes hemàtiques. Després, amb un bisturí es talla la mostra fins a obtenir trossos no gaire petits. Aquests es dipositen, amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur de vidre, sobre la paret humida del flascó. Aquesta al estar humida ajuda a que els trossos de teixit s'hi enganxin. Tot seguit i vigilant no tocar els fragments de teixit enganxats, s'afegeixen 20 mL de medi RPMI (que conté sèrum fetal boví al 40%, L-glutamina 0,2 mol/L, penicil·lina 100 U/mL i sulfat d'estreptomicina 100 µg/mL). Es deixa el flascó a l'incubador de CO₂ (5% CO₂ i 90% humitat) durant 4-16 h sense que el medi toqui els fragments; passat aquest temps, es dona la volta al flascó suaument per evitar que els trossos de teixit es desenganxin i es deixa en l'incubador durant 5 dies. A partir del cinquè dia es realitzen canvis de medi cada dos dies fins que comencem a veure creixement. S'observarà com els fibroblasts comencen a aparèixer pels marges dels fragments adherits al flascó i van envaint tota la superfície.

11. HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

La tecnologia de FISH és una metodologia que està a cavall entre la citogenètica convencional (estudi de cariotips construïts a partir de les mides dels cromosomes i del seu patró de bandes G o R) i la genètica molecular, i que es va desenvolupar a mitjans dels anys 80 (Pinkel *et al.*, 1986). Aquesta tècnica consisteix en marcar amb molècules de biotina o digoxigenina, o bé directament amb nucleòtids conjugats a un fluorocrom, un fragment de DNA de la regió genòmica que es vol estudiar. Després d'un procés de desnaturalització per calor, aquest fragment s'hibrida sobre cromosomes, nuclis interfàsics o teixits, tot aprofitant l'afinitat que tenen entre elles les cadenes de DNA. Posteriorment, en el cas d'un marcatge indirecte, mitjançant incubacions amb anticossos o haptens conjugats a fluorocroms que s'uneixen amb elevada afinitat a les molècules incorporades al DNA en el procés de marcatge, s'arriba a l'observació al microscopi d'epifluorescència. D'aquesta manera es pot localitzar el senyal fluorescent generat per la sonda marcada i hibridada o pels anticossos. L'eficàcia de la tècnica de la FISH depèn de factors estrictament tècnics com poden ser, l'astringència dels rentats, el bloqueig de les seqüències repetitives, la mida de la sonda, etc. Aquesta tècnica a més del mapatge cromosòmic de qualsevol tipus de sonda, també permet detectar pèrdues o guanys de DNA, reordenaments cromosòmics per petits que siguin i arribar fins al punt de trencament d'aquests, amb una eficàcia i fiabilitat altíssimes.

En el cas de la SWB, aquesta tècnica s'ha emprat per tal de posar de manifest la pèrdua de material cromosòmic en la regió 7q11.23 en els pacients amb sospita clínica de SWB.

Amb aquesta finalitat, s'ha utilitzat una sonda comercial *locus* específic (LSI Williams Syndrome Region Probe, Vysis) que hibrida sobre la banda 7q11.23, *loci* *ELN*, *LIMK*, i *D7S613* (Spectrum Orange) i sobre una regió control situada a la banda 7q31, *loci* *D7S486* i *D7S522* (Spectrum Green) del cromosoma 7 humà. El marcatge d'aquesta sonda és dual perquè a l'hora de visualitzar-la al microscopi d'epifluorescència obtenim una senyal vermella (corresponent a la regió crítica de la SWB) i una altra de verda que correspon a la regió control (Figura 4).

11.1. Preparació del substrat d'hibridació

Per tal d'obtenir un substrat cromosòmic per a l'estudi de FISH, s'ha de partir de mostres de sang perifèrica dels pacients extreta en tubs d'heparina sòdica. El protocol seguit per obtenir els cromosomes metafàsics es basa en la inhibició de la formació del fus acromàtic quan la cèl·lula entra en divisió, la lisi de les membranes per xoc hipotònic i la seva fixació.

Amb la mostra de sang del pacient es fa un cultiu de limfòcits (veure apartat 10.1 de material i mètodes) i a partir d'aquest es segueix el següent protocol:

- ◆ Aturar el cultiu afegint-hi 0,1 mL de colcemid (GIBCO) (concentració final de 0,01 µg/mL), en condicions estèrils, i deixar el flascó novament a l'estufa durant 1h 15 min.
- ◆ Es traspasa el cultiu a un tub de plàstic i es centrifuga a 1600 rpm durant 8 min.
- ◆ Es treu el sobrenedant i es ressuspen el botó cel·lular suaument.
- ◆ S'afegeixen 8 mL de xoc hipotònic (KCl 0,075 M, escalfat a 37°C al bany maria) gota a gota i agitant.
- ◆ S'incuben els tubs amb la solució hipotònica durant 20 min a 37°C per tal de produir un xoc hipotònic i trencar les membranes.
- ◆ Es centrifuga a 1600 rpm durant 8 min.
- ◆ Treure el sobrenedant i es ressuspendre el botó cel·lular.
- ◆ S'afegeixen 6 ml de solució fixadora carnoy gota a gota i en agitació per evitar la formació d'agregats.
- ◆ Es centrifuga a 1600 rpm durant 8 min.
- ◆ Es treu el sobrenedant i es ressuspen el botó cel·lular amb l'agitador.
- ◆ S'afegeix 4 ml de solució fixadora.
- ◆ Es centrifuga a 1600 rpm durant 8 min.
- ◆ S'afegeix 1 mL de fixador.
- ◆ Es centrifuga a 1600 rpm durant 8 min.
- ◆ Es treu el sobrenedant i es ressuspen el botó cel·lular amb l'agitador i s'afegeixen unes gotes de fixador fresc fins assolir la dilució adient.

- ◆ El sediment de cèl·lules fixades es pot guardar en solució fixadora a -20°C per un període gairebé indefinit.

Solucions:

Solució hipotònica

KCl 75 Mm

Guardar a temperatura ambient màx. 15 dies

Solució fixadora carnoy

Metanol:àcid acètic (3:1)

Solució extemporània

Per a l'obtenció de preparacions cromosòmiques se segueixen els següents passos:

- ◆ Es netegen els portaobjectes i es deixen fins l'endemà en una solució HCl/etanol (5%/95%).
- ◆ Es passen a etanol i s'eixuguen amb paper de cel·lulosa.
- ◆ S'entelen amb l'alè i es deixa caure una gota de la mostra. S'ha de procurar que la gota s'escampi bé.
- ◆ S'elimina l'excés de fixador amb paper de filtre.
- ◆ S'observa al microscopi de contrast de fase per a comprovar la qualitat.

Inicialment, es preparen 2 portes per a cada cultiu i es guarda la resta de la dilució en un tub al congelador. Les preparacions s'han d'envel·lar una nit a 37°C i si s'han de guardar més temps, s'han de posar al congelador a -20°C .

11.2. Hibridació, detecció i observació al microscopi d'epifluorescència

Amb les extensions obtingudes després del cultiu es realitza la tècnica de la FISH seguint el protocol aconsellat pel fabricant de la sonda:

- ◆ Desnaturalització de les preparacions cromosòmiques en una solució 70% formamida/2xSSC durant 5 min en un bany a 73°C .
- ◆ Deshidratació a través d'una sèrie d'etanols (70%, 85% i 100%) durant un minut en cada solució.
- ◆ Desnaturalització de la barreja d'hibridació (2 μL d'aigua destil·lada, 1 μL de la sonda i 7 μL del seu corresponent tampó) durant 5 minuts en un bany a 73°C .
- ◆ Aplicar els 10 μL de la barreja d'hibridació sobre una àrea de les extensions cromosòmiques. Cobrir-ho amb un cubreobjectes i segellar-ho amb cola de papereria.
- ◆ Incubar en una cambra humida a 37°C durant 16 hores.

Després de la hibridació es retira el cubreobjectes i es fan dos rentats per tal d'eliminar l'excés de sonda. El primer d'ells es realitza en una solució de 0,4xSSC/0,3% NP-40 dintre d'un bany a 73°C i durant 2 minuts. Posteriorment se'n fa un altre a temperatura ambient en una solució de 2xSSC/0,1% NP-40 i durant un minut.

Solucions:

20xSSC		70% formamida/2xSSC	
CiNa (Merck)	175,3 g	Formamida (Fluka)	49 mL
Citrat Trisòdic (Merck)	88,2 g	20xSSC(pH 5,3)	7 mL
Aigua destil·lada fins	1000 mL	Aigua destil·lada	14 mL
Ajustar pH a 5,3 amb HCl		Ajustar pH a 7,0-8,0	
0,4xSSC/0,3% NP-40		2xSSC/0,1% NP-40	
20xSSC (pH 5,3)	20 mL	20xSSC (pH 5,3)	100 mL
NP-40 (Vysis)	3 mL	NP-40	1 mL
Aigua destil·lada fins	1000 mL	Aigua destil·lada fins	1000mL
Ajustar pH a 7,0-7,5 amb NaOH		Ajustar pH a 7,0-7,5	

Abans de l'observació al microscopi d'epifluorescència, es procedeix al muntatge de les preparacions amb 10 µL solució DAPI (Vysis). El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo) és un intercalador del DNA que s'uneix amb especial afinitat a les regions riques en AT i que emet una fluorescència de color blau quan és excitat a 450 nm. Aquesta solució es posa per tal d'aconseguir un patró de bandes dels cromosomes i així, poder-los estudiar a la vegada que s'estudien els senyals fluorescents.

Per a la interpretació dels resultats s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència (Leica DMRXA) que està equipat amb un joc de quatre filtres: 1) DAPI (emissió a 365 nm), 2) FITC (emissió a 450 nm) per poder veure la senyal marcada en verd, 3) RITC (emissió 570 nm) per veure la senyal vermella i 4) el triple filtre que ens permet veure els tres colors a la vegada.

La sonda fluorescent emet una llum d'intensitat de moderada a brillant quan és excitada a la corresponent longitud d'ona, que s'aprecia tan en nuclis interfàsics com en cromosomes metafàsics. En nuclis de cèl·lules normals, sense la deleció, generalment apareixen quatre senyals diferents (dues verdes i dues vermelles) i sobre metafases normals, es poden arribar a veure entre dues a quatre senyals en el mateix cromosoma. En canvi, en nuclis o metafases de pacients amb la deleció només s'aprecia una senyal corresponent a la regió SWB, mentre que de la senyal control se'n veuen dues.

RESULTATS

CAPÍTOL 1

CARACTERITZACIÓ DELS PACIENTS AMB SOSPITA CLÍNICA DE SÍNDROME DE WILLIAMS

El plantejament d'aquest estudi ha estat el de caracteritzar molecularment i clínica els pacients amb diagnòstic de SWB. Per això tots els casos inclosos en aquest treball han tornat a ser avaluats per tal de confirmar el seu diagnòstic tant molecular com citogenètic.

1.1. CONFIRMACIÓ DIAGNÒSTICA

Els resultats que s'exposen han estat obtinguts a partir de 200 individus amb sospita clínica de SWB. Tots ells, clínicament presenten trets fenotípics que recorden els de la síndrome (retard mental, personalitat característica, trets facials dismòrfics o anomalies cardiovasculars).

A cadascun d'ells se'ls ha realitzat un cariotip, una prova de FISH i un estudi molecular de pèrdua d'heterozigositat amb la finalitat de poder aprofundir en l'estudi dels diferents individus i de les seves delecions.

Cariotip:

Del 200 individus inclosos en aquest treball, en 50 casos l'estudi del cariotip s'ha realitzat en el mateix Servei de Genètica de l'Hospital Clínic. En la resta, aquest ja havia estat dut a terme per professionals de l'hospital de procedència del pacient.

Els resultats obtinguts posen de manifest una fórmula de 46,XX per 22 dels casos i de 46,XY en els 28 restants.

En cap d'ells s'ha detectat alteració que pugui fer pensar en la possibilitat d'una fenocòpia de la SWB. Tanmateix, tampoc s'ha pogut confirmar l'existència de la deleción perquè la mida d'aquesta està per sota dels límits de resolució de la tècnica.

Estudi per FISH:

Aquest estudi s'ha practicat en 165 mostres, posant-se de manifest la deleción en 62 dels casos. En els 35 casos restants no s'ha pogut realitzar aquesta prova perquè la mostra rebuda ha resultat ser inadequada.

Estudi molecular de pèrdua d'heterozigositat:

L'estudi de pèrdua d'heterozigositat ha estat realitzat en 181 casos, dels quals es disposava de mostra del pacient i dels dos progenitors.

En tots ells, s'ha estudiat la segregació de quatre marcadors microsatèl·lits situats en la regió comunament delecionada (D7S1870, D7S613, D7S2476 i D7S489B), posant-se de manifest la deleció en 60 dels casos.

En els 19 casos restants no s'ha rebut mostra d'alguns dels progenitors i per tant no s'ha pogut dur a terme aquest estudi molecular.

Gràcies al fet de realitzar ambdues tècniques (molecular i FISH), tots els 200 casos amb sospita clínica de SWB han pogut ser diagnosticats.

A part dels 200 casos inclosos en aquest estudi, també s'han realitzat 7 estudis prenatals, un d'ells gemelar, en famílies en les que prèviament, ja s'havia diagnosticat un membre afecte de SWB. Tots ells han pogut ser estudiats molecularment i per FISH i els resultats obtinguts no demostraven pèrdua de material en la regió SWB per a cap d'ells.

1.2. CASUÍSTICA I CLASSIFICACIÓ DELS PACIENTS

Entre tots els 200 casos estudiats, 70 han estat confirmats com a positius mitjançant alguna de les dues tècniques emprades mentre que, en els 130 restants no s'ha posat de manifest la deleció de la regió 7q11.23. Això representa que només un 35% del casos rebuts amb sospita clínica de SWB realment presentaven la deleció.

Pel que fa als casos confirmats com a positius, 52 han estat diagnosticats a través de les dues tècniques utilitzades, 10 només s'han pogut valorar amb el resultat de la FISH ja que molecularment no han estat informatius (5 dels casos) o degut a que no s'ha pogut realitzar l'estudi molecular per falta de mostra (els altres 5), i els 8 restants només tenen resultat positiu per molecular perquè el material que va arribar per la FISH va resultar inadequat (Taula 7). No s'ha trobat cap cas en els que els resultats obtinguts mitjançant les dues proves fossin discordants.

Dels 70 casos positius, 39 són dones (55,7%) i 31 homes (44,3%), amb edats compreses entre l'any i els 33 anys, essent la majoria dels casos diagnosticats en la primera dècada de vida. És remarcable el fet que en 6 casos la confirmació diagnòstica s'ha obtingut quan el pacient ja era major d'edat i fins i tot superava la vintena d'edat.

Taula 7. Recull i classificació dels resultats obtinguts a partir dels casos rebuts amb sospita clínica de SWB i estudiats mitjançant les tècniques de FISH i de pèrdua d'heterozigositat (estudi molecular). En negreta es ressalta el nombre de casos que han estat confirmats com a positius (70 en total) d'entre els 200 estudiats.

		Estudi molecular				
		POSITIU	NEGATIU	NO INFORMATIU	ESTUDI NO FET	TOTAL
Estudi FISH	POSITIU	52	0	5	5	62
	NEGATIU	0	84	5	14	103
	ESTUDI NO FET	8	27	0	0	35
	TOTAL	60	111	10	19	200

L'estudi molecular també ha permès valorar la incidència de falses paternitats dintre de la població seleccionada ja que, entre les 171 famílies en les que s'han pogut realitzar l'estudi de pèrdua d'heterozigositat i que aquest ha resultat ser informatiu, s'han detectat 3 casos de falses paternitats. Dos d'ells han estat trobats en pacients en els que s'ha demostrat l'existència de la deleció SWB (Figura 15). En aquests casos, a part de confirmar la sospita amb un estudi de segregació per altres marcadors microsatèl·lits situats en diferents regions cromosòmiques del genoma, s'informa al metge sol·licitant. Abans d'informar a la família, es recomana al facultatiu repetir la prova per tal de descartar possibles errors de mostra.

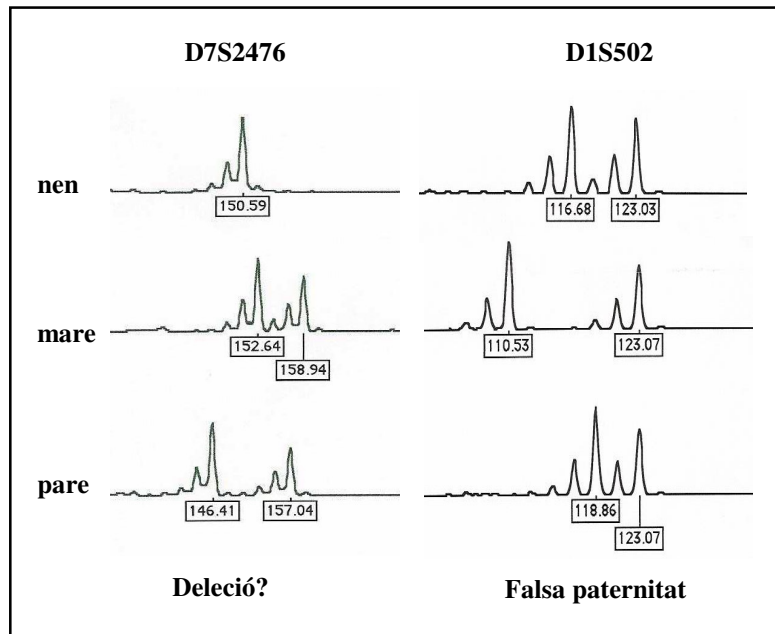


Figura 15. La figura mostra un exemple de falsa paternitat trobat en un cas amb sospita clínica de SWB en el que la deleció, d'origen matern, es confirma al estudiar l'heretabilitat pel marcador microsatèl·lit D7S2476 situat dintre de la regió comunament delecionada. Davant d'un resultat d'aquest tipus es comprova la sospita estudiant altres marcadors situats en diferents regions del genoma, en aquest exemple D1S502, on es demostra que el nen hereta un al·lel (116,68) que no prové del seu pare.

1.3. CARACTERITZACIÓ DE LES DELECIONS

Per tal de conèixer i acotar els límits de les delecions que presenten els diferents pacients confirmats com afectes de SWB, s'ha ampliat l'estudi de pèrdua d'heterozigositat fins a un total de deu marcadors microsatèl·lits que es troben localitzats pròximament a la zona comunament delecionada (Figura 16). L'ordre i posició d'aquests ha estat extret de la base de dades d'Ensembl Human Genome Browser" (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?).

Amb aquesta finalitat, els pacients seleccionats per a l'estudi han estat tots aquells als que la sospita clínica de SWB havia estat prèviament confirmada molecularment o per FISH i dels que es disposava de DNA de tota la família (afecte i progenitors). Del total de 70 pacients confirmats com a SWB s'ha pogut realitzar aquest estudi de pèrdua d'heterozigositat en 65 dels casos.

Les figures 17 i 18 mostren un esquema dels resultats obtinguts.

L'interval comunament delecionat en la majoria de pacients es troba localitzat entre els marcadors D7S489B (límit centromèric i a 72 Mb de distància al centròmer) i D7S1870 (límit telomèric, 73,5 Mb al centròmer). Aquesta regió abarca aproximadament 1,5 Mb.

En un dels pacients (cas nº29) el límit centromèric de la delecio no ha pogut ser establert amb els marcadors escollits, mentre que en uns altres tres (individus nº25, 31 i 59) el que no s'ha pogut delimitar ha estat el punt telomèric. A part d'aquest cas nº29, tota la resta d'individus presenten unes delecions que no s'estenen més enllà del marcador D7S2516. La majoria però, i a excepcio dels casos 5, 19, 35 i 54, han pogut ser acotades abans amb els marcadors D7S672 o D7S653 que es troben situats molt pròximament i a 71,2 Mb del centròmer (Figura 16). Per això, el límit centromèric de tots ells ha tornat a ser estudiat amb una nova seleccio de marcadors polimòrfics (veure apartat 1.3.1 dels resultats).

Pel que fa al límit telomèric, existeixen dos casos (pacients nº 1 i 20) en els que el primer marcador que mostra una herència biparental és el D7S2421. Aquests dos individus, juntament amb els altres tres als que no s'ha pogut acotar la delecio amb els marcadors escollits, han estat estudiats amb uns altres de nous (veure apartat 1.3.1 dels resultats).

