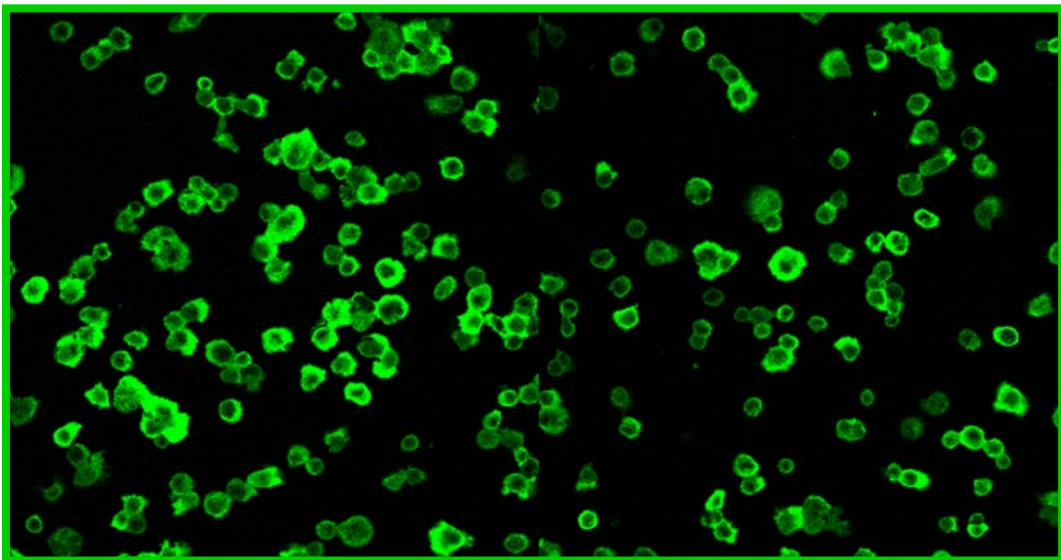


Anna Antonell Boixader

**Evolució molecular i estudi funcional de
gens localitzats a les duplicacions
segmentàries de la regió 7q11.23**



TESI DOCTORAL
Barcelona, abril 2006



Evolució molecular i estudi funcional de gens localitzats a les duplicacions segmentàries de la regió 7q11.23

Anna Antonell Boixader

Memòria presentada per optar al grau de Doctora en Biologia per la Universitat Pompeu Fabra.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Luis Alberto Pérez Jurado.

Tesi Doctoral realitzada a la Unitat de Genètica, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra.

Programa de doctorat en *Ciències de la Salut i de la Vida*, bienni 2001-2003.

Luis Alberto Pérez Jurado

Anna Antonell Boixader

Barcelona, abril 2006

La recerca duta a terme en aquesta tesi ha estat possible gràcies a la beca de formació de personal investigador de la Generalitat de Catalunya (2002-FI00790) i les subvencions del Ministeris d'Educació i Ciència (SAF2001-3941 i SAF2004-6382) i Sanitat i Consum (Red de Investigación C03/07), Genoma España (JLI/038) i la Fundació Jérôme Lejeune.



*Als meus pares,
a la Isabel,
a l'Albert*

AGRAÏMENTS

Al contrari del què pugui semblar, aquesta part de la tesi no és de les més fàcils, ja que sovint és més difícil expressar els sentiments que els resultats i perquè la memòria et pot jugar males passades. Així, abans de res, voldria disculpar-me per si m'he oblidat algú que creu que hauria d'estar entre aquestes ratlles però no hi és.

Es diu ràpid, però aquests quatre anys i mig, quasi cinc, han representat per a mi una etapa molt important de la meua vida. I la veritat és que sense l'ajuda i recolzament de tota la gent que he conegut i dels que ja coneixia que han continuat al meu costat, no hauria pogut fer aquest somni realitat. Gràcies de tot cor.

Al Luis, per haver-me donat l'oportunitat de fer el doctorat i haver estat un director de tesi exemplar, per la seva gran capacitat de treball i vocació per la investigació. Per les moltes coses que he après, pel seu temps tot i no tenir-ne. Moltes gràcies.

Al Xavier, per la seva gran dedicació, entrega i entusiasme a ensenyar-me com fer els estudis evolutius, per l'ordinador, per l'amistat. Malauradament tu em vas fer adonar que la vida és fugissera i que cal viure cada moment intensament. Mai t'oblidaré.

Al Paco, pel seu bon humor, per l'optimisme, per trobar sempre el costat positiu dels experiments encara que no sortissin bé. Per tot el què he après de cultius cel·lulars i estrès oxidatiu.