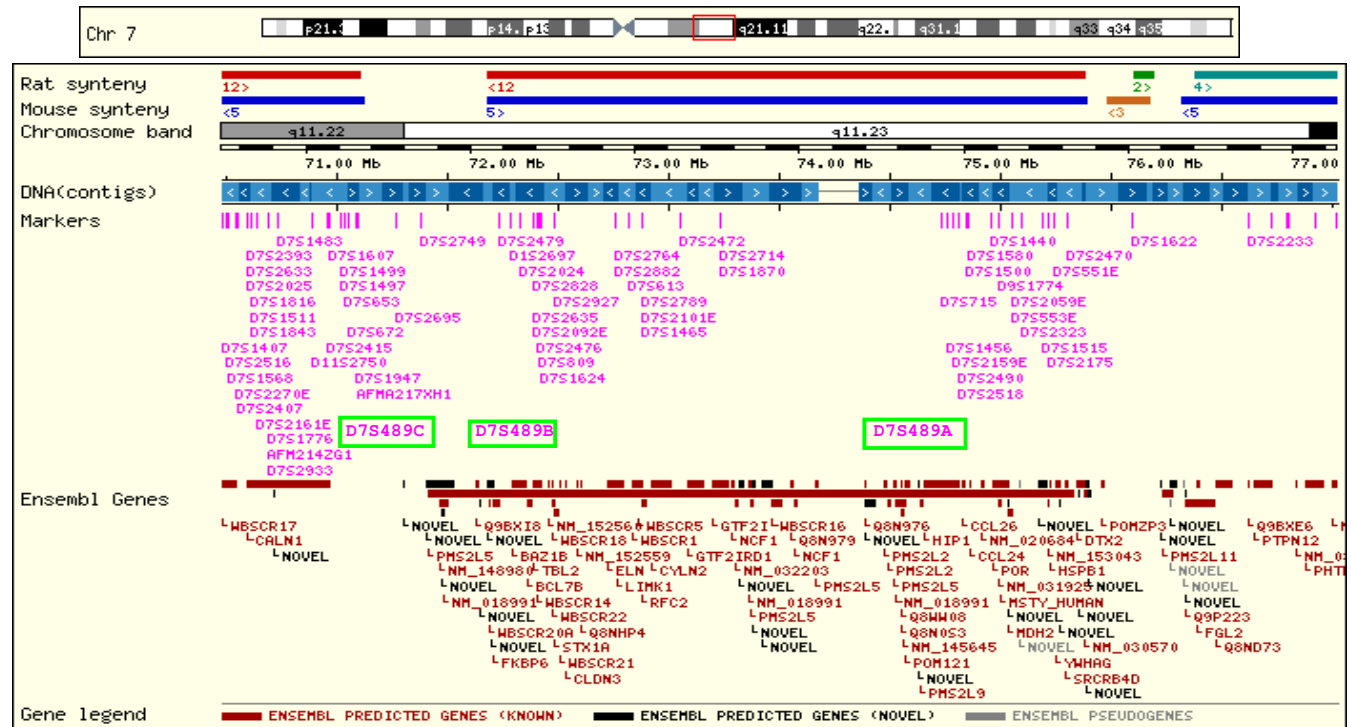


Figura 16. Ideograma del cromosoma 7. Amb un rectangle vermell es marca la regió 7q11.23 i un tros de la 7q11.22 que estan ampliades en l'esquema de sota on hi figuren tots els marcadors i gens que es localitzen en la zona. Emmarcats amb verd es ressalten els marcadors microsatèl·lits que en un primer moment s'han utilitzat per tal d'acotar les delecions dels pacients SWB. El marcador D7S2421 (7q21.11) no hi figura perquè es troba situat fora de la regió representada. (<http://www.ensembl.org>)

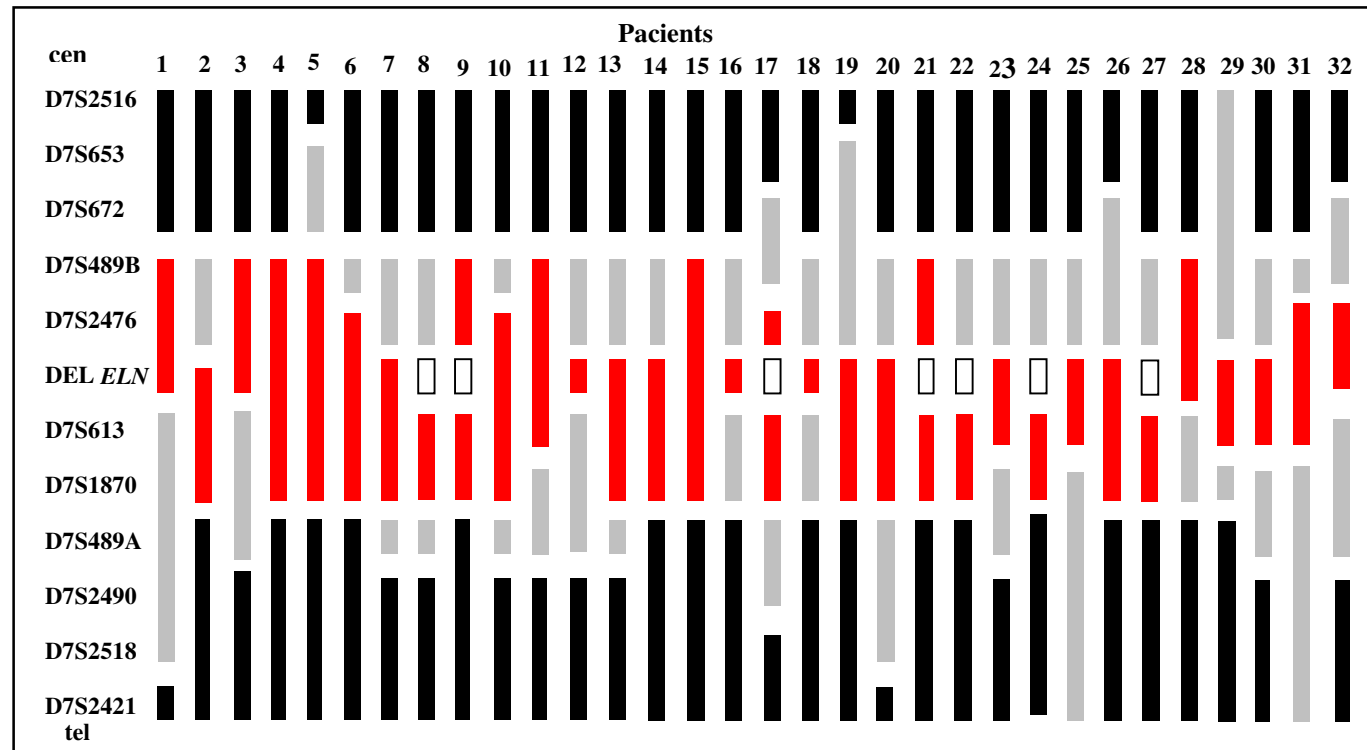


Figura 17. Esquema dels resultats obtinguts en l'estudi de LOH en els 32 primers pacients amb deleció de la regió SWB. A l'esquerra hi figuren els marcadors utilitzats (ordenats des del més centromèric fins al més telomèric) i el resultat obtingut en la tècnica de la FISH (del *ELN*). En color vermell es representa la zona delecionada en cada pacient, en gris es marquen els marcadors que han resultat ser no informatius i en negre es senyala la regió que mostra una herència biparental. El rectangle blanc indica els casos en els que no s'ha pogut fer FISH.

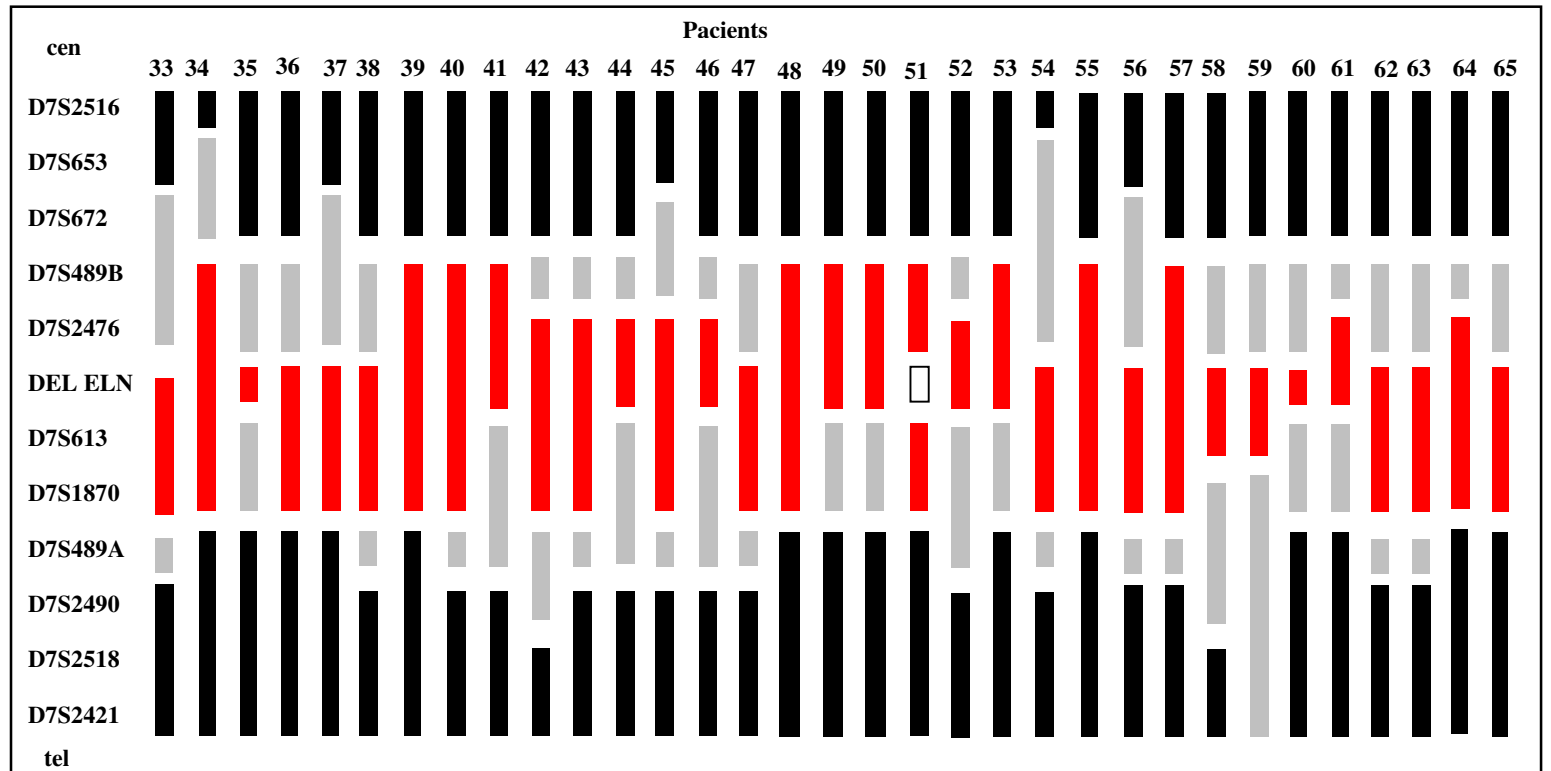


Figura 18. Esquema del resultats obtinguts en l'estudi de LOH en els altres 33 pacients amb deleció de la regió SWB. Els colors tenen el mateix significat que els de la figura anterior.

1.3.1. Ampliació de l'estudi de pèrdua d'heterozigositat

En aquells quatre pacients en els que els límits centromèric i telomèric de la deleció no han pogut ser definits amb els marcadors que en un principi s'han seleccionat, s'ha ampliat l'estudi de pèrdua d'heterozigositat per tal d'acabar d'acotar -les. Per això s'han escollit nous marcadors microsatèl·lits tant per a l'extrem centromèric com telomèric del punt de trencament. A l'hora de fer aquesta selecció s'ha intentat que aquests estiguessin situats propers als ja estudiats i a ser possible, a prop dels que delimiten la deleció. No obstant, això no ha estat possible degut a que aquesta zona es troba al voltant dels fragments repetitius que flanquegen la regió SWB. Per tant, s'han hagut d'escollir marcadors polimòrfics contigus als ja estudiats. Tot i així, també s'ha pogut delimitar les delecions dels casos no informatius i reavaluar aquelles que havien estat acotades per un marcador llunyà.

Extrem centromèric

Per a l'estudi d'aquest extrem s'ha escollit el marcador D7S1816, el qual es troba situat just després del D7S653 i del D7S672 (Figura 16). Amb aquest marcador s'ha estudiat l'únic pacient (cas nº29) del qual no s'havia pogut obtenir un resultat informatiu per al marcador D7S2516. El resultat obtingut amb aquest nou microsatèl·lit ha permès posar de manifest una d'herència biparental i d'aquesta manera, s'ha aconseguit acotar la deleció en aquest punt.

A part, també s'han tornat a repassar aquells casos on el primer marcador que mostrava una herència biparental era el D7S2516. D'aquesta manera, també s'ha pogut demostrar que la deleció en ells no s'estén més enllà del microsatèl·lit D7S489B.

Extrem telomèric

En aquest cas s'han seleccionat dos marcadors més (5102 i 5102GT) tots dos situats just després del marcador D7S2518 però encara dintre de la banda cromosòmica 7q11.23. D'aquesta manera, les delecions dels pacients nº 25, 31 i 59, que no havien pogut ser delimitades anteriorment, han estat acotades en aquest punt ja que el resultat obtingut ha posat de manifest una herència biparental per a tots els casos.

Amb aquests mateixos marcadors també s'ha tornat a estudiar el límit telomèric de la deleció dels pacients nº 1 i 19. Ambdós mostraven una deleció acotada a nivell del marcador D7S2421 però com que per als anteriors no s'havia pogut obtenir un resultat informatiu, existia la opció que la deleció s'estengués més enllà del marcador D7S1870, l'últim que telomèricament es delecta en els pacients clàssics de SWB. Amb els resultats obtinguts s'ha pogut posar de manifest una deleció de mida superior a les normalment descrites en el pacient nº 1, mentre que per al cas nº 19 el resultat obtingut per aquests marcadors ha estat de no deleció.

1.3.2. Caracterització de la deleció de mida superior a les comunament descrites

Posteriorment, un total de sis nous marcadors polimòrfics han estat seleccionats i utilitzats per tal de veure fins on arriba la deleció d'origen matern detectada en el pacient nº 1. Els resultats obtinguts han permès demostrar que aquesta s'estén des del marcador D7S489B (72 Mb del centròmer) fins al D7S2470 situat a 75,60 Mb del centròmer i que per tant, l'individu presenta una deleció amb una mida de com a mínim 3 Mb (Figura 19).

Aquesta pacient va ser diagnosticada de SWB quan tenia 17 anys. Clínicament, presentava trets facials típics (amplia punta nasal, filtre llarg, boca gran, llavis prominents i galtes plenes), mala oclusió de la boca, SVAS, hèrnies, personalitat gregària i retard mental. Amb una primera visita no es va detectar cap símptoma fora dels típicament descrits en la SWB i que pogués fer sospitar d'una deleció atípica. Davant dels resultats obtinguts amb l'estudi de pèrdua d'heterozigositat, s'ha realitzat una segona avaluació clínica de la pacient en la que tampoc s'ha trobat cap altra anomalia no detectada prèviament. Actualment aquesta noia té 25 anys, viu a casa els seus pares i treballa en un centre ocupacional. En tots aquests anys, només ha estat intervinguda quirúrgicament per otitis de repetició.

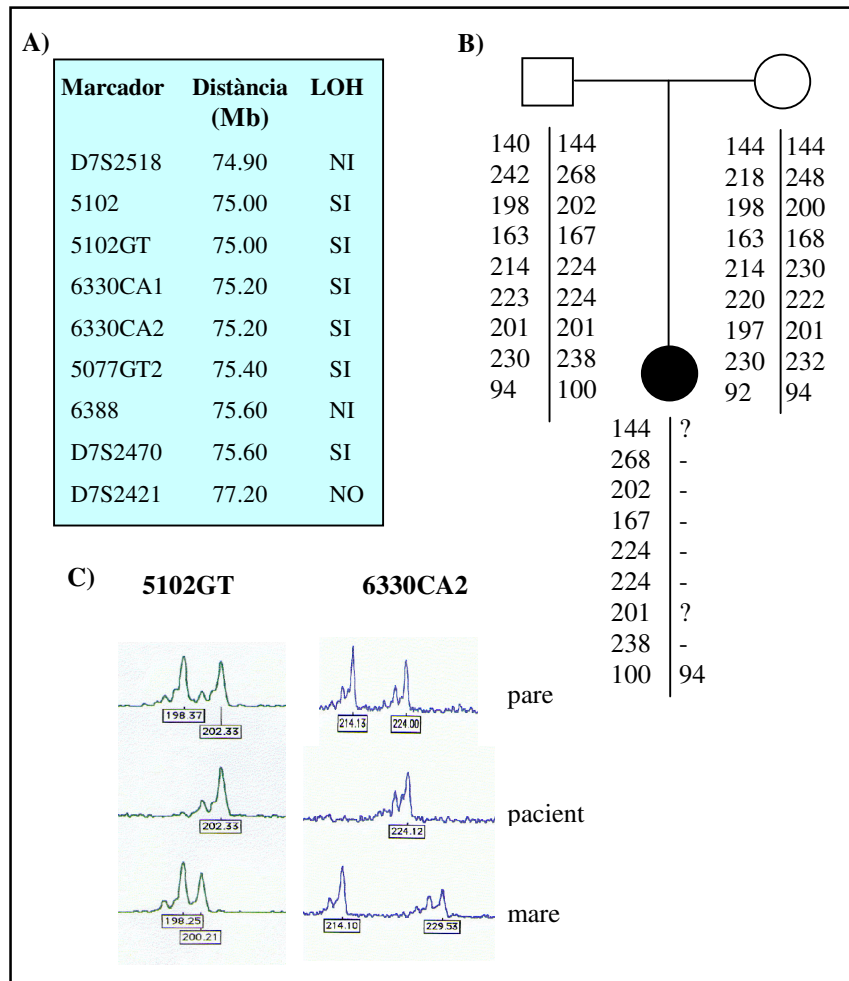


Figura 19. A) Marcadors de la regió més telomèrica de la banda 7q11.23 utilitzats per delimitar la mida de la deleció del cas n° 1. S'indica la posició de cadascun d'ells (distància al centròmer en Mb) i el resultat obtingut en l'estudi de pèrdua d'heterozigositat (LOH); SI: existeix pèrdua d'heterozigositat, NO: es detecta una herència biparental; NI: resultat no informatiu. B) Genealogia de la família amb els seus corresponents haplotips. C) Exemple del resultat obtingut en l'anàlisi de LOH pels marcadors 5102GT i 6330CA2. En tots dos casos s'aprecia una deleció d'origen matern en la pacient.

1.4. ORIGEN PARENTAL DE LES DELECIONS

Amb tots aquests pacients amb confirmació diagnòstica de SWB també s'ha intentat veure si existeix una diferència significativa pel que fa a l'origen parental de les delecions. Els resultats en canvi no ho posen de manifest ja que s'han comptabilitzat 28 casos amb delecio paterna i 32 amb un origen matern. Aplicant el test de proporcions es demostra que estadísticament no existeixen diferències significatives pel que fa a l'origen parental de les delecions ($t = -0,7$).

Del total de 65 casos analitzats, en 5 pacients no ha estat possible determinar l'origen de la delecio ja que cap dels marcadors microsatèl·lits estudiats han estat informatius al compartir tota la família un mateix al·lel (Figura 20).

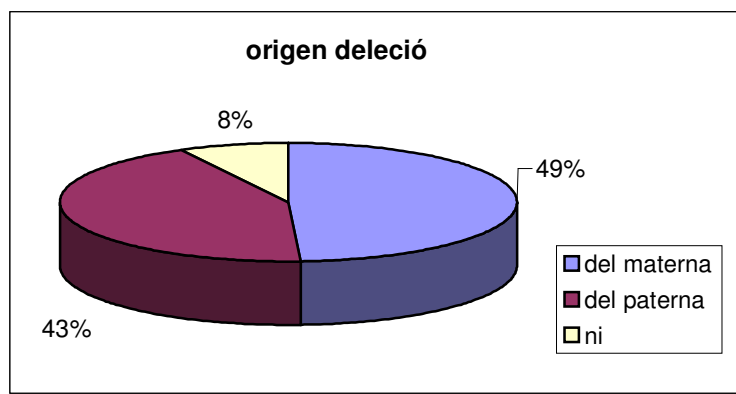


Figura 20. Classificació dels casos que han donat un resultat positiu en les proves moleculars segons el tipus d'origen parental de la delecio (ni: l'origen de la delecio no s'ha pogut determinar perquè els marcadors no han estat informatius).

1.5. AVALUACIÓ DE LES DADES CLÍNQUES

Per determinar quins són els trets fenotípics que millor defineixen la SWB i per poder veure si existeixen diferències entre les manifestacions clíniques dels pacients segons l'origen parental de la deleció s'ha realitzat un estudi estadístic de Chi - quadrat amb un nivell de significació del 5% i uns intervals de confiança calculats al 95%.