Al laboratori de Genètica, pel companyerisme i suport en tot moment. Tots i cadascun de vosaltres heu contribuït amb el vostre granet de sorra a aquesta tesi: Marivi, Benja, Helena, Miguel, Susanna, Mireia, Olaya, Miguel, Xavi, Esther i Oihana; També els que ja no són al laboratori: Blanca, Mònica, Bru, Magano, Roser, Mireia i Núria. Voldria agrair especialment a algunes persones amb les que he conviscut més temps: al Jaume, per mantenir el laboratori sempre endreçat i ordenat, per les estonetes a les 8 del matí a les classes de doctorat. Al Jesús per ajudar-me sempre que he tingut un problema informàtic, sense tu no sé com m'ho hauria fet amb les figures!! A la Raquel, perquè quan vaig començar em vas ensenyar com funcionava el laboratori, les PCRs,...però sobretot, per l'amistat durant tots aquests anys. A la Ivon, per l'amistat, per escoltar-me, pels seus bons consells.

A les persones de la universitat que d'alguna manera m'han ajudat: la Mireia, la Cristina, la Kati, el Francesc, el Josep, l'Olga, als d'immuno pel pHímetre.

Al Jordi, per la seva orientació a l'hora de començar el doctorat.

A tota la gent que vaig conèixer a Boston i que van fer que la meua estada fos una experiència molt positiva, tant a nivell personal com científic.

A tots els que voluntàriament vau donar sang per fer experiments.

Als pacients amb la SWB i les seves famílies, per la seva col·laboració i confiança en la recerca.

Als amics, Núria, Eli, Xavi, Jordi, Montse, Cèlia, Laura i Anna, perquè de tant en tant aguantaveu les meves penes i alegries del doctorat, per l'amistat. En especial a l'Ester, perquè compartim molts punts de vista i hem seguit camins molt semblants des que ens vam conèixer a la carrera, per la seva visita a Boston.

Als meus pares, per haver-me recolzat en tot moment, per l'estimació, per animar-me quan vaig decidir fer Biologia i després el doctorat.

A la Isabel, perquè sempre he pogut comptar amb tu, perquè a part de germana has estat per a mi una bona amiga. A l'Eduard perquè sempre m'has animat i has mostrat interès per com anaven les coses.

A l'Agustina, la Sílvia i el Rubèn per fer-me costat. A la Queralt, per venir a distreure'm quan estava avorrida a l'ordinador, per la foto, per l'alegria i estimació que transmetes.

A les iaies Enriqueta i Carmeta.

I finalment a l'Albert, per haver-te llegit aquesta tesi quasi tantes vegades com jo, per les aportacions constructives. Però sobretot, per animar-me a seguir endavant en els moments difícils, per la comprensió, per confiar en mi, pel "carinyo" i per infinitat de coses més.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1.- LES DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES	3
1.1.- Tipus de duplicacions segmentàries	3
1.1.1.-Duplicacions segmentàries intercromosòmiques	3
1.1.2.-Duplicacions segmentàries intracromosòmiques	4
1.2.- Mecanismes de generació de duplicacions segmentàries	4
1.2.1.- Duplicacions segmentàries a regions pericentromèriques	5
1.2.2.- Duplicacions segmentàries a regions telomèriques	5
1.2.3.- Duplicacions segmentàries intracromosòmiques	5
1.2.4.- Elements <i>Alu</i> : implicació en la generació de les duplicacions segmentàries	6
1.3.- Implicacions de les duplicacions segmentàries	7
1.3.1.-Evolució gènica	7
1.3.2.-Evolució estructural dels cromosomes	8
1.3.2.1.- Evolució del cromosoma 7	9
1.3.2.2.- Estudis de seqüència per establir filogènies	10
1.3.3.-Plasticitat genòmica	11
1.3.3.1.-Diferències entre espècies	11
1.3.3.2.-Diferències dins d'una mateixa espècie	12
1.3.4.-Malaltia	12
1.3.4.1.-Reordenaments recurrents	12
1.3.4.2.-Reordenaments no recurrents	14
2.- MUTACIONS GENÒMIQUES RECURRENTS A LA REGIÓ 7q11.23	15
ASSOCIADES A PATOLOGIA	
2.1.- La Síndrome de Williams-Beuren	15
2.1.1.- Descripció clínica	15
2.1.2.- Bases moleculars	17
2.1.3.- Correlacions clínico-moleculars	19
2.1.3.1.- Pacients amb delecions parcials	19
2.1.3.2.- Variabilitat fenotípica	19
2.1.4.- Models animals	20
2.1.5.- Les duplicacions segmentàries de la regió 7q11.23	22
2.1.5.1.- Estructura en humans	22
2.1.5.2.- Caracterització en altres espècies	25
2.1.6.- Mecanismes mutacionals	25
2.1.6.1.- La delecio	25
2.1.6.2.- La inversió	27
2.1.6.3.- Els polimorfismes de nombre de còpies	27
2.2.- Transtorn específic del llenguatge-dup(7)(q11.23;q11.23)	27

3.- GENS CONTINGUTS A LES DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES	28
3.1.- El gen <i>NCF1</i>	28
3.1.1.- L'oxidasa NAD(P)H i els seus components	28
3.1.2.- Activació de l'oxidasa NAD(P)H	29
3.1.3.- Paper de l'oxidasa NAD(P)H en la biologia cardiovascular	30
3.1.3.1.-L'oxidasa vascular	30
3.1.3.2.-Espècies reactives de l'oxigen	30
3.1.3.3.-Conseqüències fisiològiques de l'activació de l'oxidasa NAD(P)H	31
3.1.3.4.- L' oxidasa NAD(P)H i hipertensió arterial	31
3.2.- La família de factors de transcripció TFII-I	32
3.2.1.- El gen <i>GTF2I</i>	32
3.2.1.1.- Estructura i propietats de GTF2I	32
3.2.1.2.- Funció de GTF2I en la transcripció	33
3.2.1.3.- Funció de GTF2I en senyalització	33
3.2.2.- El gen <i>GTF2IRD1</i>	34
3.2.3.- El gen <i>GTF2IRD2</i>	35
3.2.3.1.-Estructura del gen i propietats predites de les dues proteïnes funcionals	35
3.2.4.- Evolució de la família TFII-I	36
HIPÒTESIS	37
OBJECTIUS	41
MATERIALS I MÈTODES	45
RESULTATS	49
Capítol 1: Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23	51
Capítol 2: Hemizyosity at the <i>NCF1</i> gene in Williams Beuren syndrome patients decreases their risk of hypertension	69
Capítol 3: Functional analysis of GTF2IRD2	81
DISCUSSIÓ	95
CONCLUSIONS	109
ABREVIATURES	113
BIBLIOGRAFIA	115
ANNEX	137

~ INTRODUCCIÓ ~

1.- LES DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES

Les duplicacions segmentàries (DSs), o també anomenades “Low-Copy Repeats” o duplicons, són regions presents almenys dues vegades en el genoma. S’han definit per consens com a regions d’una llargada variable de >5 kb i que comparteixen una alta homologia de seqüència (>95%). Representen entre el 5-10% del genoma humà i han sorgit durant els últims 35 milions d’anys (Ma) d’evolució. Pel seu mecanisme de producció poden contenir qualsevol tipus de seqüència, incloent gens, pseudogens i seqüències repetitives¹. L’organització de les regions duplicades és complexa i en la majoria dels casos estan formades per mòduls més petits².

La gran homologia i llargada de les DSs ha dificultat molt les tasques d’assemblatge del projecte genoma humà. Per aquest motiu, diversos grups han col·laborat en l’elaboració de noves metodologies per facilitar la seva identificació i la detecció dels possibles errors³⁻⁵. Actualment, tot i que ja estan millor caracteritzades, encara hi ha buits en l’assemblatge del genoma, molts dels quals corresponen probablement a DSs⁶.

1.1.- TIPUS DE DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES

Les DSs es poden classificar en intracromosòmiques (si totes les unitats es troben dins el mateix cromosoma) o intercromosòmiques (alguna de les unitats es localitza en un cromosoma diferent). La seva distribució al genoma no és aleatòria, i cada cromosoma té un percentatge determinat de seqüències duplicades^{1,7} (Taula 1). Així, els cromosomes humans 7, 9, 15, 16, 17, 19, 22 i Y tenen una major proporció de DSs tant inter- com intra-cromosòmiques, mentre que els cromosomes 2, 3, 4, 5, 8, 14 i 20 són els que en contenen menys⁴.

El cromosoma 7 conté un percentatge de DSs del 8.2% (7% intracromosòmiques), amb diferències marcades entre els 2 braços, sent el braç p el que conté més. La distribució espacial de les seves DSs intercromosòmiques està limitada a les regions pericentromèriques i telomèriques. L’homologia entre les DSs intracromosòmiques és >98%, mentre que la majoria de les intercromosòmiques (57.1%) tenen una homologia d’entre el 93-95%, indicant un origen més recent de les primeres. També s’han detectat 11 regions susceptibles de patir reordenaments patològics, caracteritzades per ser regions de 50kb-10Mb flanquejades per DSs de >95% identitat^{8,9}.

1.1.1.- Duplicacions segmentàries intercromosòmiques

Les DSs intercromosòmiques es localitzen preferentment a les regions pericentromèriques i subtelomèriques, amb un enriquiment de 4.5 i 2.7 vegades respectivament, en comparació amb la resta del genoma. La seva identitat de seqüència és d’un 96.5-97.5%³.