Amb aquesta finalitat, de cada individu s'ha sol·licitat un protocol clínic que requeria la següent informació:

FACIES CARACTERÍSTICA	depressió bitemporal	arrel nasal ampla
	marge periorbitari sobresortit	punta nasal ampla
	filtre nasal llarg	boca ampla
	llavis prominents	galtes abundats
	microretrognatia	

ESOTROPIA DENTAL

ESTRABISME

MALA OCLUSIÓ BUCAL

VEU RONCA

HIPERCALCÈMIA INFANTIL

SVAS O ALTRES CARDIOPATIES

PRESENÇA D'HÈRNIES

PERSONALITAT GREGÀRIA

RETARD MENTAL

LIMITACIÓ DE LES ARTICULACIONS

El protocol clínic ha estat rebut en 144 casos dels 200 pacients inicialment inclosos en aquest estudi (72%). Entre aquests, 57 pertanyien a pacients que presentaven la deleció SWB i els 87 restants corresponien a individus sense pèrdua de la regió 7q11.23. S'ha de tenir en compte que no totes les dades requerides han pogut ser complimentades pels especialistes, per això el nombre total de pacients per a cada tret fenotípic estudiat varia.

La Taula 8 recull la comparació dels diferents trets facials dismòrfics avaluats entre els casos confirmats com a SWB i els casos negatius per aquesta síndrome. En la Taula 9 es comparen la resta de manifestacions fenotípiques contemplades en el protocol clínic. Els resultats obtinguts posen de manifest que existeixen diferències estadísticament significatives per als següents trets dismòrfics: depressió bitemporal, filtre nasal llarg, boca ampla, llavis prominents, galtes abundants i microretrognatia. De la mateixa manera la veu ronca, l'SVAS o altres cardiopaties, les hèrnies i la personalitat gregària també serien uns bons indicadors fenotípics per a la SWB, ja que al comparar els casos SWB positius amb els negatius s'observen diferències estadísticament significatives.

Taula 8. Comparació dels diferents trets dismòrfics entre els dos grups de pacients SWB+/SWB-.

	Depressió bitemporal	Arrel nasal ampla	Marge periorbitari sobresortit	Punta nasal ampla	Filtre nasal llarg	Boca ampla	Llavis prominents	Galtes abundats	Microretrognatia
SWB+ (%)	48/55 (87)	47/57 (82)	41/57 (76)	49/54 (86)	46/57 (81)	50/55 (91)	53/57 (85)	47/55 (85)	44/52 (85)
SWB- (%)	41/75 (55)	58/80 (73)	47/78 (60)	59/78 (76)	44/79 (56)	55/79 (70)	58/80 (73)	35/77 (4)	38/79 (48)
p-value	0,000	NS	NS	NS	0,002	0,003	0,003	0,000	0,000

NS: no significatiu

Taula 9. Comparació dels trets fenotípics entre els dos grups de pacients SWB+/SWB-.

	Esotropia Dental	Estrabisme	Mala oclusió	Veü Ronca	Hipercalcèmia	SVAS	Altres cardiopaties	Hèrnies	Límitació articulacions	Personalitat gregària	RM
SWB+ (%)	23/38 (61)	3/5 (60)	34/46 (74)	26/40 (65)	5/28 (18)	26/53 (49)	16/22 (73)	20/50 (40)	7/49 (14)	40/47 (85)	51/55 (93)
SWB- (%)	40/80 (50)	2/11 (18)	45/79 (57)	21/77 (27)	5/66 (8)	11/86 (13)	13/87 (15)	14/86 (16)	17/86 (20)	48/83 (58)	75/86 (87)
p-value	NS	NS	0,058	0,000	NS	0,000	0,000	0,002	NS	0,001	NS

NS: no significatiu

Per una altra banda, s'han comparat les diferents manifestacions fenotípiques tenint en compte l'origen parental de la deleció. Dels 57 casos positius dels quals es disposava de dades clíniques, l'origen patern de la deleció es coneixia en 47. D'aquests, 22 individus presentaven una deleció d'origen matern i en 25 casos aquesta era paterna.

Els resultats obtingut no han posat de manifest que existeixin diferències significatives per a cap de les característiques clíniques estudiades (Taula 10). En aquest cas l'avaluació dels trets facials dismòrfics s'ha englobat dintre d'una mateixa variable (fàcies) i la presència dels trets fenotípics com l'estrabisme i l'anomenat altres cardiopaties no han pogut ser valorades per falta de dades.

Taula 10. Comparació dels trets fenotípics entre els dos grups de pacients classificats segons l'origen parental de la deleció SWB que presenten (DM: deleció materna; DP: deleció paterna).

	Fàcies	E.dental	Mala oclusió	Veu ronca	Hiper-calcèmia	SVAS	Hèrnies	Límitació articulacions	Personalitat SW	RM
DM	19/22	11/16	14/19	12/15	1/8	8/19	10/19	4/18	16/18	19/20
(%)	(86)	(69)	(74)	(80)	(13)	(42)	(53)	(22)	(89)	(95)
DP	19/25	8/12	14/18	8/17	2/12	14/23	5/15	2/20	14/17	21/23
(%)	(76)	(67)	(78)	(47)	(14)	(61)	(25)	(10)	(82)	(91)
p-value	NS	NS	NS	NS (0,055)	NS	NS	NS (0,076)	NS	NS	NS

NS: no significatiu

CAPÍTOL 2
ESTUDI DEL GEN ELASTINA

A novel elastin gene mutation results in an autosomal dominant form of cutis laxa

(“Archives of Dermatology”, en premsa)

2. 1. ESTUDI DELS PACIENTS AMB ESTENOSI SUPRAVALVULAR AÒRTICA O ALTRES CARDIOPATIES

En els últims anys s'ha vist que la causa genètica de l'SVAS no -sindròmica poden ser mutacions puntuals en el gen *ELN* (Li *et al.*, 1997; Tassabehji *et al.*, 1997; Boeckel *et al.*, 1999; Urbán *et al.*, 1999 i 2000; Metcalfe *et al.*, 2000).

Dintre de les mutacions puntuals descrites actualment, predominen aquelles que creen una terminació prematura i que molt probablement donen lloc a al·lels nuls a través del mecanisme de *nonsense-mediated decay* de l'mRNA (Urbán *et al.*, 2001). Com a conseqüència d'aquest fenomen, es repercuteix en una haploinsuficiència del producte proteic codificat pel gen *ELN* i, de la mateixa manera que passa en el cas de la SWB, aquesta semblaria ser el mecanisme patogènic de molts dels casos amb SVAS aïllada.

La finalitat d'aquest estudi ha estat la de caracteritzar una població de pacients amb SVAS i altres cardiopaties per tal d'identificar-ne la causa molecular.

Fruit d'aquest estudi s'ha escrit l'article titulat: “*Elastin mutation screening in a group of patients affected by vascular abnormalities*” que ha estat sotmès a la revista “*American Journal of Medical Genetics*” (veure annex).

2.1.1. Casuística i caracterització dels pacients

S'ha realitzat l'estudi mutacional del gen *ELN* en un total de 28 individus que presentaven en el seu fenotip alguna afectació cardíaca. A tots ells, se'ls ha descartat la possibilitat d'una deleció gran del gen *ELN* mitjançant la tècnica de la FISH i utilitzant la sonda que s'ha emprat per la confirmació diagnòstica de la SWB (LSI Williams Syndrome Region Probe, Vysis, Inc.). En cap dels casos s'ha detectat una deleció i d'aquesta manera també s'ha establert que en el posterior cribratge del gen *ELN* tots dos al·lels serien estudiats.

De tots els individus no s'ha pogut tenir accés a conèixer si les anomalies vasculares que manifestaven eren esporàdiques o familiars però sí s'ha pogut recollir altres dades com l'edat, el sexe i el tipus d'afectació vascular (Taula 11).

Taula 11. Recull de dades dels pacients seleccionats per a realitzar l'estudi mutacional del gen *ELN*.

Pacient	Sexe	Edat (anys)	Fenotip cardiovascular
1	D	2	SVPS
2	D	18	SVAS
3	H	5	SVAS
4	D	5	CIV
5	H	10	SVAS
6	H	6	Murmuri sistòlic
7	H	5	Murmuri sistòlic
8	D	4	CIA
9	H	3	CIA
10	H	13	SVAS
11	H	9	SVPS
12	H	5	SVAS
13	H	0.2	CIA
14	H	5	SVAS
15	H	9	CIA
16	H	8	Murmuri sistòlic
17	D	2	SVAS
18	H	12	SVAS
19	H	7	CIV
20	D	5	SVAS
21	H	2	SVAS
22	D	5	SVAS
23	D	1	SVAS
24	H	19	SVAS
25	D	2	SVAS
26	D	6	SVAS
27	D	4	SVAS
28	H	1	Coartació de l'aorta

Sexe, D: dona, H: home. Fenotip cardiovascular, SVPS: estenosi supra-ventricular de l'artèria pulmonar; SVAS: estenosi supra-ventricular aòrtica; CIV: comunicació intra-ventricular; CIA: comunicació intra-auricular.

2.1.2. Estudi mutacional del gen *ELN*

L'estudi mutacional del gen *ELN* ha permès detectar un total d'onze canvis: nou polimorfismes i dues possibles mutacions *missense* (Taula 12). Entre tots els canvis que aquest estudi ha posat de manifest, tres dels polimorfismes ja havien estat descrits anteriorment per altres autors.

Polimorfismes detectats

Tots els polimorfismes detectats han estat canvis d'un parell de bases (SNPs) i entre ells existeixen tres que prèviament ja havien estat descrits. Sis dels SNPs estan localitzats dintre de seqüències intròniques sense possibilitats de poder afectar en l'*splicing*. Els altres tres polimorfismes detectats estan localitzats dintre de seqüències exòniques del gen *ELN* i dos d'ells donen lloc a un canvi d'amino àcid. Un d'aquests canvis no-conservatius identificat ha estat el 1828G→C (G610R), el qual es troba localitzat en l'exó 26. Aquest és un polimorfisme comú que prèviament ja havia estat descrit amb una freqüència de l'1% dintre de la població Caucàsica estimada en un 7% (Urbán *et al.*, 2000). L'altre canvi no-conservatiu detectat en aquest cribratge ha estat el 1664A→G (S422G) el qual també havia estat prèviament descrit per altres autors (Tromp *et al.*, 1991). Es desconeix si aquests canvis poden afectar en la biosíntesi de l'elastina i, en cas afirmatiu, de quina manera.

Per a tots els polimorfismes identificats s'ha estudiat la freqüència en què es presenten dintre de la nostra població afectada d'anomalies vasculares (n=28) i dintre d'una població control (n=100). Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 13. Per a tres d'ells (IVS2+16C→A, IVS8+8C→T, IVS11+25C→A) la freqüència amb la que es presenten dintre de la població afectada és de com a mínim 2,5 vegades superior a la que s'aprecia dintre de la control.

Taula 12. Resum dels canvis detectats en l'estudi de 28 individus amb anomalies vasculars. En negreta es marquen els canvis anteriorment descrits (Tromp¹ *et al.*, 1991; Metcalfe² *et al.*, 2000).

Posició nucleotídica	Canvi nucleotídic	Canvi d'aminoàcid	Detalls clínics
Intró 2	IVS2+16C→A	Cap	SVAS
Intró 8	IVS8+8C→T	Cap	SVAS
Intró 11	IVS11+25C→A	Cap	SVAS/Buf cardíac
Intró 20	IVS20+17T→C	Cap	SVAS/CIA
Exó 20	1266A→G	S422G¹	SVAS
Exó 22	1386T→G	G462W	SVAS
Exó 26	1828G→C	G610R²	SVAS
Exó 26	1933G→T	V645L	SVAS
Intró 27	IVS27+22T→C	Cap	SVPS
Exó 28	2094C→T	A698A	CIA
Intró 32	IVS32-34C→T²	Cap	SVAS

Detalls clínics: SVAS: estenosi supravalvular aòrtica; SVPS: estenosi supravalvular de l'artèria pulmonar; CIA: comunicació intra -auricular.

Taula 13. Resum de les freqüències dels canvis polimòrfics trobats en la població afectada d'anomalies cardiovasculars (n=28) i en una població control (n=100) en l'estudi mutacional del gen *ELN*. * Polimorfismes sobre representats en la població afectada d'anomalies vasculars.

Polimorfismes	Freqüència del canvi en la població afectada (%)	Freqüència del canvi en la població control (%)
IVS2+16 C→A *	1,78	0,5
IVS8+8 C→T *	3,75	1,5
IVS11+25 C→A *	3,75	1
IVS20+17 T→C	5,36	12,5
IVS27+22 T→C	1,78	1
IVS32-34 C→T	12,5	9,5
S422G	12,5	19,5
G610R	5,36	10,5
A698A	1,78	1

Possibles mutacions *missense*

Dos dels pacients inclosos en aquest estudi presenten mutacions del tipus *missense* que no han estat detectades en 200 mostres de controls no emparentats.

G462W. Aquest canvi ha estat detectat en l'exó 22 del gen *ELN* en el pacient n° 3, el qual fenotípicament presenta una SVAS. L'anàlisi de la seqüència del producte amplificat per aquest exó ha revelat una canvi d'una T per una G en heterozigosi en la posició 1386 del gen *ELN*. Aquesta substitució dona lloc al canvi d'una glicina per un triptòfan (G462W). L'estudi familiar ha revelat que el pare del pacient també presenta el mateix canvi (Figura 21). No ha estat possible contactar amb la família per tal de practicar un reconeixement clínic al pare.

V645L. Aquest canvi ha estat detectat en el pacient nº 26, el qual manifesta una SVAS, i en la seva mare de la que no es disposa de dades clíniques (Figura 22). Aquesta substitució afecta l'últim nucleòtid de l'exó 26 (GTA >TTA) i pot ser que tingui una repercussió en l'*splicing* degut a la seva proximitat amb la seqüència *consensus* (GT). De totes maneres, serien necessaris estudis amb l'mRNA de l'*ELN* per tal de veure si aquest canvi realment afecta a l'*splicing* d'aquest exó.

Suposant que aquests canvis *missense* siguin la causa de l'SVAS d'aquests dos pacients, la prevalença de mutacions en el gen *ELN* detectada dintre de la nostra població afectada d'SVAS i d'altres anomalies vasculars seria de 7,14% (2/28). Si només contem els pacients amb SVAS aquesta prevalença augmenta fins a un 12,5% (2/16). Aquest són uns percentatges baixos si el comparem amb els obtinguts per altres autors que arriben a caracteritzar fins a un 35% dels seus pacients (Metcalfé *et al.*, 2000).

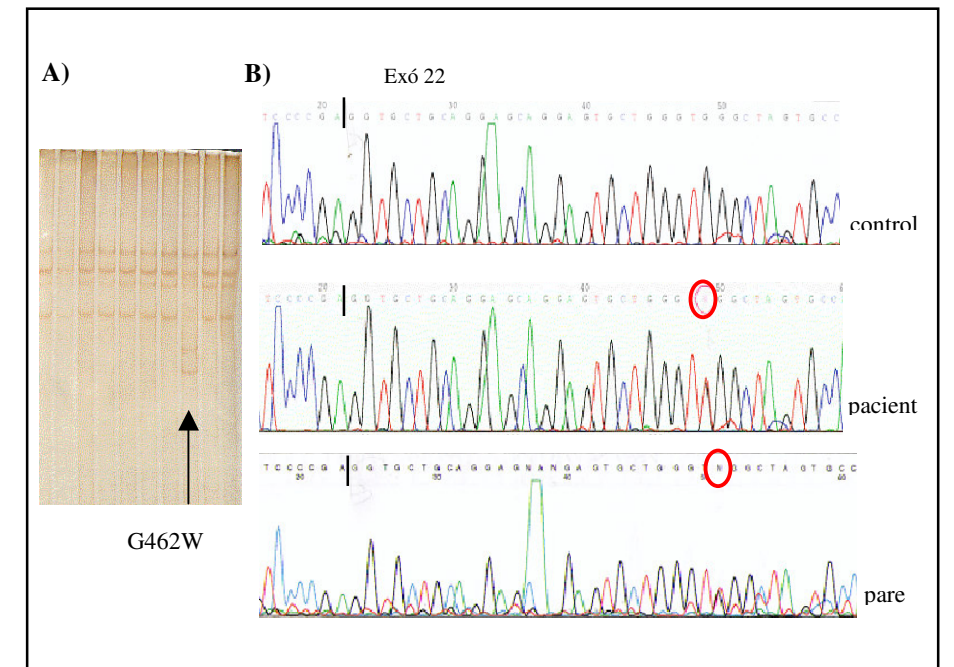


Figura 21. A) Patró de bandes de l'exó 22 del gen *ELN* obtingut mitjançant la tècnica d'SSCPs amb gel d'acrilamida a una concentració del 12% (condicions: temperatura 4°C, voltatge 300 volts i durada de l'electroforesi tota la nit). Amb una fletxa s'indica el patró anòmal obtingut en el cas del pacient. B) Seqüències de l'exó 22 d'un control, el pacient i del seu pare. Mitjançant una ratlla s'indica l'inici de l'exó i amb un cercle vermell es ressalta el canvi de T→G detectat (G462W).

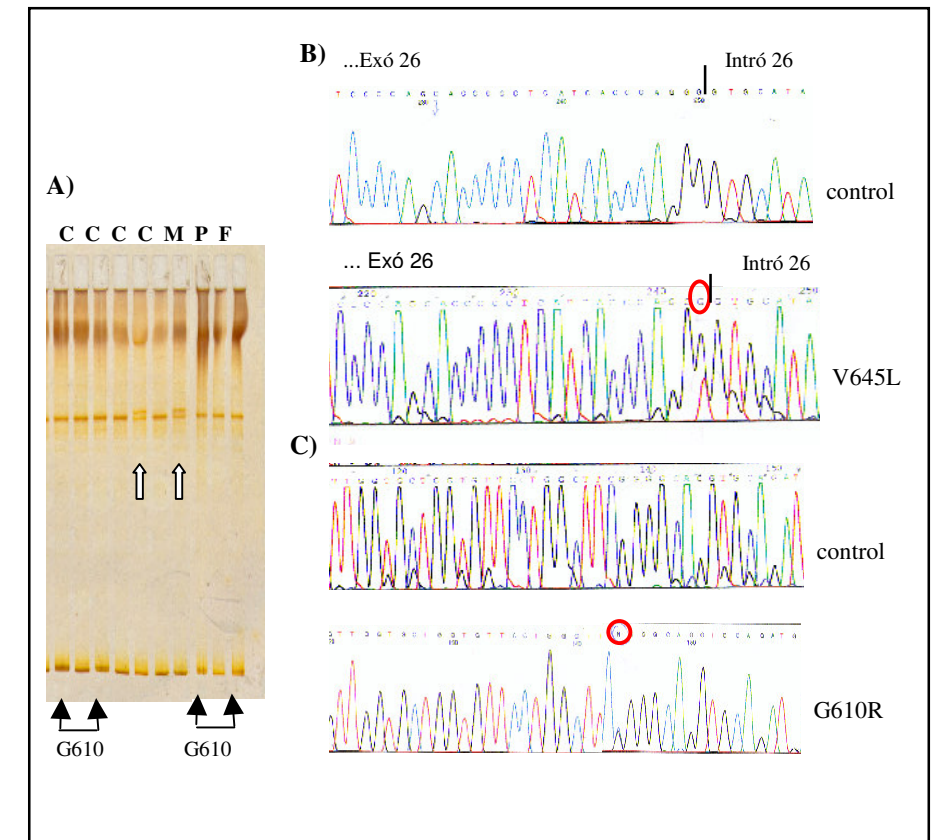


Figura 22. A) Patró de bandes obtingut al analitzar l'exó 26 del gen *ELN* mitjançant la tècnica d'SSCPs amb gels comercials per GenePhor (Amersham Bioscience AB, Uppsala Sweden) en els pacients n° 19 i 26 (F: fill), els seus progenitors (M: mare; P: pare) i una sèrie de controls (c). Les condicions de temperatura i temps emprades han estat les de 15°C i 2:00 hores de durada de l'electroforesi. Les fletxes negres mostren el canvi G610R (que també es detecta en dos dels controls), mentre que les blanques assenyalen el canvi V645L. B) Anàlisi de la seqüència obtinguda per al pacient n° 26 (V645L) comparada amb un control. El cercle vermell indica la substitució nucleotídica 1933G→T. El límit entre l'exó i l'intró també està senyalitzat (|). C) Seqüències obtingudes al analitzar el canvi polimòrfic G610R en el pacient n° 19 comparant amb un control. Amb un cercle vermell es marca la substitució 1828G→C.

2.2. CUTIS LAXA

La cutis laxa autosòmica dominant és un desordre genètic extremadament rar causat per mutacions puntuals en el gen *ELN*. En la literatura només existeixen 3 casos en els que la mutació causant estigui descrita (Tassabehji *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Totes elles són mutacions de tipus *frameshift*, degudes a una deleció d'un parell de bases en la regió 3' terminal del gen.