1.1.2.- Duplicacions segmentàries intracromosòmiques

Les DSs intracromosòmiques es localitzen a les regions eucromàtiques dels cromosomes, tot i que també mostren un enriquiment de 3.1 vegades a les regions pericentromèriques³. En general es localitzen en un sol braç del cromosoma i estan separades per menys de 10 Mb de seqüència única². La seva identitat de seqüència és molt alta, d'un 97.5-99%, podent ser en alguns casos tant poc divergents com els al·lels (<1 nucleòtid/kb).

Taula 1.- Contingut de DSs del genoma humà. Adaptada de Zhang et al., 2005⁷.

Crom.	Llargada (pb)	Intracromosòmiques		Intercromosòmiques		Total	
		Llargada	%	Llargada	%	Llargada	%
1	245,203,898	6,431,462	2.6	3,964,057	1.6	8,678,912	3.5
2	243,315,028	6,380,301	2.6	3,757,634	1.5	8,935,221	3.7
3	199,411,731	1,646,046	0.8	1,870,056	0.9	2,671,459	1.3
4	191,610,523	2,323,764	1.2	2,547,466	1.3	3,927,792	2.0
5	180,967,295	4,066,897	2.2	2,083,920	1.2	5,208,550	2.9
6	170,740,541	2,048,892	1.2	1,123,050	0.7	2,854,222	1.7
7	158,431,299	10,745,853	7	3,377,000	2.2	12,588,000	8.2
8	145,908,738	1,576,863	1.1	1,694,593	1.2	2,153,612	1.5
9	134,505,819	8,451,476	6.3	4,371,262	3.2	9,403,888	7.0
10	135,480,874	6,460,047	4.8	1,919,342	1.4	7,741,228	5.7
11	134,978,784	4,223,832	3.1	2,147,666	1.6	5,382,256	4.0
12	133,464,434	1,616,743	1.2	1,134,900	0.9	2,582,114	1.9
13	114,151,656	1,451,225	1.3	1,655,399	1.5	2,700,321	2.4
14	105,311,216	282,478	0.3	849,400	0.8	1,116,676	1.1
15	100,114,055	5,520,203	5.5	3,339,498	3.3	7,091,918	7.1
16	89,995,999	7,378,691	8.2	3,456,338	3.8	8,247,312	9.2
17	81,691,216	5,505,106	6.7	1,217,149	1.5	6,432,722	7.9
18	77,753,510	230,844	0.3	1,400,896	1.8	1,627,497	2.1
19	63,790,860	1,763,189	2.8	918,571	1.4	2,531,577	4.0
20	63,644,868	772,190	1.2	1,068,246	1.7	1,369,456	2.2
21	46,976,537	431,633	0.9	1,714,574	3.6	1,734,567	3.7
22	49,476,972	2,303,175	4.7	1,633,388	3.3	3,481,523	7.0
X	152,634,166	3,579,325	2.3	4,550,908	3.0	8,047,172	5.3
Y	50,961,097	6,651,452	13.1	1,462,582	2.9	7,353,078	14.4
Total	3,070,521,116	90,725,550	3.0	53,615,398	1.7	122,996,064	4.0

1.2.- MECANISMES DE GENERACIÓ DE DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES

El genoma humà és especialment ric en DSs comparat amb el d'altres mamífers (ratolí i rata), i encara més si es compara amb genomes d'invertebrats (*D.melanogaster*, *C.elegans*) o llevats¹. Possiblement no hi ha un únic mecanisme de generació, sinó que en poden existir de diferents depenent de l'espècie i la localització cromosòmica. Tot i que encara no es coneix amb certesa, s'han proposat diferents models que intenten explicar com s'han generat les DSs, la seva freqüència, organització i distribució en el genoma.

1.2.1.- Duplicacions segmentàries a regions pericentromèriques

S'han proposat diverses hipòtesis per explicar la distribució preferencial a les regions pericentromèriques:

- a) La baixa densitat gènica dels centròmers permetria la relaxació de la selecció purificadora, augmentant la tolerància a la incorporació de nou material genètic ja que aquesta no tindria efectes adversos per l'organisme¹⁰. Si aquesta hipòtesi fos certa, s'esperaria una correlació negativa entre densitat gènica i contingut de DSs per a cada cromosoma. Contràriament, però, es troba una correlació significativament positiva entre densitat gènica relativa i el contingut de DSs intracromosòmiques, sent els tres cromosomes amb més densitat gènica els que presenten un percentatge més alt de DSs^{3,4}.
- b) La supressió de la recombinació en aquestes regions del genoma implicaria que les DSs no es deleccionessin amb la mateixa facilitat que en altres regions¹.
- c) L'existència de seqüències facilitadores d'integració de transposons en les regions pericentromèriques fa pensar en un model d'integració basat en aquestes. A favor d'aquesta hipòtesi hi ha el fet que en molts casos es troben repeticions riques en (A+T) o (G+C) als extrems de les DSs^{11,12}.