Gràcies a la col·laboració amb el Servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic, s'ha tingut accés a una família clínicament diagnosticada de cutis laxa autosòmica dominant en la que dues generacions es veuen afectades. Com a conseqüència de la raresa de la malaltia i dels pocs casos documentats, s'ha cregut interessant fer un estudi mutacional de la regió terminal (exons 30-34) del gen *ELN* per tal de poder diagnosticar molecularment la família.

Els resultats obtinguts s'han pogut publicar en un article titulat "*A novel elastin gene mutation results in an autosomal dominant form of cutis laxa*". En ell s'explica com mitjançant la tècnica d'SSCPs es va detectar una banda anòmala en tots dos pacients afectats quan s'estudiava el producte d'amplificació corresponent a l'exó 33. Aquest va ser seqüenciat, posant-se de manifest una deleció en heterozigosi d'una citosina (2292delC) en el codó 764. Per tal de comprovar la hipòtesi de que l'*ELN* és el gen causant de la malaltia en aquesta família es van realitzar estudis d'expressió amb RNA. Els resultats obtinguts varen demostrar que l'al·lel mutat es transcriu de la mateixa manera que en el control i que el canvi 2292delC, també es detecta a nivell d'mRNA en els dos pacients. La deleció detectada, prediu una alteració en la pauta de lectura del gen *ELN* que té com a conseqüència que la traducció continuï cap a la regió 3'-no traduïda del gen donant lloc a una nova proteïna 25 aminoàcids més llarga que la normal.

De la mateixa manera que les altres mutacions descrites per aquesta patologia, la detectada en aquest estudi també crea una proteïna anòmala amb un domini C-terminal aberrant. En consonància amb aquests altres treballs, suposem que la proteïna és sintetitzada, secretada fora de la cèl·lula i incorporada a la matriu extracel·lular on altera l'arquitectura normal de les fibres elàstiques.

**A novel elastin gene mutation results in an autosomal dominant form of
cutis laxa**

Laia Rodriguez-Revena, *BS*^{1,3}, Pilar Iranzo, *MD, PhD*², Cèlia Badenas, *BS, PhD*^{1,3},
Susana Puig, *MD, PhD*², Ana Carrió, *BS, PhD*^{1,3}, Montserrat Milà, *BS, PhD*^{1,3}

¹ Genetics Service. Centre de Diagnòstic Biomèdic. Hospital Clínic. Barcelona. Spain.

² Dermatology Service. Hospital Clínic. Barcelona. Spain.

³ IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer). Hospital Clínic.
Barcelona. Spain.

Supported by the "Marató TV3" (98TV 1110).

Word count: 2,234

Assigned manuscript number: DOB30134

Correspondent:

M. Milà
Genetics Service
Hospital Clínic
C/Villarroel, 170
08036 Barcelona, Spain
Tel. 34 93 227 54 00 Ext.2784
Fax. 34 93 451 52 72
e-mail: mmila@clinic.ub.es

ABSTRACT

Background: Cutis laxa is an extremely rare disorder characterized by marked skin laxity. Less than a few hundred cases worldwide have been described. Clinical presentation and mode of inheritance show considerable heterogeneity since autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked recessive forms have been reported. Only three mutations in the elastin gene have been described as the genetic cause of the autosomal dominant form of cutis laxa.

Observation: A 45 year-old woman and her 19 year-old son were clinically diagnosed of cutis laxa as their skin was inelastic, loose-hanging and wrinkled, with premature aging appearance. Mutational analysis of the elastin gene evidenced a novel mutation (2292delC) that predicts a frameshift in the coding region and causes translation to proceed into the 3'-untranslated region. This would replace the C-terminal amino acid of the normal elastin protein with a novel sequence.

Conclusions: This is the fourth case of autosomal dominant cutis laxa described in the literature in which a mutation in the elastin gene has been correlated with the disease.

INTRODUCTION

Cutis laxa (OMIM 123700; OMIM 219100) is a rare, inherited or acquired connective tissue disorder characterized by lax, redundant and inelastic skin. Histologically, elastic fibers are sparse and fragmented.¹ These fibers are present in the extracellular matrix of several tissues like lung, large blood vessels or dermis. They are basically composed of the protein elastin (ELN), which is responsible for imparting elasticity to these tissues and organs. Cutis laxa is one of the several disorders of the connective tissue that is characterized by an aberrant synthesis, degradation or destabilization of elastic fibers.²

There are several forms of cutis laxa and they all exhibit a considerable heterogeneity in their clinical manifestations.³ It may be hereditary or acquired but all of them are very rare and there are no precise data about their prevalence.⁴ The acquired form of cutis laxa is usually preceded by local or generalized inflammatory events. As for the hereditary forms, there are delineated two autosomal recessive types of cutis laxa and one autosomal dominant form. The previously defined X-linked form (also named Ehlers-Danlos syndrome type IX), caused by mutations in the *ATP7A* gene, is now classified within the group of copper deficiency syndromes and has been shown to be allelic with Menkes disease.⁴ The type I autosomal recessive form of cutis laxa is a perinatal form that presents pulmonary and other grave internal manifestations that lead to an early death. Type II, which is believed to be more frequent than type I, is called cutis laxa with joint laxity and developmental delay.⁴ The molecular defects underlying recessive form type I have been recently identified but not for type II. It has been reported that mutations in the fibulin-5 gene (*FBLN5*), which plays an important role in normal elastic fiber development, causes autosomal recessive cutis laxa.^{4, 5} In contrast, the autosomal dominant form is apparently free of systemic abnormalities, the onset of skin manifestations occurs between birth and puberty and it is caused by mutations in the *ELN* gene, but molecular heterogeneity cannot be excluded.^{4, 6}

Few families are known with cutis laxa inherited as a dominant trait, and only three cases have been correlated to mutations in the *ELN* gene.^{7, 8}

Here we report one more case of autosomal dominant cutis laxa caused by a novel frameshift mutation (2292delC) in the *ELN* gene.

SUBJECTS AND METHODS**Clinical summary*****Patient 1***

A 45 year-old woman, born to nonconsanguineous parents with no family history, was clinically diagnosed of cutis laxa when she was 17. She presented with progressive cutaneous looseness and sagging mainly of face and neck. At this age she presented deep perioral and ocular furrows with a premature aging appearance. She underwent five cosmetic surgical procedures. Cutaneous exploration showed loose skin, deep perioral wrinkles and absence of infraocular fold as a consequence of the corrective surgery (Figure 1A). Echocardiographic examination disclosed stenosis and regurgitation of the mitral valve, moderate aortic regurgitation and a minor dilatation of the left auricula.

She has been diagnosed of pulmonary emphysema by spirometry and computed tomography (CT) that clinical attributed to a smoking habit.

Patient 2

A 19 year-old white man (son of patient 1) was diagnosed of cutis laxa at the age of 1 because of cutaneous inelasticity. He had a history of infantile asthma and a language disorder. He was referred to Dermatology in 1996, where he was found on physical examination to have loose, redundant skin of the face and neck with accentuated nasolabial folds and downslanting palpebral fissures. The skin recoiled slowly after stretching (Figure 1B).

The elastic fibers were diminished in size and number in skin biopsy.

Pulmonary function test disclosed an obstructive pattern. The high-resolution pulmonary CT scanning suggested panlobulillar emphysema.

There was no evidence of cardiovascular or gastrointestinal involvement.

Mutation detection and sequencing

Blood samples from the cutis laxa family, including the mother, her affected son and the maternal grandparents were collected after appropriate written consent and genomic DNA was extracted following the salting out procedure.⁹ Exons 30 to 34 of the *ELN* gene were PCR amplified using the conditions and primers described by Tassabehji *et al.*¹⁰ Three μ L of PCR product being combined with loading buffer,

Resultats

denatured and electrophoresed in a 12% non-denaturing acrylamide for 1.45-2.00 hours at 15°C using the single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) by genephor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and following manufacturers instructions. The different migrations were silver-stained.¹¹ The aberrant pattern detected was automatically sequenced using the d-Rhodamine Terminator Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI 3100 automatic sequencer. In order to disclose the possibility of a false paternity we have studied the inheritance pattern of 13 polymorphic markers distributed in different chromosomes. We have used the ABI PRISM® Linkage Mapping Sets (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the recommended protocol.

Tissue culture

One punch biopsy was taken from the upper arm of the patients and from a healthy control. Skin fibroblasts were obtained after appropriate consent. Fibroblast culture was routinely maintained at 37°C in a humidified 10% CO₂-90% air atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Inc.).

RT-PCR analysis

Total RNA from skin fibroblasts culture was isolated using the RNeasy kit (Qiagen). Total RNA (1µg) from each patient and from a control was reverse transcribed using a Taq Man® Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. cDNA from the patients and from a control was amplified by nested PCR using three primers designed from cDNA to amplify a fragment that included exon 33. It was performed in two steps: first with a forward and external reverse primer covering from exon 30 to 34 (241 bp). Primer F, 5'-GCTGGGCTCGGAGGACTCGGAGTC-3'; Primer R1, 5'-ATTTTCTCTTCCGGCCACA-3'. And second with an internal reverse primer and the same forward (202 bp). Primer R2, 5'-CACCTGGGAAAATGGGAGAC-3'. Standard PCR conditions were used: 95°C for 5 min; 10 cycles of 94°C for 1 min and 72°C for 1 min, 25 cycles of 94°C for 40 sec, 52°C for 40 sec and 72°C for 40 sec, with an extension of 7 min at 72°C. Products were used to perform the second reaction with a temperature of annealing of 58°C. The obtained products were separated and visualized on a 2% agarose/TBE gel.

RESULTS

We report the identification of a heterozygous frameshift mutation in the *ELN* gene in two different generations in a nonconsanguineous family affected by autosomal dominant form of cutis laxa.

We only performed DNA mutation analysis in the 3' end (from exon 30 to 34) of the elastin gene because this is the region where mutations causing these disorder have been previously reported. An abnormal band was detected in both patients when exon 33 was screened (Figure 2A) and by sequencing the PCR product, a single base deletion of a cytosine (2292delC) in heterozygosity was revealed, when compared with a control sample (Figure 2B). This change was not detected in 100 healthy control samples. When studying patient's 1 parents we detected no aberrant pattern, suggesting a *de novo* mutation. We ruled out the possibility of false paternity within the family by studying the inheritance of 13 polymorphic microsatellite markers distributed on several chromosomes.

To test our hypothesis that *ELN* is the disease-causing gene in this family, we performed cDNA studies. In order to obtain RNA, skin fibroblasts were grown in culture and by optical microscope evaluation we could observe that they did not differ significantly from control cells as for the morphologic and proliferation point of view.

Total RNA was isolated from this cultured skin fibroblasts of the mother, the son and one control. RT-PCR was performed and total cDNA was obtained. The presence of the mutant mRNA was confirmed by nested PCR and SSCP analysis. It was carried out using cDNA primers designed to amplify a fragment that would include exons from 30 to 34. This analysis showed that the mutated allele is also expressed (data not shown).

These results evidenced that a single base deletion of a cytosine was identified at nucleotide position 2292 of *ELN*. The mutated allele is transcribed and the nucleotide change is also detected in mRNA of both patients. This deletion predicts a frameshift in the coding region and thus, it will cause translation to proceed into the 3'-untranslated region creating a novel protein 25 amino acids larger than the wild type (Figure 3).

DISCUSSION

The molecular basis of cutis laxa remains elusive, but analyses of skin fibroblasts have confirmed defects in elastin production or gene expression in some of the cases.^{12, 13}

The ELN protein is responsible for tissue elasticity. Elastic fibers are composed of two morphologically and chemically distinct components. The amorphous component is quantitatively the most abundant and it is made of ELN. The microfibrillar component is mostly composed of fibrillin and microfibril-associated glycoprotein.¹⁴

The *ELN* gene is a single copy gene of 34 exons localized in humans at 7q11.2. Its product, tropoelastin, is a polypeptide of 72 kDa with a primary structure of alternating hydrophobic and lysine-rich sequences. The hydrophobic domains are thought to be responsible for the elastic properties of the protein while the lysine-rich sequences are where the tropoelastin molecules link covalently in order to form a highly insoluble network of elastic fibers.¹⁵

There are only three cases reported in the literature of autosomal dominant form of cutis laxa in which the molecular defect is described. In two of them, a single base deletion in exon 30 (2012delG and 2039delC) leads to the loss of the C-terminal part of the molecule. Additionally, the stability of mRNA is decreased and the production of tropoelastin is also affected.⁸ The other case is a frameshift mutation (2244delG) in exon 32 that predicts to replace 37 amino acids at the C-terminus of ELN by a novel sequence of 62 amino acids. The abnormal protein is synthesized, secreted and incorporated into the elastic matrix, disrupting the normal architecture of elastic fibers.⁷

We report the fourth case of autosomal dominant cutis laxa arising from an *ELN* mutation. The clinical picture of the two patients was typical of this disorder as they showed wrinkled and extensible skin with no elasticity and few systemic manifestations including parasymptomatic emphysema in both patients and discrete cardiac abnormalities in the mother. The clinical manifestation in this family is similar to the other three previously described cutis laxa families with *ELN* mutations (Table 1). The skin symptoms of the patient and his mother first appeared during birth or puberty. No other members of the family presented clinical features

for cutis laxa but in order to demonstrate that the mutation arose in the mother as *de novo* we have studied maternal grandparents and have disclosed the possibility of a false paternity. By SSCP analysis we have shown that neither the grandmother nor the grandfather presented the mutation and therefore confirmed that it is a *de novo* mutation first originated in the mother (patient 1) and inherited in an autosomic dominant way in her son (patient 2).

Mutations in the *ELN* gene are not only responsible for autosomal dominant cutis laxa but also cause supraaortic stenosis (SVAS), which may occur as an isolated disease or as a part of a complex developmental disorder, Williams-Beuren syndrome (WBS, OMIM 194050). WBS is a microdeletional syndrome that involves the deletion of one complete copy of *ELN*. It is characterized by cardiovascular, neurobehavioral, facial, connective tissue, metabolic and growth abnormalities. Point mutations responsible for SVAS are located in the 5'-end and middle region of *ELN* and result in premature termination mutations.¹⁶ These mutations in SVAS cases and the deletion of a copy of *ELN* gene in WBS patients result in a functional haploinsufficiency of the *ELN* gene. By contrast, in autosomal dominant cutis laxa the mutations described and the one detected by us are located in the 3'-end of the coding region of the *ELN* gene. They are all single nucleotide deletions that do not truncate the protein but result in abnormal tropoelastin protein synthesis. It is hypothesized that this defective protein would interfere into two different ways: *i*) in a dominant negative way affecting the deposition of normal elastin, since the mutation alter the domain required for it or *ii*) in a gain-of-function mechanism that would make the mutant protein more susceptible to proteolytic degradation.¹⁶

Molecular analysis in our two patients showed that both share in heterozygosis a point deletion in exon 33 (2292delC). mRNA studies confirmed that *ELN* is transcribed and that the mutation is also detected at this level. As *ELN* mRNA is expressed and apparently stable and in consonance with the work published by Tassabheji *et al.*,⁷ we hypothesized that our mutation would produce a tropoelastin protein larger than normal with an aberrant C-terminal domain. We cannot conclude in which way this mutant protein could affect the elastic fiber structure once secreted to the extracellular matrix, but it is supposed to be responsible for the symptoms that this family present.

It is reported that while the hydrophobic sequences exhibit considerable variability without affecting functionality, the lysine-rich sequences and those encoded by exons 33 and 34 are very well conserved.¹⁷ On the basis of these observations it is not surprising the dramatical effect that this point deletion located in exon 33 has in our two patients. It is worth reporting new cases of *ELN* mutations in autosomal dominant cutis laxa patients in order to better understand the molecular basis of this pathology.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant 98TV1110 from ‘Fundació Marató TV3’, Barcelona, Spain.

We thank the family for their cooperation and consent to publish this study and their photographs.

REFERENCES

1. Fazio MJ, Olsen DR, Uitto JJ. Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. *Cutis*. 1989;43:437-444.
2. Sephel GC, Byers PH, Holbrook KA, et al. Heterogeneity of elastin expression in cutis laxa fibroblast strains. *J Invest Dermatol*. 1989;93:147-153.
3. Schreiber MM, Jilley JC. Cutis laxa. *Arch Dermatol*. 1961;84:134-140.
4. Loeys B, Van Maldergem L, Mortier G, et al. Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (*FBLN5*) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Molec Genet*. 2002;11:2213-2118.
5. Markova D, Zou Y, Ringpfeil F, et al. Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (*FBLN5*) gene. *Am J Hum Genet*. 2003;72:998-1004.
6. Damkier A, Brandrup F, Starklint H. Cutis laxa: autosomal dominant inheritance in five generations. *Clin Genet*. 1991;39:321-329.

7. Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, et al. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibers in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum Molec Genet.* 1998;7:1021-1028.
8. Zhang MC, He L, Giro M, Yong SL, Tiller GE, Davidson JM. Cutis laxa arising from frameshift mutation in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J Biol Chem.* 1999;274:981-986.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
10. Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, et al. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Molec Genet.* 1997;6:1029-1036.
11. Badenas C, Torra R, San Millán JL, et al. Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int.* 1999;55:1225-1233.
12. Olsen DR, Fazio MJ, Shamban AT, Rosenbloom J, Uitto J. Cutis laxa: reduced elastin gene expression in skin fibroblast cultures as determined by hybridization with homologous cDNA and an exon 1-specific oligonucleotide. *J Biol Chem.* 1988;263:6465-6467.
13. Fornieri C, Quaglino D, Lungarella G, et al. Elastin production and degradation in cutis laxa acquisita. *J Invest Dermatol.* 1994;4:583-588.
14. Uitto J, Ryhänan L, Abraham PA, Perejda AJ. Elastin in diseases. *J Invest Dermatol.* 1982;79:160s-168s.
15. Christiano AM, Uitto J. Molecular pathology of elastic fibers. *J Invest Dermatol.* 1994;5:53s-57s.
16. Milewicz DM, Urbán Z, Boyd C. Genetic disorders of the elastic system. *Matrix Biol.* 2000;19:471-480.
17. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(2):261-272.

FIGURES

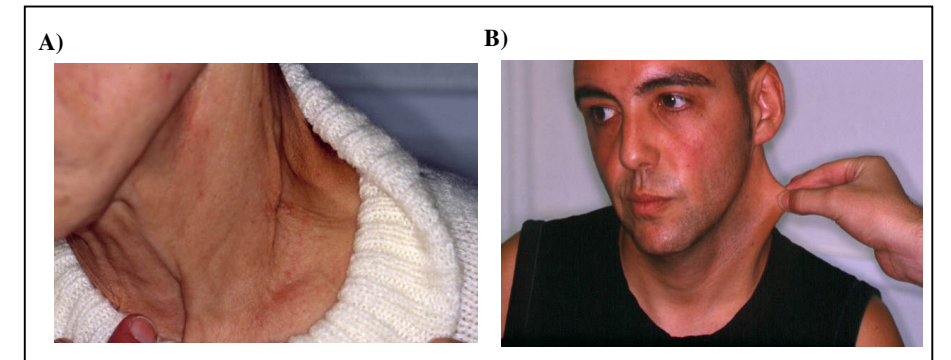


Figure 1. A) Patient 1, note the skin recoiling slowly after stretching. B) Patient 2, note loose skin in the neck.