1.2.2. Duplicacions segmentàries a regions telomèriques

Molt recentment s'ha proposat un model de 2 fases per explicar la distribució preferencial en aquestes regions¹³: (i) Primer es produeix una duplicació a un nou cromosoma, per transposició d'ADN o més probablement per translocacions. Les translocacions poden generar-se per una reparació errònia mitjançant unió d'extrems no homòlegs o recombinació homòloga. (ii) Posteriorment hi hauria possibles interaccions entre duplicats de diferents cromosomes, amb transferència de seqüència recíproca o no recíproca.

1.2.3.- Duplicacions segmentàries intracromosòmiques

El fet que moltes DSs es troben disperses per tot el genoma en comptes d'estar localitzades en tàndem va en contra de la recombinació desigual durant la meiosi com a mecanisme primari de dispersió. Tampoc hi ha evidències de repeticions directes curtes als llocs d'integració, excloent la ruptura de doble cadena seguida de reparació com a mecanisme¹⁴. Per altra banda, la transducció mediada per elements L1 també sembla improbable, ja que aquest procés només transposa fragments de mida limitada (<1 kb) en condicions experimentals¹⁵.

S'ha proposat un model de dos passos per la generació d'aquestes DSs basat en una de les seves característiques, la seva proximitat a altres DSs aparentment no relacionades formant zones de duplicació¹: (i) Un *locus* progenitor inicial es duplica i transposa una còpia en una regió cromosòmica que està acceptant seqüències duplicades. Una sèrie d'aquests

successos crea un mosaic de segments duplicats provinents de diferents regions del genoma. (ii) Posteriors duplicacions de fragments més llargs d'aquestes zones de duplicació permeten la creació de blocs més grans (Figura 1).

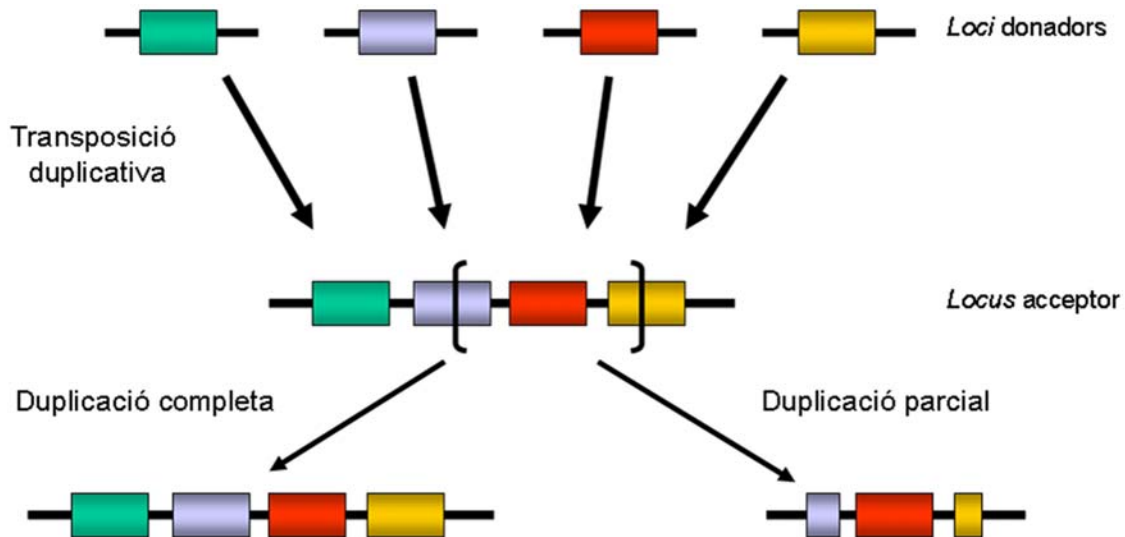


Figura 1.- Model per la generació de DSs intracromosòmiques. Les regions acceptores del genoma adquireixen segments de material genòmic de regions no relacionades (*loci donadors*) a través de transposició duplicativa. Aquests esdeveniments són independents al llarg del temps i resulten en la formació de blocs més llargs de seqüències duplicades que tenen una estructura mosaic. Esdeveniments posteriors dupliquen porcions d'aquesta estructura a altres regions del genoma. Els reordenaments (delecions i inversions) poden alterar l'estructura d'aquestes regions. Adaptada de Samonte i Eichler, 2002¹.