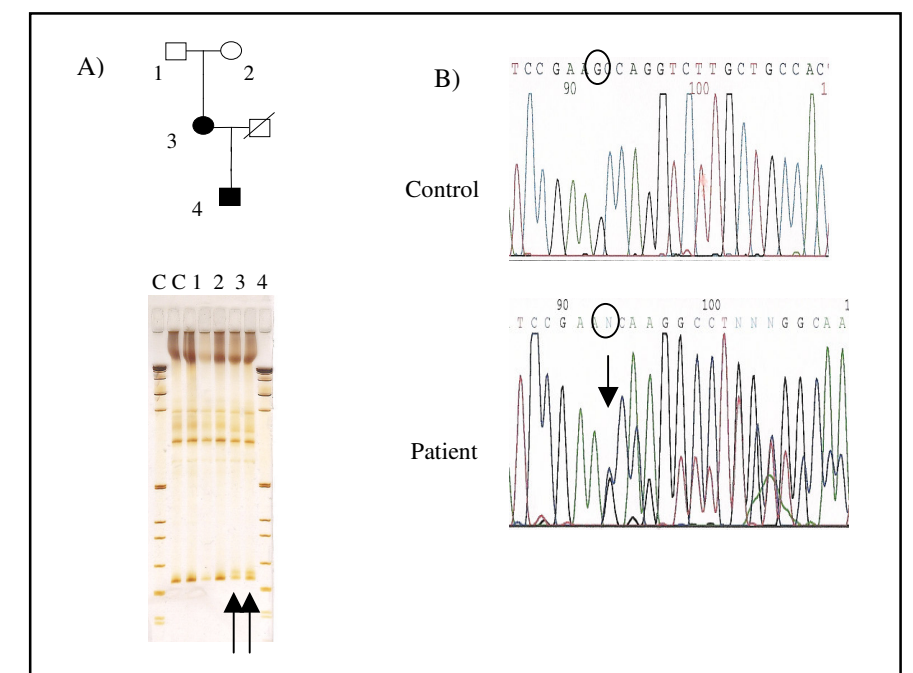


Figure 2. A) Pedigree and SSCP analysis. Abnormal pattern in patients is shown (indicated with an arrow). B) Sequencing profiles for exon 33 using reverse primer from a control sample and patient 1. The arrow indicates the mutation (encircled) detected in the *ELN* gene (2292delC).

```

...Exon 32 | Exon 33
741 A A G L G G V L G G A G Q F P L G | G V A
WT gct gct ggc ctt gga ggt gtc cta ggg ggt gcc ggg cag ttc cca ctt gga gga gtg gca
MUT gct gct ggc ctt gga ggt gtc cta ggg ggt gcc ggg cag ttc cca ctt gga gga gtg gca

          ↓
761 A R P G F G L S P I F P | Exon 34 (= bovine exon 36) G G A C L G K A
WT gca aga cct ggc ttc gga ttg tct ccc att ttc cca ggt ggg gcc tgc ctg ggg aaa gct
MUT gca aga cct ggt tcg gat tgt ctc cca ttt tcc cag gtg ggg cct gcc tgg gga aag ctt
          G S D C L P F S Q V G P A W G K L

781 C G R K R K STOP
WT tgt ggc cgg aag aga aaa tga
MUT gtg gcc gga aga gaa aat gag ctt cct agg acc cct gac tca cga cct cat caa cgt tgg
          V A G R E N E L P R T P D S R P H Q R W

MUT tgc tac tgc ttg gtg gag aat gta aac cct ttg taa
801 C Y C L V E N V N P L STOP

```

Figure 3. Predicted effect of the mutation. Deletion of a cytosine in codon 764 in exon 33 (↓) causes a frameshift that creates a novel protein 25 amino acids larger (MUT) than the wild type (WT). Exon boundaries are marked (|). Codons are numbered as in ref.10.

Table 1. Clinical manifestations of the reported cutis laxa cases with *ELN* mutations.

Clinical manifestations	Zhang et al ⁸ Patient K.T.	Zhang et al ⁸ Patient W.M.	Tassabehji et al ⁷	Rodriguez-Reventa et al.
Cutaneous	Loose skin Smooth Lacking elastic recoil	Loose skin Smooth Lacking elastic recoil	Heavy folds of fat	Loose skin Smooth Lacking elastic recoil
Feeding difficulties	Present	Not reported	Not reported	Not present
Stridor	Present Moderate subglottic stenosis	Not reported	Not reported	Not present
Hoarse voice	Present	Not reported	Not reported	Language disorder in son but not hoarse voice
Cardiac	Redundant mitral and tricuspid valves Right ventricular hypertrophy	Not reported	Cardiac murmur Right ventricular hypertrophy	Stenosis and regurgitation of the mitral valve, regurgitation of aortic valve (mother)
Pulmonary	Reduced expiratory flow Dyspnea and fatigue	Not reported	Multiple peripheral pulmonary vessels stenoses	Asthma (son) Pulmonary emphysema (mother and son)
Repeated herniorraphies	Present	Not reported	Present	Not present
Repeated cosmetic surgeries	Not reported	Not reported	Present	Present

DISCUSSIO

1. LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

La SWB és una síndrome d'aneusomia segmental que dona lloc a una deleció heterozigota d'una sèrie de gens contigus situats en la regió 7q11.23. La gran majoria de pacients presenten un interval delecionat d'una mida consistentment similar d'aproximadament 1,5 Mb que conté entre 17 i 30 gens (Peoples *et al.*, 2000; Magano *et al.*, 2001; Merla *et al.*, 2002). De totes maneres, excepcionalment s'han descrit casos amb delecions atípiques que han permès ajudar en la correlació genotip-fenotip de la síndrome (Korenberg *et al.*, 2000, Karmiloff-Smith *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2003). Tot i els avenços en el coneixement de la regió implicada, seqüenciació de la zona i recent descripció de la mateixa regió ortòloga en el ratolí (DeSilva *et al.*, 2002), encara es desconeix la contribució específica al fenotip de molts dels gens implicats en la deleció i fins i tot, el mecanisme patogènic que envolta la malaltia no és del tot entès.

1.1. Caracterització dels pacients

Dels 200 casos inclosos en l'estudi de la SWB, en 70 s'ha confirmat la sospita clínica. Això representa un percentatge de pacients positius d'un 35%. Aquest és baix si el comparem amb les dades que mostren que el 96% de pacients amb trets característics de SWB presenten la pèrdua de material de la regió 7q11.23 (Lowery *et al.*, 1995). En canvi, quan s'estudien sèries de pacients remesos per tal d'obtenir un diagnòstic, els percentatges que es descriuen són més baixos (10-50%) i s'aproximen als trobats en aquest estudi (Joyce *et al.*, 1996; Brondum-Nielsen *et al.*, 1997). S'ha de tenir en compte, que en la majoria dels casos inclosos en aquest treball es sol·licita l'estudi per tal d'arribar a un diagnòstic i que per tant, la selecció clínica no és molt estricta. Molts d'ells són remesos únicament per presentar retard mental i alguns trets dismòrfics que podrien recordar la SWB. Per això quan es comparen els fenotips entre els pacients als què s'ha demostrat l'existència de la deleció amb als què no la presenten, una manifestació clàssica de la SWB com és el retard mental resulta no ser estadísticament significativa, ja que un 87% dels casos negatius també la manifesten. Tot i així, la valoració clínica és necessària i de gran ajuda per tal de realitzar una selecció prèvia a l'estudi del laboratori i per una posterior correlació genotip-fenotip.

De tots els casos estudiats, no s'han detectat discordances entre l'estudi molecular i la FISH i la combinació de les dues tècniques, ha permès donar un resultat a tots els individus analitzats. De totes maneres al comparar les dues tècniques s'ha pogut veure que la FISH és més ràpida i que sempre se n'obté un resultat. En canvi, en la molecular existeix un percentatge de casos (5,5%) que degut a la no informativitat dels marcadors no han pogut ser valorats. Per aquesta raó, es creu convenient realitzar un primer estudi de FISH per al diagnòstic de la SWB i en el cas que es confirmi l'existència de la deleció aleshores, realitzar l'estudi de pèrdua d'heterozigositat. D'aquesta manera, coneixeríem l'origen de la deleció i podríem tenir una estima de la seva mida.

Pel que fa a l'anàlisi molecular amb marcadors polimòrfics localitzats dintre de la regió 7q11.23, en tots els pacients en els que s'ha detectat la deleció, els microsatèl·lits D7S1870, D7S613, D7S2476 i D7S489B mostraven una pèrdua d'heterozigositat o no han estat informatius. Això indica que aquesta regió es troba sempre delecionada en els pacients SWB amb una deleció clàssica, la qual cosa està en consonància amb les dades prèviament publicades (Lu *et al.*, 1998).

L'anàlisi amb aquests marcadors polimòrfics també ha permès revelar que la majoria de les delecions estudiades abarquen un mateix interval amb una mida d'aproximadament 1,5 Mb. Aquest interval delecionat s'estén des del gen *GTF2I* o el marcador D7S1870, situats en l'extrem telomèric, fins al *FKBP6* o D7S489B localitzats en el punt de trencament centromèric. Aquest coincideix amb els que majoritàriament es troben publicats en altres treballs (Peoples *et al.*, 2000). No obstant, els punts exactes de ruptura no s'han pogut delimitar degut a que la regió repetitiva actualment no està del tot caracteritzada. També s'ha de tenir en compte que tot i que els resultats obtinguts sobre les mides de les delecions concorden amb les descrites de 1,5 Mb, davant del treball realitzat per Bayés *et al.* (2003) l'estudi que aquí s'ha dut a terme no permet descartar l'existència de delecions de 1,84 Mb.

1.2. Origen parental de les delecions

L'estudi molecular també ha aportat informació sobre l'origen parental de les delecions, de tal manera que no s'han detectat indicis pel que fa a una herència preferent. Així doncs, les delecions en els cromosomes paterns i materns es donen

amb igual freqüència, sense que existeixin diferències estadísticament significatives. Aquests resultats s'ajusten als que ja existeixen publicats (Pérez Jurado *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

De la mateixa manera, l'avaluació de les dades clíniques dels diferents pacients amb deleció de SWB d'origen conegut, tampoc ha posat de manifest que existeixin diferències fenotípiques significatives per a cap dels trets estudiats. Aquests resultats per tant, no recolzarien la possibilitat de l'existència de gens *imprintats* dintre dels comunament deleccionats en la SWB (Pérez-Jurado *et al.*, 1996; Brøndum-Nielsen *et al.*, 1997). En canvi, sí que estan d'acord amb la creença que l'origen parental de la deleció no té una influència en la variabilitat fenotípica manifestada pels diferents pacients amb SWB (Wang *et al.*, 1999).

1.3. Avaluació de les dades clíniques

Tenint en compte les dades obtingudes amb l'estudi estadístic de les manifestacions fenotípiques, es posa de manifest que existeixen una sèrie de paràmetres que es poden considerar com a indicadors de la SWB. Pel que fa als trets facials els que millor definirien la síndrome serien la depressió bitemporal, les galtes abundants i la microretrogantia, així com el filtre nasal llarg, la boca ampla i els llavis prominents. De la resta de trets fenotípics, la presència d'SVAS o d'altres cardiopaties, les hèrnies, la veu ronca o la personalitat característica de la SWB també serien els millors indicadors clínics per a la síndrome.

El tret fenotípic de la hipercalcèmia, descrit en molts pacients durant l'edat pediàtrica, en aquest estudi no ha sortit significatiu. Això està en consonància amb publicacions prèvies en les que es reconeix com a un indicador molt pobre per a la SWB ja que només es manifesta de manera transitòria durant els primers mesos de vida i que per tant, en molts casos passa desapercibuda (Morris i Mervis, 2000).

Pel que fa a les manifestacions cardiovasculars, dintre dels pacients positius de SWB aquestes es troben presents en un 73% dels casos, essent l'SVAS la més comuna (49%). Aquests valors coincideixen amb d'altres prèviament publicats (Pérez-Jurado *et al.*, 1996).

1.4. Correlació genotip-fenotip i caracterització de casos amb delecions atípiques

Fins a 17 gens (segurament més degut al gran nombre de trànscripcions identificats) han estat mapats en la regió crítica de la SWB. Tots ells mostren una gran varietat de funcions potencials, algunes definides experimentalment mentre que d'altres inferides pels motius descrits en les seves seqüències. En les síndromes de gens contigus com la SWB, la contribució al fenotip de cadascun dels gens implicats acostuma a ser revelada per comparacions genotip-fenotip entre pacients amb delecions de mides diferents a les clàssiques. Per això la descripció clínica, fisiològica i molecular de casos atípics és de gran ajuda a l'hora de resoldre la qüestió de quins dels gens són més sensibles i contribueixen d'una manera específica en el fenotip SWB.

En l'actualitat únicament el gen *ELN* ha estat associat, sense cap mena d'ambigüitat, amb un dels trets fenotípics de la SWB, l'SVAS. El fet que en la literatura existeixin descrits casos de mutacions puntuals, traslocacions o delecions intragèniques del gen *ELN* en famílies afectades d'SVAS aïllada o en casos esporàdics, ha permès recolzar la idea que l'haploinsuficiència de l'elastina és la responsable de les anomalies vasculars observades en els pacients amb SWB. De fet aquests pacients amb mutacions puntuals en el gen *ELN* normalment també presenten altres anomalies extracardíaques del teixit conjuntiu, que inclouen fàcies típiques de SWB, veu ronca, hèrnia i pell laxa (Morris *et al.*, 1999).

Com ja s'ha dit i demostrat en aquest treball, la majoria de delecions descrites presenten unes mides bastant homogènies i només un nombre petit de casos atípics amb delecions més petites han estat descrits (Morris *et al.*, 1999 i 2003; Morris i Mervis, 2000; Karmiloff-Smith *et al.*, 2003). Recopilant les dades d'aquests casos, juntament amb la informació obtinguda a partir d'individus amb SVAS aïllada, la regió crítica que conté els principals determinants genètics de la síndrome ha estat delimitada en l'extrem telomèric de la deleción on es localitzen els gens *CYLN2*, *GTF2IRD1* i *GTF2I*. Per altra banda i gràcies a l'elevat grau de conservació entre la regió cromosòmica 7q11.23 humana i la regió 5G1-G2 del ratolí s'han pogut fer models murins per *Cyln2* (Valero *et al.*, 2000; Hoogenraad *et al.*, 2000; Nimchinsky *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2002). Aquests han permès aportar indicis que suggereixen

que el gen és necessari per al correcte desenvolupament neuronal però no han permès obtenir una implicació directa amb cap dels trets fenotípics de la síndrome.

En la sèrie de 65 pacients amb diagnòstic positiu de SWB que han estat estudiats molecularment en aquest treball, només un d'ells ha mostrat una deleció atípica. Quan aquesta ha estat caracteritzada, s'ha pogut veure que presenta un límit centromèric típic mentre que el telomèric és més distal als comunament descrits. Així doncs, s'ha demostrat que la deleció s'estén telomèricament fins al marcador D7S2470 situat a 75,60 Mb del centròmer i que per tant, la mida de la deleció és de com a mínim 3 Mb. Aquesta no és suficientment gran per ser detectada per citogenètica convencional i per això, quan es va fer el cariotip a la pacient, va passar desapercebuda. Altres casos de delecions més grans, tot i que visibles citogenèticament, descriuen com els pacients manifesten un fenotip SWB més greu amb espasmes infantils i un retard mental sever (Tsao i Westman, 1997; Mizugishi *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). En aquests casos el perfil cognitiu característic de la SWB normalment no apareix degut a que és emmascarat pel sever retard mental que presenten. Clínicament, la pacient descrita en aquest treball no manifesta cap tret que destaquï dintre del fenotip clàssic de SWB. Dintre de la regió més proximal que perd s'ha identificat el gen *HSP27* (*heat shock protein 27*) (Strock *et al.*, 2003). Aquest, codifica per una de les proteïnes que regulen la polimerització dels filaments d'actina i sembla que podria tenir una funció similar a la de la proteïna CYLN2 amb *locus* situat dintre de la regió comunament delecionada en la SWB (Hoogenraad *et al.*, 2000). S'ha suggerit que la hemizigositat de *HSP27* podria estar relacionada amb una manifestació severa de retard mental. Strock *et al.* (2003) van caracteritzar una sèrie de pacients SWB amb delecions majors a les clàssiques que tenien afectat aquest gen i que mostraven uns IQs inferiors als obtinguts en individus SWB clàssics. El cas de la pacient amb una deleció atípica descrita en aquest treball que també presenta delecionat aquesta mateix gen, manifesta un retard mental i un perfil cognitiu de SWB clàssics. Aquests resultats en principi contradirien als obtinguts per Strock *et al.* (2003), però s'ha de tenir en compte que tant el retard mental com el perfil cognitiu depenen del *background* genètic de cada individu.

En els últims sis anys, la comprensió de l'etiologia de la SWB ha avançat molt però en canvi se segueixen ignorant les bases moleculars per als diferents aspectes

fenotípics (a excepció de les cardiovasculars). Establir una correlació genotip-fenotip és problemàtic degut a la raresa dels individus amb deleccions atípiques o amb fenotips parcials. Per això, és important seguir estudiant les deleccions dels pacients confirmats com SWB per tal de detectar nous casos atípics. Per poder continuar amb l'estudi i la comprensió d'aquesta síndrome és fonamental la col·laboració entre les famílies afectades, l'especialista clínic i el laboratori de diagnòstic. Així no només es podrà obtenir un diagnòstic (desitjat per la família i l'especialista clínic) sinó que també es podrà avançar en l'enteniment de la patologia de la SWB.

2. ESTUDI MUTACIONAL DEL GEN ELASTINA EN LA PATOLOGIA DE L'SVAS I LA CUTIS LAXA

La proteïna elastina es troba formant fibres elàstiques en la matriu extracel·lular de varis teixits i òrgans (pell, pulmons, parets arterials,...) amb la finalitat de proporcionar-les la capacitat de distensió. Aquestes fibres estan formades per dos components morfològicament i química diferents. El component amorf és el quantitativament més abundant i està bàsicament compost per elastina. L'altre component, el microfibril·lar, està majoritàriament format per fibril·les i glicoproteïnes associades a microfibril·les (Uitto *et al.*, 1982).

El gen *ELN* codifica per un polipèptid, la tropoelastina, amb una estructura primària de seqüències hidrofòbiques alternades amb d'altres riques en l'aminoàcid lisina. Mentre que els dominis hidrofòbics són els responsables de les propietats elàstiques de la proteïna, els rics en lisina són per on les diferents molècules de tropoelastina s'uneixen covalentment per tal de formar la xarxa de fibres elàstiques (Christiano i Uitto, 1994).

Les fibres elàstiques són per tant, estructures complexes de la matriu extracel·lular que no s'ensamblen espontàniament sinó que requereixen d'un precís control. Es tenen evidències que suggereixen que les microfibril·les dirigeixen l'alineament i polimerització de la tropoelastina. De fet, es coneix que aquest fenomen té lloc gràcies a la interacció entre dos residus de cisteïna, altament conservats, localitzats

en el domini C-terminal de la proteïna i unes seqüències acídiques presents en les glicoproteïnes associades a microfibril·les (Brown-Augsburger *et al.*, 1996).

2.1. Caracterització molecular dels pacients amb SVAS o altres cardiopaties

La proteïna elastina és el principal component de les parets de l'aorta i d'altres artèries. Per això, no és d'estranyar que traslocacions o delecions intragèniques del gen *ELN* donin lloc a problemes vasculars com l'SVAS (Curran *et al.*, 1993; Ewart *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1995; Fryssira *et al.*, 1997; von Dadelszen *et al.*, 2000). Últimament i gràcies al cribratge mutacional del gen *ELN*, s'ha vist que mutacions puntuals en la seqüència d'aquest gen són també responsables d'aquestes lesions vasculars (Li *et al.*, 1997; Tassabehji *et al.*, 1997; Boeckel *et al.*, 1999; Urbán *et al.*, 1999 i 2000; Metcalfe *et al.*, 2000).

Davant d'aquesta observació i per tal de caracteritzar i determinar la implicació del gen *ELN* en la patologia vascular s'ha realitzat un estudi mutacional del mateix en una sèrie de 28 pacients afectats d'anomalies cardiovasculars. Prèviament, a tots els individus inclosos en aquest cribratge s'havia exclòs la possibilitat d'una deleción del gen *ELN* i l'existència de reordenaments cromosòmics on la regió 7q11.23 hi pogués estar implicada. Els resultats obtinguts han permès identificar dues noves mutacions en dos pacients, no emparentats, que havien estat diagnosticats d'SVAS. Tot i que no s'han pogut dur a terme estudis d'expressió degut a la impossibilitat de contactar amb les famílies corresponents, cap dels canvis identificats ha estat trobat en 200 mostres de controls no relacionats. L'estudi familiar ha posat de manifest que un dels progenitors, de tots dos casos, també era portador del mateix canvi. En cap d'ells però, ha estat possible obtenir informació clínica i per tant es desconeix si aquests presenten afectació cardiovascular. Encara que no la manifestessin, està descrit que la severitat de l'SVAS dintre d'una mateixa família pot variar molt, des de pacients asimptomàtics portadors d'una mutació fins a casos amb manifestació severa de la patologia (Metcalfe *et al.*, 2000). L'expressivitat variable i la reduïda penetrança de l'SVAS s'ha descrit tant en casos de SWB com en casos d'SVAS no -sindròmica, responnent al perquè alguns individus requereixen d'intervenció quirúrgica mentre que d'altres no (Chowdhury i Reardon, 1999). Aquesta variabilitat és típica de síndromes o patologies associades amb haploinsuficiència on el

background genètic de cada pacient té un paper important a l'hora de manifestar un fenotip concret.

La seqüència d'esdeveniments que succeeix entre la mutació en el gen *ELN* i la manifestació de l'SVAS avui en dia encara es desconeix. S'han postulat dos mecanismes causals per tal d'explicar la patologia vascular. En el primer, es defensaria un defecte quantitatiu de l'elastina. Les mutacions detectades tindrien com a conseqüència una reducció en la quantitat de producte proteic i per tant, en una haploinsuficiència d'elastina. El segon mecanisme fa referència a la qualitat de la proteïna sintetitzada. La mutació en el gen *ELN* no afectaria la seva expressió però sí provocaria una síntesi d'una proteïna aberrant que donaria lloc a unes fibres elàstiques anòmales.

La hipòtesi del defecte quantitatiu sembla ser la més atractiva per dues raons. La primera perquè l'hemizigotisme de l'elastina està ja establert com a mecanisme causal de l'SVAS en pacients amb delecions parcials que afecten el gen *ELN* i en els casos de SWB (Ewart *et al.*, 1993b). La segona perquè l'espectre mutacional del gen ha posat de manifest que més del 70% de les mutacions donen lloc a al·lels nuls o a transcrits d'mRNA mutats que són degradats a través d'un mecanisme de *nonsense-mediated decay* (Urbán *et al.*, 2000 i 2001).

2.2. Mutacions *missense* descrites en pacients amb SVAS

Les dues mutacions detectades en aquest estudi han estat del tipus *missense*. Fins a l'actualitat, només cinc mutacions d'aquesta classe han estat identificades. El paper que aquests canvis poden tenir en la patologia de l'SVAS és difícil d'explicar ja que no són tan evidents com una alteració de la pauta de lectura o el truncament del gen.

En dos dels casos de la literatura (M1V, G/R610Q) s'ha pogut demostrar que les mutacions donen lloc a al·lels nuls. M1V afecta al codó d'inici (metionina) de transcripció del gen. En la resta de seqüència codificant del gen o en la regió 5' no traduïda no hi ha cap altra metionina en pauta de lectura. Això fa que el resultat de la mutació sigui el de no transcripció i per tant no traducció d'aquest al·lel (Urbán *et al.*, 2000). Per altra banda, la mutació G/R610Q genera un donador d'*splicing* críptic en l'exó 26. Aquest, dona lloc a una delecio de 4 parells de bases del final de l'exó i

com a conseqüència, a una alteració en la pauta de lectura de l'mRNA. Els estudis realitzats per Urbán *et al.* (2001) demostren que aquest mRNA és degradat per un mecanisme de *nonsense-mediated decay* i que per tant, l'al·lel mutat no es tradueix.

Una altra de les mutacions *missense* descrites (A55T), afecta a l'últim nucleòtid de l'exó 3. Aquesta interfereix en l'*splicing* normal de l'exó i per tant altera la pauta de lectura del gen donant lloc a una hemizigositat del mateix (Metcalfe *et al.*, 2000). Les altres dues mutacions *missense* descrites (P220L i A707D) degut a la seva ubicació, no sembla que puguin interferir en l'*splicing*. Essent així, aleshores donarien lloc a una proteïna anòmala que podria interferir en la correcta formació de les fibres elàstiques durant la gènesi vascular (Metcalfe *et al.*, 2000).

De la mateixa manera que la mutació A55T, un dels canvis no conservatius descrits en aquest treball (V645L) també afecta l'últim nucleòtid d'un exó (en aquest cas de l'exó 26). Tot i no haver pogut obtenir una confirmació mitjançant estudis d'expressió, es pot inferir que aquest canvi pot interferir en l'*splicing*, segurament per alteració de la seqüència *consensus*. D'aquesta manera l'efecte de la substitució no repercutiria únicament amb el canvi d'un aminoàcid sinó que la mutació actuaria com una d'*splicing* donant lloc a una alteració de la pauta de lectura i a una hemizigositat del gen.

Pel que fa a l'altra possible mutació descrita (G462W), no es disposa de dades suficients per concloure de quina manera pot alterar la producció de tropoelastina. És important destacar que l'exó 22, on es localitza el canvi G462W, està sotmès a *splicing* alternatiu i que per tant rarament es troba representat dintre de la proteïna (Grond-Ginsbach *et al.*, 2000). De totes maneres els estudis on es demostra aquest fet estan realitzats a partir de fibroblastes i no de teixit cardíac. Per això no podem descartar la possibilitat que aquesta isoforma de la proteïna tingui una distribució teixit-específica i que la trobada a cor i teixit vascular sí que expressi l'exó 22 amb el canvi G462W. Per altra banda, també podria ser que la substitució G462W, tot i que no hagi estat detectada en 200 mostres controls, sigui un polimorfisme rar, com d'altres prèviament descrits (Urbán *et al.*, 2000). Actualment es tenen evidències que indiquen que una funció normal de l'elastina és compatible amb certs canvis aminoacídics (Urbán *et al.*, 2001). En base a aquestes observacions, les variants de

la proteïna original podrien tenir un paper modificador en el risc a desenvolupar una lesió cardíaca.

Una altra possible explicació a l'efecte de les substitucions detectades en aquest estudi podria ser que aquestes condicionessin la síntesi d'una proteïna anòmala que seria secretada a l'espai extracel·lular on interferiria en la correcta formació de les fibres elàstiques. Altrament, s'han descrit casos de proteïnes que haurien de ser secretades fora la cèl·lula o de proteïnes transmembranes que quan són mutades no arriben mai al seu destí (VanSlyke i Musil, 2000). Al no plegar-se correctament tendeixen a formar agregats dintre del reticle endoplasmàtic. Quan es dona un cas com aquest, les proteïnes aberrants són expulsades al citoplasma on són degradades pels proteosomes (Kopito, 1997). Aquest és un sistema de control de qualitat que per exemple, ha estat descrit per moltes malalties genètiques causades per mutacions puntuals (fibrosi quística, hemocromatosi hereditària, Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X,...) (Aridor i Balch, 1999; VanSlyke *et al.*, 2000). Curiosament, s'ha vist que la tropoelastina tendeix a ser degradada per aquest mecanisme quan s'acumula de forma anòmala dintre del reticle endoplasmàtic (Davis i Mecham, 1996). Per tant, existeix la possibilitat que mutacions *missense* també repercutixin en una haploinsuficiència del producte gènic.

La prevalença de mutacions dintre de la població afectada de cardiopaties detectada en aquest estudi és de 7,14% (2/28). Si aquesta la calculem només tenint en compte els casos amb SVAS aleshores incrementa fins a un 12,5% (2/16). Aquests percentatges són baixos si els comparem amb el 35% obtingut en un treball realitzat per Metcalfe *et al.* (2000). Varies raons poden explicar aquesta diferència. La primera seria que de partida no tinguéssim una bona selecció dels pacients inclosos en aquest estudi. Per una altra banda, la tècnica d'SSCPs utilitzada té un nivell de detecció d'un 90% i, tot i que varies condicions han estat utilitzades, no podem excloure la presència de mutacions puntuals no detectades en aquests pacients. També és possible que aquests individus presentin deleccions que afectin tot un exó (no detectades per FISH) i per tal de descartar-ho serien necessaris estudis amb RNA. A més, en el nostre cribratge les regions 5'- i 3'-no traduïdes del gen *ELN* no han estat examinades i és possible que també presentin mutacions que puguin repercutir en el desenvolupament d'una cardiopatia. De manera alternativa, també

pot ser que mutacions en altres gens diferents al de l'*ELN* causin l'SVAS o altres anomalies cardiovasculars.

El cribratge mutacional del gen *ELN* també ha permès detectar nou polimorfismes, sis dels quals es descriuen per primera vegada en aquest treball. L'estudi de tots ells i de les seves freqüències en una població control ha revelat l'existència d'una diferència significativa en tres casos (IVS2+16C→C, IVS8+8C→T, IVS11+25C→A). Tots tres estan sobre-representats en la població afectada d'anomalies vasculars, la qual cosa pot indicar un possible desequilibri de lligament. Essent així, aquests polimorfismes podrien actuar com a factors de risc per al desenvolupament de malalties vasculars ja que podrien reduir l'estabilitat de les fibres elàstiques i disminuir la funció arterial.

2.3. Cutis laxa

En els darrers anys, les bases moleculars de la cutis laxa autosòmica dominant han pogut ser esbrinades gràcies als recents descobriments de mutacions en el gen *ELN* en pacients afectats d'aquest desordre (Tassabehji *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Fins aleshores, la implicació de l'*ELN* en la cutis laxa només havia estat intuïda gràcies als resultats obtinguts a través de l'observació de teixits cutanis, en els que s'apreciava una estructura anòmala i fragmentada de les fibres elàstiques (Olsen *et al.*, 1988; Fornieri *et al.*, 1994).

En la literatura només existeixen tres casos de cutis laxa autosòmica dominant en els que es descriu el defecte molecular de la patologia. Tots tres són casos de delecions d'un parell de bases localitzades en la regió 3'-terminal del gen *ELN* (exons 30 i 32) i que com a conseqüència, provoquen una alteració en la pauta de lectura del mateix. En dos d'ells (2012delG i 2039delC localitzats en l'exó 30) aquest fet porta a la creació d'un codó de terminació prematur situat en l'exó 32. Aquest exó normalment es troba absent per un *splicing* alternatiu. Els autors seqüencien el cDNA dels pacients i d'un control i detecten que aquest exó 32 no es troba representat en els transcrits de cap d'ells. Aleshores postulen que l'efecte de les mutacions detectades no seria el de truncar la proteïna prematurament, sinó que aquesta seria sintetitzada però amb un domini C-terminal aberrant (Zhang *et al.*, 1999).

En el tercer dels casos, la mutació detectada (2244delG) que afecta l'exó 32, prediu una proteïna 62 aminoàcids més llarga a la normalment sintetitzada. Els estudis d'expressió que els autors descriuen demostren que la quantitat d'mRNA d' *ELN* aïllat a partir del cultiu de fibroblasts dels pacients és igual a la quantitat extreta en un cultiu control (Tassabehji *et al.*, 1998). Això evidencia que l'al·lel mutat s'expressa i que a més és estable (probablement perquè reté la regió 3' no-traduïda). A més els autors, mitjançant immunoprecipitació, també demostren que en aquests pacients existeix síntesi de tropoelastina anòmala i que aquesta és secretada a l'espai extracel·lular. Com a conseqüència, proposen que la proteïna sintetitzada, la qual tindria un domini C-terminal anòmal, s'incorporaria a la xarxa d'elastina però interferint en la seva correcta arquitectura.

L'anàlisi molecular de la família afectada de cutis laxa autosòmica dominant que s'ha presentat en aquest estudi, ha permès detectar una quarta mutació (2292delC) en la regió terminal del gen *ELN* (exó 33) responsable de l'afectació fenotípica dels pacients. Ambdós individus clínicament mostren un quadre compatible amb aquest desordre ja que presenten una pell inelàstica i redundat, que els proporciona una aparença senil. També manifesten una lleugera afectació sistèmica que inclou emfisema parasimptomàtic i una discreta afectació cardíaca en el cas de la mare (pacient 1). Aquestes manifestacions clíniques concorden amb les trobades per Tassabehji *et al.* (1998) i Zhang *et al.* (1999). La família descrita presenta una anticipació en les manifestacions clíniques ja que la mare desenvolupa els primers símptomes de cutis laxa durant la pubertat i el seu fill en els primers anys de vida. Aquesta observació però, també és descrita per Tassabehji *et al.* (1998), l'altre cas familiar de cutis laxa autosòmica dominant en el que es detecta la mutació responsable i del qual es té una mínima descripció clínica dels pacients.

A part de la mare i el fill, cap altre membre de la família presenta manifestacions clíniques de cutis laxa, la qual cosa suggereix un origen *de novo* de la mutació. De totes maneres i amb la finalitat de descartar la possibilitat d'una falsa paternitat, els pares de la pacient 1 també han estat estudiats. Mitjançant la tècnica de SSCPs s'ha pogut posar de manifest que cap d'ells presenta la mutació i, mitjançant un estudi de segregació de marcadors microsatèl·lits distribuïts al llarg del genoma, s'ha pogut desestimar la falsa paternitat. D'aquesta manera podem assegurar que la mutació va

sorgir *de novo* en la pacient 1 i que aquesta la va transmetre al seu fill (pacient 2) seguint un patró d'herència autosòmic dominant.

Els estudis d'expressió han confirmat que el gen de l'*ELN* en aquests pacients es transcriu i que la mutació també es detecta en aquest nivell. Com que l'mRNA de l'*ELN* és expressat i aparentment estable i amb consonància amb el resultats publicats per Tassabehji *et al.*, (1998) s'ha hipotetitzat que aquesta mutació és la responsable de produir una molècula de tropoelastina més llarga que la normal amb un domini C-terminal aberrant. Aquest nou domini que es formaria no contindria els dos residus de cisteïna que s'ha vist són necessaris en el reconeixement entre les fibres elàstiques i les microfibril·les per tal d'obtenir un correcte ensamblatge de les fibres.

Està descrit que mentre els dominis hidrofòbics presenten una considerable variabilitat sense que aquesta afecti en la funcionalitat, les seqüències riques en lisina i aquelles codificades pels exons 33 i 34 es troben altament conservades (Debelle i Tamburro, 1999). En base a totes aquestes observacions no és sorprenent l'efecte dramàtic que aquesta mutació puntual, localitzada en l'exó 33, té en aquests dos pacients. Per això considerem que aquesta mutació puntual és la responsable dels símptomes que presenta la família.

El que no podem concloure és de quina manera la proteïna defectiva, al ser secretada a l'espai extracel·lular, pot interferir en la correcta formació de les fibres elàstiques ja que es poden postular dos mecanismes:

1. Mecanisme amb un efecte negatiu i dominant. La proteïna anòmala sintetitzada per l'al·lel mutat seria secretada i interferiria en la correcta deposició de l'elastina normal. Aquesta hipòtesi es veu recolzada per les troballes que demostren que el domini C-terminal de la proteïna és necessari per a la deposició de l'elastina. Com a conseqüència de l'ensamblatge incorrecte de les fibres elàstiques es podrien donar dues situacions. La primera implicaria una aturada en el creixement de la matriu elàstica i per tant, en una disminució de la quantitat de fibres generades. La segona, repercutiria en una formació incorrecta de la xarxa elàstica i per tant, en un defecte en la qualitat d'aquesta.

2. Mecanisme de guany de funció. Totes les mutacions descrites en tots els pacients amb cutis laxa autosòmica dominant tenen com a conseqüència que canvien el domini C-terminal i el transformen d'hidrofòbic a hidrofílic. La resistència de l'elastina a la proteòlisi en part rau en la seva hidrofobicitat i per tant, és possible que aquestes mutacions detectades resultin en un guany de funció, fent que la proteïna anòmala sigui més susceptible a la degradació proteolítica.

2.4. SVAS versus cutis laxa

Mutacions puntuals en el gen *ELN* no només són responsables de la cutis laxa autosòmica dominant sinó que, com ja s'ha explicat, també causen l'SVAS no -sindròmica. L'estudi de tots dos desordres ha permès establir diferències en les seves respectives causes moleculars. Si bé totes dues malalties estan causades per mutacions en el mateix gen, la localització d'aquestes mostra clares diferències. En el cas de l'SVAS totes les mutacions descrites fins avui en dia, i incloses les detectades en aquest estudi, es troben en la regió 5' o intermitja del gen *ELN* (Milewicz *et al.*, 2000). Majoritàriament, el resultat que aquestes comporten és el de terminacions prematures en la pauta de lectura del gen que com a conseqüència, resulten en la transcripció d'un mRNA inestable que és degradat donant lloc a una haploinsuficiència funcional del gen (Urbán *et al.*, 2000 i 2001). En canvi, en el cas de la cutis laxa autosòmica dominant, totes les mutacions descrites es localitzen en la regió codificant 3'-final del gen *ELN*. Totes elles són delecions d'un parell de bases que alteren la pauta de lectura normal del gen però sense arribar a truncar-la prematurament. D'aquesta manera i com a resultat, s'obté una proteïna amb una seqüència peptídica 3'-terminal alterada que interfereix d'alguna manera en l'arquitectura normal de les fibres elàstiques.

El resultat de l'haploinsuficiència de l'elastina dona lloc, predominantment, a lesions o anomalies vasculars, mentre que mutacions amb un efecte qualitatiu resulten en una lleugera afectació cardíaca i un sever fenotip cutani. Aquest fet pot ser degut a una expressió diferencial dels dos al·lels del gen regulada a nivell d'espai (teixit-específica) o en el temps (estadi del desenvolupament). També pot ser que hi hagi un increment en la freqüència d'*splicing* alternatiu pels exons 30 o 32 en teixits no cutanis i que per tant, les conseqüències de les mutacions localitzades en ells no

repercuteixin en altres teixits. De fet també està descrit que les diferents isoformes de l'elastina s'expressen de manera diferent segons els tipus cel·lulars (Heim *et al.*, 1991).

De totes maneres i tot i la naturalesa teixit-específica de la cutis laxa autosòmica dominant i de l'SVAS, existeix entre les dues patologies i amb la SWB un certa superposició pel que fa a les manifestacions fenotípiques. L'estenosi de l'artèria pulmonar, per exemple, ha estat descrita tant en casos de cutis laxa com en pacients amb SVAS sindròmica i no-sindròmica.

De fet, la pacient afectada de cutis laxa que s'ha estudiat a part de les manifestacions cutànies, també presenta una lleugera afectació cardíaca. Tanmateix, la presència d'hèrnies, pell laxa, fàcies característiques i veu ronca també s'ha descrit tan en casos de cutis laxa, SVAS aïllada o en individus amb SWB. La majoria de pacients amb afectació vascular inclosos en l'estudi mutacional del gen *ELN*, clínicament també manifestaven algun tret dismòrfic que recordava als descrits en la SWB. Per tant, podem dir que entre les tres patologies existeix una certa superposició fenotípica deguda a la implicació, en totes elles, del gen *ELN*.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Un 35% dels individus amb sospita clínica de SWB presenten la deleció de la regió 7q11.23. Tot i que aquest percentatge és baix, la valoració clínica és necessària i de gran ajuda per tal de realitzar una selecció prèvia a l'estudi del laboratori.
2. Els trets dismòrfics depressió bitemporal, galtes abundants, microretrognatia, filtre nasal llarg, boca ampla i llavis prominents presenten diferències estadísticament significatives quan es comparen els pacients SWB positius amb els negatius. De la mateixa manera passa amb les manifestacions fenotípiques: SVAS o altres cardiopaties, hèrnies, veu ronca i la personalitat característica de SWB. Per aquesta raó, la presència d'aquests trets serveix com a indicador clínic de la SWB.
3. L'eficàcia del diagnòstic molecular en la SWB és del 94,5%, mentre que la de la FISH és del 100%. La tècnica de la FISH hauria de ser realitzada a tots els individus amb sospita clínica de SWB i només en els casos positius, s'aplicarien les tècniques moleculars per tal de caracteritzar els límits de les delecions.
4. L'estudi de pèrdua d'heterozigositat en aquells casos on s'ha confirmat la deleció és necessari per tal de caracteritzar individus amb delecions atípiques i així, poder establir una correlació genotip-fenotip.
5. La combinació dels marcadors microsatèl·lits D7S1870, D7S613, D7S2476 i D7S489B en l'estudi molecular de la SWB resulta adient per la detecció de la deleció. Només un 5,5% d'individus han resultat ser no informatius per aquests marcadors.
6. La majoria de delecions estudiades presenten unes mides consistentment homogènies d'aproximadament 1,5-1,84 Mb. Això ha facilitat poder establir un interval comunament delecionat en la majoria de pacients, situat entre els marcadors D7S489B i D7S1870.
7. Les delecions SWB estudiades no presenten un origen parental preferent. No existeixen diferències estadísticament significatives en les manifestacions clíniques segons l'origen de la deleció.

8. S'ha posat de manifest una deleció atípica amb una mida superior (3 Mb) a les comunament descrites que no sembla repercutir en un fenotip SWB diferent al clàssic.

9. S'han detectat dos possibles mutacions *missense* no descrites anteriorment en el gen *ELN* a pacients amb SVAS aïllada. La mutació V645L afecta a la seqüència *consensus* d'*splicing* de l'exó 26, mentre que G462W té una repercussió desconeguda.

10. S'han aportat noves evidències que recolzen la hipòtesi que les mutacions puntuals en pacients amb SVAS aïllada es localitzen preferentment en l'extrem 5' o intermig del gen *ELN* i que el seu efecte seria el d'una haploinsuficiència de la proteïna elastina.

11. L'estudi mutacional del gen *ELN* en pacients afectats de cutis laxa autosòmica dominant ha permès caracteritzar la mutació 2292delC com a causa genètica d'aquesta patologia. Aquest és el quart cas de cutis laxa autosòmica dominant on es descriu la mutació responsable de la patologia.

12. Les mutacions en la cutis laxa autosòmica dominant semblen localitzar-se en l'extrem 3'-terminal del gen *ELN* tal i com es mostra en els quatre casos descrits. Aquestes mutacions no afecten el nivell d'expressió del l'mRNA de l' *ELN* i donen com a resultat la síntesi d'un domini C-terminal de la proteïna anòmal, el qual interfereix en la correcta arquitectura de les fibres elàstiques.