1.2.4.- Elements *Alu*: implicació en la generació de les duplicacions segmentàries

En humans, l'element *Alu* típic és una seqüència d'~300 pb, variable en funció de la llargada de la cua 3' oligo(dA), que consisteix en dues subunitats semblants relacionades amb l'ARN 7SL i connectades per una regió rica en adenines. Són membres de la família de retroposons SINE (*Short Interspersed Element*)¹⁶. La seva amplifacació es dona per retrotransposició d'un trànscrip *Alu* derivat de l'ARN polimerasa III. Els elements *Alu* són específics de primats i representen més d'un 10% del genoma humà¹⁷. Durant els últims 65 Ma, s'han propagat fins arribar a més d'un milió de còpies en el genoma de primats, resultant en la generació d'una sèrie de subfamílies de diferents edats evolutives: la subfamília *Alu-J*, molt semblant a l'ARN 7SL i activa fa 65-40 Ma, i la subfamília *Alu-S*, que pot ser dividida en més branques i activa fa 25-45 Ma¹⁸.

Els elements *Alu* poden afectar al genoma de diferents maneres: mitjançant la generació de mutacions per inserció i alteració de l'expressió gènica, i causant reordenaments genòmics (delecions, duplicacions i translocacions) per recombinació homòloga entre diferents elements *Alu* dispersos^{16,19}.

S'ha associat la generació i estructura de les DSs amb els elements *Alu* perquè s'ha detectat un enriquiment molt significatiu ($P < .0001$) d'aquests elements al voltant o en les unions de DSs respecte a la resta del genoma. A més a més, els elements *Alu* mostren una major divergència en aquestes regions, la qual cosa és coherent amb una recombinació *Alu-Alu* com a mecanisme. Aquest enriquiment és només per a les subfamílies més joves, mentre que per la subfamília més antiga, *Alu-J*, no s'observa. Tot això ha permès elaborar la hipòtesi segons la qual l'augment d'elements *Alu* específicament en primats fa 35-40 Ma va sensibilitzar el seu genoma ancestral a les recombinacions mediatades per elements *Alu*, les quals podrien haver iniciat l'expansió de DSs²⁰. En els últims anys, diferents treballs han confirmat el possible paper dels elements *Alu* en la generació de les DSs, com per exemple en les repeticions de 17p proximal i les duplicacions de la regió 22q11.2, que semblen haver-se originat per recombinació mediada per elements *Alu* durant l'evolució²¹⁻²³.

1.3.- IMPLICACIONS DE LES DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES

1.3.1.- Evolució gènica

Fa 36 anys, Susumu Ohno va postular que la mutació puntual, el reordenament de material genètic i sobretot la duplicació haurien estat esdeveniments clau en el procés d'evolució dels genomes. En el seu treball, S. Ohno apuntava que les duplicacions de genomes sencers (poliploïdització) i les duplicacions de gens creaven una redundància gènica que permetia l'acumulació de noves mutacions i, eventualment, l'evolució de noves funcions, sense el constrenyiment evolutiu de mantenir la funció original que era retinguda per una de les dues còpies. Però l'evolució per poliploïdia va ser possible només als estadis inicials d'evolució dels vertebrats, fa 450-550 Ma, ja que l'aparició dels cromosomes sexuals la va fer inviable. Des de llavors, la innovació està limitada a duplicacions regionals de seqüències curtes²⁴.

La comparació de seqüències entre diferents espècies ha permès determinar que un procés de tetraploïdització hauria creat les α i β -globines i el clúster dels gens Hox presents en tots els vertebrats. Per altra banda, els diferents gens de les famílies de gens olfactoris i dels antígens carcinoembrionaris haurien estat produïts per fenòmens d'endoduplicació^{25,26}. Així, els genomes de mamífers han sofert un elevat nombre de processos de duplicació recent, i el nombre de gens originats per aquest mecanisme és força important^{4,27}.

Analitzant la funcionalitat d'alguns gens continguts en les DSs s'ha detectat un augment significatiu de gens involucrats en immunitat (anticossos, antígens de grup sanguini, citoquines, interferons i altres), interaccions de superfície de membrana (HLA, galectines, antígens carcinoembrionaris), detoxificació de fàrmacs (citocrom P450), creixement /desenvolupament (somatotropines) i reproducció (gonadotropines coriòniques, glicoproteïnes específiques d'embaràs, diferenciació sexual)^{4,5}.

Tot i que encara no es coneix del cert per quins processos evolutius es progressa des de l'estat de redundància funcional inicial fins a la situació estable en què les dues còpies del gen són mantingudes, sí que hi ha evidències dels destins que han seguit moltes d'aquestes

còpies^{28,29}. Així, la teoria suggereix quatre sortides alternatives per l'evolució dels gens duplicats:

- **No funcionalitat**

És el destí més probable de les noves còpies generades per duplicació, ja sigui perquè (i) no contenen una estructura correcta d'exó/intró o no han preservat les estructures promotores, o (ii) per acumulació de mutacions que n'aboleixen la funcionalitat^{28,30}. Aquest procés és permès per l'evolució perquè es manté una còpia intacta del gen i es preserva la funció original.