BIBLIOGRAFIA

-
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular de la cèl·lula*. Omega ed, 2ona ed, pp116, 870. Fundació Barcelona, 1994.
 - Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, 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: 370-386.
 - Aridor M, Balch WE. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 1999; 5(7): 745-751.
 - Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, Fazio M, Uitto J, Rosenbloom J. Characterization of the complete human elastin gene: delineation of unusual features in the 5' flanking region. *J Biol Chem* 1989; 269: 8887-8891.
 - Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 887-984.
 - Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 131-151.
 - Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D. Supravalvular aortic stenodid in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation* 1962; 26: 1235-1240.
 - Beuren AJ, Schulze C, Eberle P, Harmjanz D, Apitz J. The syndrome of supravalvular aortic stenosis, peripheral pulmonary stenosis, mental retardation and similar facial appearance. *Am J Cardiol* 1964; 13: 471-483.
 - Boeckel T, Dierks A, Vergopoulos A, Bähring S, Knoblauch H, Müller-Myhsok B, Baron H, Aydin A, Bein G, Luft FC, Schuster H. A new mutation in the elastin gene causing supravalvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1141-1143, A9-10.
 - Botta A, Sangiuolo F, Calza L, Giardino L, Potenza S, Novelli G, Dallapiccola B. Expresión análisis and protein localization of the human HPC-1/Syntaxin 1A, a gene deleted in Williams syndrome. *Genomics* 1999; 62: 525-528.

Bibliografia

- Broder K, Reinhardt E, Ahern J, Lifton R, Tamborlane W, Pober B. Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 83: 356-360.
- Brondum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Horlyk H, Liljeborg U, Petersen MB, Pedersen W, Petersen NB, Sand A, Skovby F, Stafanger G, Zetterqvist P, Tommerup, N. Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum Genet* 1997; 99: 56-61.
- Brooke BS, Bayes-Genis A, Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 176-181.
- Brown-Augsburger P, Broekelmann T, Rosenbloom J, Mecham RP. Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem J* 1996; 318: 149-155.
- Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A, Reymond A. *WBSCR14*, a gene mapping to the Williams-Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 617-627.
- Chen KS; Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, Chinnault AC, Lee CC, Lupski JR. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat Genet* 1997; 17: 154-163.
- Chiarella F, Bricarelli FD, Lupi G, Bellotti P, Domenicucci S, Vecchio C. Familial supravalvular aortic stenosis: a genetic study. *J Med Genet* 1989; 26: 86-92.
- Chowdhury T, Reardon W. Elastin mutation and cardiac disease. *Pediatr Cardiol* 1999; 20: 103-107.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1025-1037.
- Christiano AM, Uitto J. Molecular pathology of the elastic fibers. *J Invest Dermatol* 1994; 5: 53s-57s.
- Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert M, Keating MT. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell* 1993; 73: 159-168.
- Damkier A, Brandrup F, Starklint H. Cutis laxa: autosomal dominant inheritance in five generations. *Clin Genet* 1991; 39: 321-329.

-
- Davis EC, Mecham RP. Selective degradation of accumulated secretory proteins in the endoplasmic reticulum. A possible clearance pathway for abnormal tropoelastin. *J Biol Chem* 1996; 271(7): 3787-3794.
 - De Zeeuw CI, Hoogenraad CC, Goedknecht E, Hertzberg E, Neubauer A, Grosveld F, Galjart N. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Cell* 1998; 19: 1-20.
 - Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *I J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 261-272.
 - De Luis O, Valero MC, Pérez-Jurado LA. *WBSCR14*, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterization of the human gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 215-222.
 - DeSilva U, Elnitski L, Idol JR, Doyle JL, Gan W, Thomas JW, Schwartz S, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, McDowell JC, Blakesley RW, Bouffard GG, Thomas PJ, Touchman JW, Miller W, Green ED. Generation and comparative analysis of approximately 3.3 Mb of mouse genomic sequence orthologous to the region of human chromosome 7q11.23 implicated in Williams syndrome. *Genome Res* 2002; 12: 3-15.
 - De Tsuji T, Lavker RM i Kligman AM, *J. Microscop.* 1978; 115: 165-173.
 - Dietz HC, Mecham RP. Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. *Matrix Biol* 2000; 19: 481-488
 - Donnai D, Karmiloff-Smith A. Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am J Med Genet* 2000; 97: 164-171.
 - Doyle JL, DeSilva U, Miller W, Green ED. Divergent human and mouse orthologs of a novel gene (*WBSCR15/Wbscr15*) reside within the genomic interval commonly deleted in Williams syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 90: 285-290.
 - Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1893-1898.
 - Eisenberg R, Young D, Jacobson B, Boito A. Familial supravalvular aortic stenosis. *Am J Dis Child* 1964; 108: 341-347.
 - Ewart AK, Morris CA, Atkinson DL, Jin W, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 1993a; 5: 11-16.

Bibliografia

- Ewart AK, Morris CA, Ensing GJ, Loker J, Moore C, Leppert M, Keating A. A human vascular disorder, supra-avalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993b; 90: 3226-3230.
- Ewart AK, Weishan J, Atkinson D, Morris CA, Keating MT. Supra-avalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest* 1994; 93: 1071-1077.
- Faury G, Maher GM, Li DY, Keating MT, Mecham RP, Boyle WA. Relation between outer and luminal diameter in cannulated arteries. *Am J Physiol* 1999; 277: H1745-H1753.
- Fazio MJ, Olsen DR, Uitto JJ. Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. *Cutis* 1989; 43: 437-444.
- Fornieri C, Quaglino D, Lungarella G, Cavarra E, Tiozzo R, Giro MG, Canciani M, Davidson JM, Ronchetti IP. Elastin production and degradation in cutis laxa acquisita. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 583-588.
- Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1947-1954.
- Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED, Proschel C, Gutowski NJ, Noble M, Atkinson DL, Odelberg SJ, Keating MT. LIM-Kinase 1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 1996; 86: 59-69.
- Fryssira H, Palmer R, Hallidie-Smith KA, Taylor J, Donnai D, Reardon W. Fluorescent in situ hybridisation (FISH) for hemizygous deletion at the elastin locus in patients with isolated supra-avalvular aortic stenosis. *J Med Genet* 1997; 34: 306-308.
- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 874-883.
- Greenberg F. Williams syndrome professional symposium. *Am J Med Genet (suppl)* 1991; 6: 85-88.
- Grimm T, Wesselhoeft H. The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supra-avalvular aortic stenosis: investigation of 128 families. *Z Kardiol* 1980; 69: 168-172.

-
- Grond-Ginsbach C, Thomas-Feles C, Werner I, Weber R, Wigger F, Hausser I, Brandt T. Mutations in the tropoelastin gene (ELN) were not found in patients with spontaneous cervical artery dissections. *Stroke* 2000; 31(8): 1935-1938.
 - Heim RA, Pierce RA, Deak SB, Riley DJ, Boyd CD, Stolle CA. Alternative splicing of rat tropoelastin pre-mRNA is developmentally regulated. *Matrix* 1991; 11: 359-366.
 - Hickok G, Bellugi U, Jones W. Asymmetrical ability. *Science*. 1995; 268: 621-622.
 - Hoogenraad CC, Akhmanova A, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci* 2000; 113: 2285-2297.
 - Jadayel DM, Osborne LR, Coignet LJA, Zani VJ, Tsui LC, Scherer SW, Dyer MJ. The BCL7 gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrome. *Gene* 1998; 224: 35-44
 - Jones MH, Hamana N, Nezu J-I, Shimane M. A novel family of bromodomain genes. *Genomics* 2000; 63: 40-45.
 - Joyce CA, Zorich B, Pike SJ, Barber JC, Dennis NR. Williams-Beuren syndrome: phenotypic variability and deletions of chromosomes 7, 11, and 22 in a series of 52 patients. *J Med Genet*. 1996; 33(12): 986-992.
 - Karmiloff-Smith A, Grant J, Ewing S, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. Using case study comparisons to explore genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet* 2003; 40: 136-140.
 - Kececioglu D, Kotthoff S, Vogt J. Williams-Beuren syndrome: a 30-year follow-up of natural and postoperative course. *Eur Heart J* 1993; 14: 1458-1464.
 - Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002; 115: 2817-2828.
 - Kopito RR. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 1997; 88(4): 427-430.
 - Korenberg JR, Chen XN, Hirota H, Lai Z, Bellugi U, Burian D, Roe B, Matsuoka R. VI. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. *J Cogn Neurosci* 2000; 12 Suppl 1: 89-107.
 - Kruse K, Pankau R, Gosch A, Wohlfahrt K. Calcium metabolism in Williams-Beuren syndrome. *J Pediatr* 1992; 121: 902-907.

Bibliografia

- Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Watchel SS, Miller OJ, Breg WR, Jone HW, Rary JM. Analysis of human Y chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 1245-1249.
- Levitin DJ, Menon V, Schmitt E, Eliez S, White CD, Glover GH, Kadis J, Korenberg JR, Bellugi U, Reiss AL. Neural Correlates of auditory perception in Williams syndrome: an fMRI study. NeuroImage 2003; 18: 74-82.
- Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA, Keating MT. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. Hum Mol Genet 1997; 7: 1021-1028.
- Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. Nature 1998a; 393: 276-280.
- Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B, Keating MT. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. J Clin Invest 1998b; 102: 1783-1787.
- Loeys B, Van Maldergem L, Mortier G, Coucke P, Gerniers S, Naeyaert JM, De Paepe A. Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (*FBLN5*) results in a severe form of cutis laxa. Hum Molec Genet 2002; 11: 2213-2118.
- López-Rangel E, Maurice M, McGillivray B, Friedman JM. Williams syndrome in adults. Am J Med Genet 1992; 44: 720-729.
- Lowery MC, Morris CA, Ewart AK. Strong correlation of Elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. Am J Hum Genet 1995; 57: 49-53.
- Lu X, Meng X, Morris CA, Keating MT. A novel human gene, WSTF, is deleted in Williams syndrome. Genomics 1998; 54: 241-249.
- Magano LF, Bayés M, Flores R, Pérez-Jurado LA. Towards a complete transcription map of the Williams-Beuren deletion region. Eur J Hum Genet Suppl 2001; 9: 244.
- Markova D, Zou Y, Ringpfeil F, Sasaki T, Kostka G, Timpl R, Uitto J, Chu ML. Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (*FBLN5*) gene. Am J Hum Genet 2003; 72: 998-1004.

-
- Martindale DW, Wilson MD, Wang B, Burke RD, Chen X, Duronio V, Koop BF. Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. *Mammalian Genome* 2000; 11: 890-898.
 - McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1077-1088.
 - Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa M, Trask BJ, Morris CA, Keating MT. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification of three novel genes. *Hum Genet* 1998; 103: 590-599.
 - Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu, W-Y, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 2002; 35: 121-133.
 - Merla G, Ucla C, Guipponi M, Reymond A. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Hum Genet* 2002; 110: 429-438.
 - Mervis CB, Robinson BF, Pani JR. Visuospatial construction. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1222-1229.
 - Metcalfe K. Williams syndrome: an update on clinical and molecular aspects. *Arch Dis Child* 1999; 81: 198-200.
 - Metcalfe K, Rucka AK, Smoot L, Hofstadler G, Tuzler G, McKeown P, Siu V, Rauch A, Dean J, Dennis N, Ellis I, Reardon W, Cytrynbaum C, Osborne L, Yates JR, Read AP, Donnai D, Tassabehji M. Elastin: mutation spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 955-963.
 - Milewicz DM, Urbán Z, Boyd C. Genetic disorders of the elastic system. *Matrix Biology* 2000; 19: 471-480.
 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
 - Mizugishi K, Yamanaka K, Kuwajima K, Kondo I. Interstitial deletion of chromosome 7q in a patient with Williams syndrome and infantile spasms. *J Hum Genet* 1998; 43: 178-181.
 - Morris CA, Loker J, , Ensing GJ, Stock AD. Supravalvular aortic stenosis cosegregates with a family 6;7 translocation which disrupts the elastin gene. *Am J Med Genet* 1993; 46: 737-744.

Bibliografia

- Morris CA, Mervis CB, Robinson BF, Keating MT, Lu X, et al. Long deletions of Williams syndrome region on chromosome 7 result in more severe mental retardation. *Annu Clin Genet Meet Am Coll MedGenet* 1999; 1(2): 59.
- Morris CA, Mervis CB. Williams syndrome and related disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 2000; 1: 461-484.
- Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ, Sommer A, Moore C, Hopkin RJ, Spallone PA, Keating MT, Osborne L, Kimberley KW, Stock AD. GTF2I hemizygosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet* 2003; 123A: 45-59.
- Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross Jr J, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* 2002; 415: 171-175.
- Nazzi T i Karmiloff-Smith A. Early categorization abilities in young children with Williams syndrome. *Cog Neurosc Neuropsych* 2002; 13(10): 1259-1262.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 313-353.
- O' Connor WN, Davis JB Jr, Geissler R, Cottrill CM, Noonan JA, Todd EP. Supravalvular aortic stenosis: clinical and pathological observation in 6 patients. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 179-185.
- Olsen DR, Fazio MJ, Shamban AT, Rosenbloom J, Uitto J. Cutis laxa: reduced elastin gene expression in skin fibroblast cultures as determined by hybridizations with a homologous cDNA and an exon 1-specific oligonucleotide. *J Biol Chem* 1988; 63: 6465-6467.
- Olson TM, Michels VV, Lindor NM, Pastores GM, Weber JL, Schaid DJ, Driscoll DJ, Feldt RH, Thibodeau SN. Autosomal dominant supravalvular aortic stenosis: localization to chromosome 7. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 869-873.
- Olson Tm, Michels VV, Urban Z, Csiszar K, Christiano AM, Driscoll DJ, Feldt RH, Boyd CD, Thibodeau SN. A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1677-1679.
- Osborne LR, Martindale D, Scherer SW, Shi XM, Huizenga J, Heng HHQ, Costa T, Pober B, Lew L, Brinkman J, Rommens J, Koop B, Tsui LC. Identification of

- genes from 500-kb region at 7q11.23 that is commonly deleted in Williams syndrome patients. *Genomics* 1996; 36: 328-336.
- Osborne LR, Campbell T, Daradich A, Scherer SW, Tsui LC. Identification of a putative transcription factor gene (WBSCR11) that is commonly deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* 1999; 57: 279-284.
- Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC, Scherer SW. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet* 2001; 29: 321-325.
- Pankau R, Partsch CJ, Winter M, Gosch A, Wessel A. Incidence and spectrum of renal abnormalities in Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 63: 301-304.
- Paperna T, Peoles R, Wang YK, Kaplan P, Francke U. Genes for the CPE receptor (CPETR1) and the human homolog of RVP1 (CPETR2) are localized within the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genomics* 1998; 54: 453-459.
- Partsch CJ, Dreyer G, Gosch A, Winter M, Schneppenheim R, Wessel A, Pankau R. Longitudinal evaluation of growth, puberty, and bone maturation in children with Williams syndrome. *J Pediatr* 1999; 134: 82-89.
- Peoples R, Pérez-Jurado L, Wang YK, Kaplan P, Francke U. The gene for replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11.23 Williams syndrome deletion. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 781-792.
- Peoples R, Cisco MJ, Kaplan P, Francke U. Identification of the WBSCR9 gene, encoding a novel transcriptional regulator, in the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 238-246.
- Peoples R, Franke Y, Wang YK, Pérez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Francke U. A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome-deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 47-68.
- Pérez-Jurado LA, Peoples R, Wang YK, Kaplan P, Hamel BCM, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 618-625.
- Pérez-Jurado LA. Síndrome de Williams, del fenotipo al genotipo. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 212-227.
- Pérez-Jurado LA, Wang YK, Peoples R, Coloma A, Cruces J, Francke U. A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome

Bibliografia

- deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 325-334.
- Peter M, Hoffman A, Parker C, Luscher T, Burckhardt D. Progression of aortic stenosis. Role of age and concomitant coronary artery disease. *Chest* 1993; 103(6): 1715-1719.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(9): 2934-2938.
- Pober BR, Lacro RV, Rice C, Mandell V, Teele RL. Renal findings in 40 individuals with Williams syndrome. *Am J Med Genet* 1993; 46: 271-274.
- Rastelli GC, McGoon DC, Ongley PA, Mankin HT, KirKlin JW. Surgical treatment of supraaortic stenosis: report of 16 cases and review of the literature. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 5: 873-882.
- Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, Schinzel A. Delineation of 7q11.2 deletion associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics* 1996; 34: 17-23.
- Rosenbloom J, Abrams WR, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Bashir M. Structure of the elastin gene. *CIBA Found. Symp* 1995; 192: 59-80.
- Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 1993; 47: 468-470.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-491.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1992; 24: 104-108.
- Schmidt MA, Ensing GJ, Michels VV, Carter GA, Hagler DJ, Feldt RH. Autosomal dominant supraaortic stenosis: large three generation family. *Am J Med Genet* 1989; 32: 384-389.
- Schreiber MM, Jilley JC. Cutis laxa. *Arch Dermatol* 1961; 84: 134-140.
- Scothorn DJ, Butler MG. How common is precocious puberty in patients with Williams syndrome?. *Clin Dysmorphol* 1997; 9: 91-93.

-
- Sephel GC, Byers PH, Holbrook KA, Davidson JM. Heterogeneity of elastin expression in cutis laxa fibroblast strains. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 147-153.
 - Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 489-501.
 - Sirotkin H, Morrow B, SaintJore B, Puech A, DasGupta R, Patanjali SR, Skoultchi A, Weissman SM, Kucherlapati R. Identification, characterization and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* 1997; 42: 245-251.
 - Stanyon C, Bernard O. LIM-kinase1. *I J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 389-394.
 - Stapleton T, MacDonald WB, Lightwood R. The pathogenesis of idiopathic hypercalcemia of infancy. *Am J Clin Nutr* 1957; 5: 533-542.
 - Stock AD, Spallone PA, Dennis TR, Netski D, Morris CA, Mervis CB, Hobart HH. Heat shock protein 27 gene: chromosomal and molecular location and relationship to Williams syndrome. *Am J Med Genet* 2003; 120A(3): 320-325.
 - Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995; 375: 645-653.
 - Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M, Read AP. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* 1997; 7: 1029-1036.
 - Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft GS, Kielty C, Wilmot C, Donnai D, Read AP, Jones CJ. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibers in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum Molec Genet* 1998; 7: 1021-1028.
 - Tassabehji M, Metcalfe K, Karmiloff-Smith A, Carette MJ, Grant J, Dennis N, Reardon W, Splitt M, Read AP, Donnai D. Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 118-125.
 - Tassabehji M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 2003; 12: R229-R237.

Bibliografia

- Tromp G, Christiano A, Goldstein N, Indik Z, Boyd C, Rosenbloom J, Deak S, Prockop D, Kuivaniemi H. A to G polymorphism in *ELN* gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(15): 4314.
- Tsao CY, Westman JA. Infantile spasms in two children with Williams syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 71: 54-56.
- Uitto J, Ryhänen L, Abraham PA, Perejda AJ. Elastin in diseases. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 160s-168s.
- Urbán Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A, Donis-Keller H, Boyd CD. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 958-962.
- Urbán Z, Michels VV, Thibodeau SN, Donis-Keller H, Csiszar K, Boyd CD. Supravalvular aortic stenosis: a splice site mutation within the elastin gene results in reduced expression of two aberrantly spliced transcripts. *Hum Genet* 1999; 104(2): 135-142.
- Urbán Z, Michels VV, Thibodeau SN, Davis EC, Bonnefont J-P, Munnich A et al. Isolated supravalvular aortic stenosis: functional haplinsufficiency of the elastin gene as a result of nonsense-mediated decay. *Hum Genet* 2000; 106: 557-588.
- Urbán Z, Zhang J, Davis EC, Maeda GK, Kumar A, Stalker H, Belmont JW, Boyd CD, Wallace MR. Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene. *Hum Genet* 2001; 109(5): 512-520.
- Valero MC, de Luis O, Cruces J, Pérez Jurado LA. Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: the low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion (s). *Genomics* 2000; 69: 1-13.
- VanSlyke JK, Musil LS. Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods* 2000; 20: 156-164.
- von Dadelszen P, Chitayat D, Winsor EJ, Cohen H, MacDonald C, Taylor G, Rose T, Hornberger LK. De novo 46,XX,t(6;7)(q27;q11;23) associated with severe cardiovascular manifestations characteristic of supravalvular aortic stenosis and Williams syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 90: 270-275.
- Wang YK, Harryman-Samos C, Peoples R, Pérez Jurado LA, Nusse R, Francke U. A novel human homologue of the *Drosophila frizzled* wnt receptor gene binds

- wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 465-472.
- Wang JY, Frenzel KE, Wen D, Falls DL. Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem* 1998; 273: 20525-20534.
- Wang MS, Schinzel A, Kotzot D, Balmer D, Casey R, Chodirker BN, Gyftodimou J, Petersen MB, Lopez-Rangel E, Robinson WP. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: No evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. *Am J Med Genet* 1999; 86(1): 34-43.
- Wessel A, Pankau D, Kececioglu D, Ruschewski W, Bursch JH. Three decades of follow-up of aortic and pulmonary vascular lesion in the Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet* 1994 52: 297-301.
- Williams's JCP, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 1961; 24: 1311-1318.
- Winter M, Pankau R, Amm M, Gosch A, Wessel A. The spectrum of ocular features in the Williams-Beuren syndrome. *Clin Genet* 1996; 49: 28-31.
- Wu YQ, Sutton VR, Nickerson, E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, Greenberg F, Tassabehji M, Shaffer LG. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet* 1998; 78: 82-89.
- Wu YQ, Nickerson E, Shaffer LG, Keppler-Noreuil K, Muilenburg A. A case of Williams syndrome with a large, visible cytogenetic deletion. *J Med Genet* 1999; 36(12): 928-932.
- Wu YQ, Bejjani BA, Tsui L-C, Mandel A, Osborne L, Shaffer L. Refinement of the genomic structure of STX1A and mutation analysis in nondeletion Williams syndrome patients. *Am J Med Genet* 2002; 109: 121-124.
- Yamaguchi K, Nakayama T, Fujiwara T, Akagawa K. Enhancement of neurite-sprouting by suppression of HPC-1/syntaxin 1A activity in cultured vertebrate nerve cells. *Brain Res* 1996; 740: 185-192.
- Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fiber development in vivo. *Nature* 2002; 415: 168-171.

Bibliografia

- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 1998; 393: 809-812.
- Zackowski JL, Raffel LJ, Blank CA, Schwartz S. Proximal interstitial deletion of 7q: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet* 1990; 36: 328-332.
- Zhang MC, He L, Giro M, Yong SL, Tiller GE, Davidson JM. Cutis laxa arising from frameshift mutation in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J Biol Chem* 1999; 274: 981-986.

ANNEX

*Elastin mutation screening in a group of patients affected by vascular
abnormalities*

(sotmès a “American Journal of Medical Genetics”)

**ELASTIN MUTATION SCREENING IN A GROUP OF PATIENTS
AFFECTED BY VASCULAR ABNORMALITIES**

Laia Rodriguez-Revenga,^{1,2} Cèlia Badenas,^{1,2} Ana Carrió,^{1,2} Montserrat Milà^{1,2}

¹ Genetics Service. Centre de Diagnòstic Biomèdic. Hospital Clínic. Barcelona. Spain.

² IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer). Hospital Clínic. Barcelona. Spain.

Running title: Elastin mutations in SVAS patients

Correspondent:

M. Milà
Genetics Service
Hospital Clínic
C/Villarroel, 170
08036 Barcelona, Spain
Tel. 34 93 227 54 00 Ext.2784
Fax. 34 93 451 52 72
e-mail: mmila@clinic.ub.es

ABSTRACT

Supravalvular aortic stenosis is an uncommon but well characterized congenital form of left ventricular outflow obstruction. The lesion involves the ascending aorta and may often be observed with associated pulmonary arterial stenoses or stenoses of other arteries, especially at major branch points. It can occur sporadically, as an autosomal dominant condition, or as one component of Williams-Beuren syndrome. As a matter of fact, the clinical and structural characteristics of supravalvular aortic stenosis are identical in both syndromic and non-syndromic cases. The severity of supravalvular aortic stenosis varies but if untreated, may result in heart failure, myocardial infarction and sudden death. It is well known that supravalvular aortic stenosis in Williams-Beuren patients occurs as a consequence of a complete deletion of one copy of the elastin gene on chromosome 7q11.23. However, the underlying genetic cause of isolated supravalvular aortic stenosis has been identified as translocations, gross intragenic deletions and point mutations that disrupt the elastin gene. Here we report the results obtained in a mutational screening in the elastin gene in 28 patients with supravalvular aortic stenosis and other vascular abnormalities in an attempt to characterize the molecular cause of this lesion. Among them we have detected eleven changes: nine polymorphisms and two novel putative missense mutations.

KEY WORDS: elastin, supravalvular aortic stenosis, mutation.

INTRODUCTION

Congenital supravalvular aortic stenosis (SVAS; OMIM 185500) is the rarest obstructive lesion of the left ventricular outflow tract. The defining feature of the malformation is an aortic narrowing at the level of the sinotubular junction, but in some cases there is a narrowing of the entire ascending aorta and arch branches.¹ In addition to the aorta, other major arteries including the pulmonary, carotid, cerebral, renal and coronary arteries, may also be involved in these patients. Collectively, these findings indicate that SVAS is a generalized disease of the arterial wall.² Clinically, SVAS patients present harsh systolic murmur upon physical examination and by Doppler echocardiography it is appreciated a significant supravalvular peak pressure gradient and an increased flow velocities. The severity of SVAS varies but, if untreated, may result in heart failure, myocardial infraction and early death. Patch grafting the stenotic region of the aorta is the most common treatment for SVAS. It has an incidence of 1/20,000 live births and it was the first disorder associated with the elastin gene (*ELN*).³

SVAS may occur either as a sporadic disease or inherited in an autosomal dominant way. It is also classically associated with the Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050), a complex developmental disorder caused by deletion of about 1.5 Mb of chromosome 7q11.23 that encompasses in addition to others, the *ELN* gene.⁴ The clinical and structural characteristics of SVAS are identical in both syndromic and non-syndromic cases.

In WBS patients, SVAS is caused by the deletion of one complete copy of the *ELN* gene, while in non-syndromic cases of SVAS point mutations,^{3,5-11} translocations^{12,13} and gross intragenic deletions¹⁴⁻¹⁶ affecting the *ELN* gene are detected. Among the point mutations described to date, there is a predominance of premature termination mutations that probably result in null alleles and in hemizyosity for the elastin through a nonsense-mediated decay mechanism. As the spectrum of point mutations in *ELN* is clearly consistent with functional haploinsufficiency, this may be the pathomechanism underlying most cases of isolated SVAS.^{3,9}

We have screened 28 patients with SVAS or other vascular abnormalities for mutations in the sequence of the *ELN* gene. The challenge of this study was therefore to characterize our cardiovascular affected patients in order to define the molecular cause of this disorder.

MATERIAL AND METHODS

Patients

ELN gene was tested among a group of 28 patients. Clinically, all of them presented SVAS or other vascular abnormalities. In some cases family history of SVAS was refereed.

FISH analysis

FISH analysis using the LSI Williams syndrome Region Probe (Vysis, Inc) was performed according to manufacturer's instructions. Deletion of the *ELN* gene was excluded in all of the patients included in the study.

DNA mutational analysis

DNA samples were obtained from peripheral blood of each patient following the salting out procedures.¹⁷ The *ELN* coding region was PCR amplified in different segments that would contain a complete exon, acceptor and donor splicing sites sequences. PCR condition for each exon and the primer sequences used were as previously described by Tassabehji and co-workers.⁶ Single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) was performed by combining three μ L of PCR product with loading buffer, denatured and electrophoresed in a 12% non-denaturing acrylamide for 1:45-3:00 hours at 15°C-5°C using the genephor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and following manufacturer's instructions. Afterwards, when an altered migration profile was detected, PCR amplification product was directly sequenced on an automated sequencer (ABI3100; Applied Biosystems). All the variants detected (putative mutations and polymorphisms) were further analyzed by segregation analysis in the family and by screening 100-200 normal unrelated individuals.

Nomenclature

The nucleotide numbering used in this study follows the one described by Tassabehji and co-workers.⁶

RESULTS

In order to disclose the possibility of a hemizyosity of the *ELN* gene fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed in all patients using the LSI Williams syndrome Region Probe (Vysis, Inc). No deletions were detected and therefore we established that both alleles would be studied when screening *ELN* gene by SSCP analysis.

Mutational analysis of the *ELN* gene in our 28 patients affected of vascular abnormalities allowed us the detection of 11 changes: nine polymorphisms and two possible missense mutations (Table I).

***ELN* polymorphisms**

All polymorphisms detected in this study were single nucleotide changes (SNPs) and among them, three had been previously reported. Six of these SNPs were located in intronic sequences and supposed not to be involved in splicing. The other three were expressed polymorphisms, resulting in two cases in amino acid sequence change. One of these non-conservative changes identified was the 1828G>C (G610R) at exon 26. It is a common polymorphism previously reported with a frequency of allele 1828C estimated in 7% in the Caucasian population.⁹ The other non-conservative change detected in this screening was the 1664A>G (S422G) that has also been previously reported by Tromp and co-workers.¹⁸ It is not known how non-conservative changes would have an effect on the biosynthesis of elastin.

In order to establish the frequencies of the polymorphisms, control samples were screened for all the SNPs detected. The results obtained are displayed in Table II.

Putative *ELN* missense mutations

Two patients had novel missense changes not present in 200 unrelated control samples. Neither of them had been previously reported. In case 1, a conformation variant was detected in exon 22. Direct sequence analysis of genomic amplimers revealed a T to G change in position 1386 of *ELN* gene (data not shown). This substitution replaces a glycine with a tryptophan (G462W). This patient was clinically diagnosed of SVAS at the age of 5 years. Familial segregation study revealed that the father of the patient also presented the same sequence variant but

clinical information was not available. In case 2 and in his not diagnosed mother the exon 26 mutation V645L was present. This substitution affects the last nucleotide of exon 26 (GTA >TTA) and might have a repercussion in splicing due to its proximity to the consensus splice sequence (Figure 1). Clinically, this patient was diagnosed of SVAS when he was 6 years old. It had not been possible to obtain clinical data from his mother or other relatives.

DISCUSSION

The elastin protein is responsible for imparting elasticity to many tissues including skin, lungs and large blood vessels. Elastic fibers of these tissues and organs are comprised of two distinct components, a more abundant amorphous component made of elastin, and the microfibrillar component which is mostly composed of fibrillin and microfibril-associated glycoprotein.¹⁹ The *ELN* gene is a single copy gene of 34 exons localized in humans at 7q11.23. Its initial product, tropoelastin, is a polypeptide of 72 kDa with a primary structure of alternating hydrophobic and lysine-rich sequences. The hydrophobic domains are thought to be responsible for the elastic properties of the protein while the lysine-rich sequences are where the tropoelastin molecules link covalently when secreted, in order to form a highly insoluble network of elastic fibers.²⁰ Since elastin is a major component of the aorta and large arteries, disruption of the *ELN* gene might be expected to cause vascular problems such as SVAS. In fact, several mutational screenings of *ELN* gene have been performed within SVAS patients, and a total of 41 point mutations including splice site mutations, frameshift, nonsense and missense, have been reported.^{3,5-11} However, the detailed sequence events linking *ELN* mutations to SVAS is still unclear. Two mechanisms for this pathology have been proposed: a quantitative defect of elastin (mutations would produce a reduced amount of protein and thus an haploinsufficiency for elastin) or a qualitative defect of the protein synthesized (aberrant tropoelastin would result in abnormal elastic fibers). The first hypothesis appears the most attractive because hemizygoty for the elastin is already established as the mechanism for SVAS in patients with partial deletions involving

ELN gene and in WBS patients. Indeed, the majority of mutations detected in isolated SVAS cases are point mutations that produce premature termination sites. Recently, Urbán and co-workers¹⁰ have shown that many of these mutations produce an unstable mRNA transcript that is rapidly degraded through nonsense-mediated decay, resulting in elastin haploinsufficiency at the RNA level. Therefore, the common mechanism behind the development of this vascular phenotype is likely to be a quantitative deficiency of elastin rather than a qualitative defect caused by a mutant protein product.¹⁰

In an attempt to characterize our SVAS patients and to define the molecular cause of their vascular lesion we have performed a mutational screening of the *ELN* gene. As a result we have detected two novel missense substitutions in two different patients affected by SVAS. We have not performed expression studies but as both changes have not been detected in 200 unrelated control samples we hypothesized that they might be the cause of the phenotype in these patients. In both cases the same changes have also been detected in one of their parents from whom we have no clinical information. Even if they do not present SVAS or any other vascular abnormality it has been reported that disease severity within SVAS families varies from asymptomatic carriers of the mutation to individuals dying in infancy from severe cardiac disease.³ Variable expressivity and reduced penetrance of SVAS is seen in both WBS and non-syndromic SVAS, explaining why some cases require cardiac surgery whereas others do not.²¹ This variability is typical of phenotypes produced by haploinsufficiency, where genetic background is expected to have a major modifying effect.⁶

To date, only 5 missense mutations have been reported among the point mutations described in the *ELN* gene. Two of them (M1V, G/R610Q) have been demonstrated to result in null alleles, since M1V affects the elastin open reading frame and thus interferes with translation, and G/R610Q interferes with splicing.^{9,10} Another missense mutation (A55T) affects the last nucleotide of exon 3, and therefore may probably interfere with the splicing resulting in a reduced synthesis of *ELN* mRNA. The remaining two (P220L and A707D) do not seem to interfere with splicing and if so, then abnormal tropoelastin proteins would be synthesized. In addition, they could

interfere with elastic fiber assembly in a dominant negative manner, resulting in aberrant fiber formation during vasculogenesis and in SVAS.³

One of the two missense mutations that we have detected (V645L) also affects the last nucleotide of exon 26. Although no confirmation has been obtained by expression studies, we speculate that similarly to A55T this substitution would interfere in splicing, perhaps by disrupting the splice site consensus sequence. As for the other missense mutation (G462W) described, we cannot conclude in which molecular way it could affect the production of tropoelastin. Cases of missense mutations like the one reported here have been shown to activate cryptic splice sites and thus induce additional splicing. This substitution has not been detected in 200 controls, but we cannot discard the possibility of being a rare polymorphism as others previously reported (V411G, A418T, P427A and A455T).⁹ Nowadays, there are evidences that indicate that normal elastin function is compatible not only with certain amino acid substitutions, but also with short in-frame deletions and duplications occurring in repetitive regions of the coding sequence.¹⁰ On the basis of these observations, the possibility that these protein variants may have a modifying effect on the risk or course of common arteriopathies, remains to be investigated.

The study of the polymorphisms and their frequencies in a control cohort has revealed significant differences in three of them (IVS2+16 C>A, IVS8+8C>T, IVS11+25C>A). They are over-represented at least 2.5 times in the affected population indicating a possible linkage disequilibrium. However its real implication is still uncertain and more studies are required.

For all these reasons, we highlight the importance that these mutational screenings in the *ELN* gene have in order to elucidate the real role of the elastin protein and its variants in SVAS pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by grant 98TV1110 from ‘Fundació Marató TV3’, Barcelona, Spain, and by grant V2003RedC-07.

REFERENCES

1. Stamm C, Friehs I, Yen Ho S, Moran AM, Jonas RA, del Nido PJ. 2001. Congenital supra-avalvar aortic stenosis: a simple lesion?. *Euro J Cardio-thorac Surg* **19**: 195-202.
2. Milewicz DM, Urbán Z, Boyd C. 2000. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biology* **19**: 471-480.
3. Metcalfe K, Rucka AK, Smoot L, Hofstadler G, Tuzler G, McKeown P, Siu V, Rauch A, Dean J, Dennis N, Ellis I, Reardon W, Cytrynbaum C, Osborne L, Yates JR, Read AP, Donnai D, Tassabehji M. 2000. Elastin: mutational spectrum in supra-avalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet* **8**: 955-963.
4. Ewart AK, Morris CA, Atkinson DL, Jin W, Sternes K, Spalone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. 1993. Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* **5**: 11-16.
5. Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA, Keating MT. 1997. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supra-avalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **7**: 1021-1028.
6. Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M, Read AP. 1997. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supra-avalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **7**: 1029-1036.
7. Boeckel T, Dierks A, Vergopoulos A, Bähring S, Knoblauch H, Müller-Myhsok B, Baron H, Aydin A, Bein G, Luft FC, Schuster H. 1999. A new mutation in the elastin gene causing supra-avalvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* **83**: 1141-1143.
8. Urbán Z, Michels VV, Thibodeau SN, Donis-Keller H, Csiszár K, Boyd CD. Supra-avalvular aortic stenosis: a splice site mutation within the elastin gene results in reduced expression of two aberrantly spliced transcripts. 1999. *Hum Genet* **104**: 135-142.
9. Urbán Z, Michels VV, Thibodeau SN, Davis EC, Bonnefont JP, Munnich A, Eyskens B, Gewilling M, Devriendt K, Boyd CD. Isolated supra-avalvular aortic stenosis: functional haploinsufficiency of the elastin gene as a result of nonsense-mediated decay. 2000. *Hum Genet* **106**: 577-588.
10. Urbán Z, Zhang J, Davis EC, Maeda GK, Kumar A, Stalker H, Belmont JW, Boyd CD, Wallace MR. 2001. Supra-avalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene. *Hum Genet* **109**: 512-520.

11. Dedic J, Weiss AS, Katahira J, Yu B, Trent RJ, Urbán Z. 2001. A novel elastin gene mutation (1281delC) in a family with supravalvular aortic stenosis: a mutation cluster within exon 20. *Hum Mutat* **17**: 81.
12. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT. 1993. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with the supravalvular aortic stenosis. *Cell* **73**: 159-168.
13. von Dadelszen P, Chitayat D, Winsor EJ, Cohen H, MacDonald C, Taylor G, Rose T, Hornberger LK. 2000. De novo 46,XX,t(6;7)(q27;q11.23) associated with severe cardiovascular manifestations characteristic of supravalvular aortic stenosis and Williams syndrome. *Am J Med Genet* **90**: 270-275.
14. Ewart AK, Weishan J, Atkinson DL, Morris CA, Keating MT. 1994. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest* **93**: 1071-1077.
15. Olson TM, Michels VV, Urbán Z, Csiszár K, Christiano AM, Driscoll DJ, Feldt RH, Boyd CD, Thibodeau SN. 1995. A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **4**: 1677-1679.
16. Fryssira H, Palmer R, Hallidie-Smith KA, Taylor J, Donnai D, Reardon W. 1997. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for hemizygous deletion at the elastin locus in patients with isolated supravalvular aortic stenosis. *J Med Genet* **34**: 306-308.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
18. Tromp G, Christiano A, Goldstein N, Indik Z, Boyd C, Rosenbloom J, Deak S, Prockop D, Kuivaniemi H. 1991. A to G polymorphism in *ELN* gene. *Nucleic Acids Res* **19**(15): 4314.
19. Uitto J, Ryhänan L, Abraham PA, Perejda AJ. 1982. Elastin in diseases. *J Invest Dermatol* **79**: 160s-168s.
20. Christiano AM, Uitto J. 1994. Molecular pathology of elastic fibers. *J Invest Dermatol* **5**: 53s-57s.
21. Chowdhury T, Reardon W. 1999. Elastin mutation and cardiac disease. *Pediatr Cardiol* **20**: 103-107.

TABLES

Table I. Spectrum of elastin gene changes detected in the screening of 28 patients with vascular abnormalities. Changes previously reported are indicated in bold (Tromp¹ *et al.*, 1991; Metcalfe² *et al.*, 2000). Missense substitutions detected in this study are underlined.

Nucleotide position	Nucleotide change	Amino acid change	Clinical details
Intron2	IVS2+16C>A	None	SVAS
Intron 8	IVS8+8C>T	None	SVAS
Intron 11	IVS11+25C>A	None	SVAS/Heart murmur
Intron 20	IVS20+17T>C	None	SVAS/IAC
Exon 20	1664A>G	S422G ¹	SVAS
Exon 22	1386T>G	<u>G462W</u>	SVAS
Exon 26	1828G>C	G610R ²	SVAS
Exon 26	1933G>T	<u>V645L</u>	SVAS
Intron 27	IVS27+22T>C	None	SVPS
Exon 28	2094C>T	A698A	CIA
Intron 32	IVS32-34C>T ²	None	SVAS

Clinical details: SVAS: supravalvular aortic stenosis; SVPS: supravalvular pulmonary stenosis; IAC: intra-auricular communication.

Table II. Frequency of the polymorphisms detected in the population affected of vascular abnormalities (n=28) and in a control population (n=100).

Polymorphisms	Frequency in affected population (%)	Frequency in control population (%)
IVS2+16 C>A *	1,78	0,5
IVS8+8 C>T *	3,75	1,5
IVS11+25 C>A *	3,75	1
IVS20+17 T>C	5,36.	12,5
IVS27+22 T>C	1,78	1
IVS32-34 C>T	12,5	9,5
S422G	12,5	19,5
G610R	5,36	10,5
A698A	1,78	1

*Polymorphisms over-represented in affected population.

FIGURES

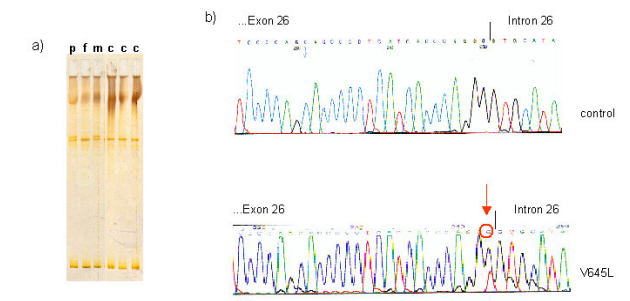


Figure 1. a) SSPCs showing the abnormal migration profile detected in case 2 and in his mother (p: patient; f: father; m: mother; c: control sample) when analyzing the PCR amplification product of exon 26. b) Direct sequence analysis of mutation V645L in case 2 when compared with a control. The red circle and the arrow indicate the nucleotide 1935G>T substitution. Exon-intron boundaries are also marked.