- **Sub-funcionalitat**

Ambdues còpies poden resultar parcialment compromeses a nivell funcional per acumulació de mutacions, fins al punt que són necessàries les dues còpies per mantenir la mateixa funció que la còpia única ancestral^{31,32}. Recentment s'estan acumulant evidències que apunten que el procés de sub-funcionalització podria ser un pas intermig, de manteniment de les dues còpies funcionals, cap a la neo-funcionalitat³³.

- **Neo-funcionalitat**

La conseqüència més important i a la vegada menys probable de la duplicació gènica és l'evolució d'una nova funció biològica. Així, mentre que la còpia ancestral manté la funció original, la nova còpia adquireix una funció proteica lleugerament modificada o millorada, que suposa un avantatge evolutiu per l'organisme portador i esdevé preservada per selecció natural¹. Alguns exemples són la visió tricromàtica i la funció antipatogènica de la proteïna catiónica d'eosinòfils^{34,35}.

La juxtaposició de diferents DSs amb mòduls que contenen exons fa possible la creació de transcrits i proteïnes de fusió totalment nous que poden adquirir noves funcions². La tendència de les DSs a integrar-se en llocs on prèviament n'hi havia d'altres incrementa la possibilitat que aquest fenomen tingui lloc. Així, s'han descrit alguns exemples de transcrits quimèrics entre gens endògens i porcions exòniques de DSs³⁶⁻³⁸.

- **Hiper-funcionalitat**

Si un gen es duplica en la seva totalitat (incloent regions reguladores) i cap de les dues còpies acumula mutacions, podria crear-se una situació d'increment de la funció original en comptes de l'aparició d'una nova funció o la pseudogenització d'una de les còpies.

1.3.2.- Evolució estructural dels cromosomes

Els homínoids presenten entre ells un alt grau d'homologia de seqüència i diversos reordenaments cromosòmics.

Mitjançant anàlisis comparatius de bandes G d'alta resolució en primats s'ha vist que 18 dels 23 parells de cromosomes humans són idèntics als de l'ancestre comú dels homínoids. Els grans reordenaments estructurals que distingeixen els cromosomes d'aquests primats són 9 inversions pericèntriques, una inversió paracèntrica i una fusió telomèrica³⁹. La importància

biològica d'aquestes diferències a nivell citogenètic és desconeguda, però s'ha postulat que aquests reordenaments podrien actuar com a barreres genètiques, facilitant així la creació de dues espècies diferents a partir d'una població que ocupa la mateixa localització geogràfica, com a conseqüència d'una fecunditat i/o fertilitat reduïda de les espècies híbrides^{1,40}. Tot i que encara és una qüestió discutida, s'ha postulat que aquells gens que, entre ximpanzé i humà, es troben en regions cromosòmiques reordenades haurien evolucionat més ràpid que els de regions no reorganitzades, de manera que els reordenaments estructurals ajudarien a accelerar el procés d'especiació⁴¹⁻⁴³.

La caracterització a nivell de seqüència dels punts de ruptura dels reordenaments ha estat molt útil per poder hipotetitzar sobre el seu possible origen i causa. Estudis comparatius de la sintènia entre humà i ratolí han mostrat que les DSs estan clarament enriquides en llocs de trencament de la sintènia^{44,45}. D'altra banda, els estudis comparatius a nivell molecular entre diferents primats també han aportat molta informació sobre la naturalesa dels reordenaments evolutius. En alguns casos d'inversions entre humans i ximpanzés s'han identificat DSs als punts de ruptura, com a mínim en el genoma que ha patit el reordenament⁴⁶⁻⁵⁰. També s'han identificat duplicons en altres reordenaments que han tingut lloc en altres línies de primats, com en la t(4;19) de goril·la⁵¹. Un anàlisi recent de 802 marcadors genètics en macaco rhesus (*Macaca mulatta*) ha permès identificar la presència de DSs flanquejant els reordenaments evolutius que diferencien els cromosomes de macaco dels humans⁵².

Tot i així, la relació causa-efecte entre DSs i reordenaments cromosòmics encara no està del tot clara, ja que també s'ha proposat que les DSs podrien ser la conseqüència del procés de reordenació mateix. No obstant, sembla que la hipòtesi de que les DSs predisposarien els cromosomes als reordenaments al proporcionar motlles per recombinació homòloga no al·lèlica (RHNA) té més força, ja que en alguns casos s'ha demostrat que la presència de DSs és prèvia a l'esdeveniment del reordenament¹.

1.3.2.1.-Evolució del cromosoma 7

El cromosoma 7 es diferencia dels seus ortòlegs per una sèrie de reordenaments estructurals visibles a nivell de cariotip. El cromosoma 7 en humans té el mateix patró de bandes G que el seu ortòleg en el ximpanzé (cromosoma 6). Aquests dos es diferencien de l'ortòleg en goril·la (cromosoma 6) per una inversió paracèntrica, i aquests tres respecte el d'orangutà (cromosoma 10) per una inversió pericèntrica (Figura 2 A)^{39,53}. Els punts de trencament de la inversió pericèntrica es van localitzar a 7p22 i 7q11.23-q21, i els de la paracèntrica a 7q11.23-q21 i 7q22³⁹. Recentment, s'ha realitzat una caracterització més detallada d'aquests punts, demostrant la presència de 3 ó 4 de diferents entre les dues inversions⁵⁴. Anàlisis per Hibridació *In Situ* Fluorescent (FISH) amb BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) de la regió 7q11.23 van demostrar la presència de DSs en gairebé tots els punts de trencament dels reordenaments que han tingut lloc durant l'evolució dels homínids⁵⁵ (Figura 2 B).

A nivell submicroscòpic, s'han detectat moltes inversions entre el genoma del ximpanzé i humà. Aquestes estan distribuïdes per tot el genoma i els seus tamanys varien entre 23 pb i 62 Mb. Concretament, s'han detectat 10 inversions al cromosoma 7 que han estat validades per altres mètodes no informàtics⁵⁶. El gran nombre d'inversions detectades entre aquests dos genomes suggereix que les inversions són una font important de variació en l'evolució del genoma dels primats.

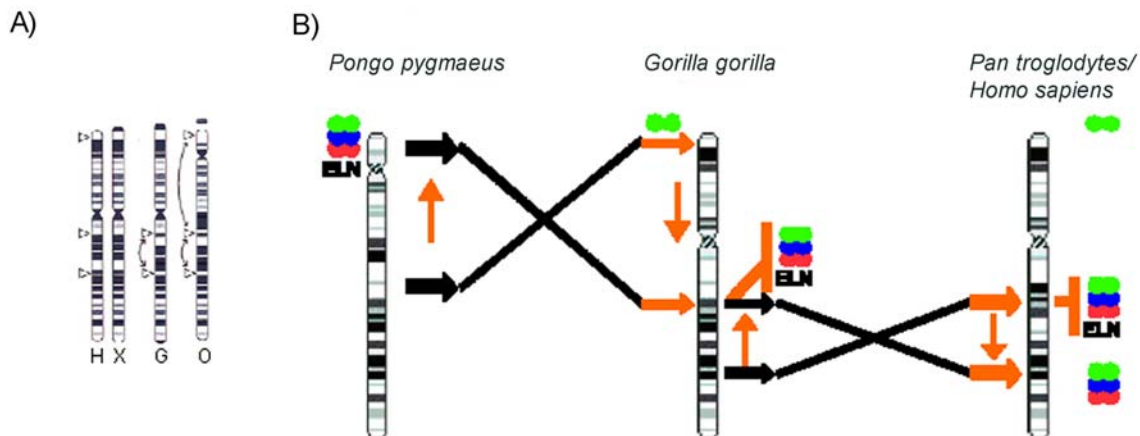


Figura 2.- Evolució estructural del cromosoma 7 en homínids. A) Idiogrames dels ortòlegs del cromosoma 7 humà (H) indicats com a X (ximpanzé), G (goril·la) i O (orangutà). Els trinagles assenyalen els punts de trencament de les inversions que han tingut lloc durant l'evolució dels homínids. B) Representació de les inversions que han tingut lloc entre orangutà (*Pongo pygmaeus*), goril·la (*Gorilla gorilla*), ximpanzé (*Pan troglodytes*) i humà (*Homo sapiens*). Les fletxes horitzontals indiquen aproximadament la banda cromosòmica implicada en els reordenaments. En colors es mostren els resultats obtinguts mitjançant FISH amb BACs de regions duplicades properes als punts de trencament (239C10, 204 i 611E3) i el gen de l'ELN. Adaptada de De Silva et al., 1999⁵⁵ i Korenberg et al., 2000⁵⁷.

1.3.2.2. Estudis de seqüència per establir filogènies

Els estudis de genòmica comparada en primats contribueixen a la identificació de diferències que han conduït a l'especiació divergent⁵⁸. La recent publicació del genoma del ximpanzé ha permès fer una comparació del genoma global humà-ximpanzé. Posant èmfasi en el contingut de DSs de les dues espècies, s'ha vist que el contingut en DSs aporta una divergència entre els dos genomes del 2.7%, mentre que les substitucions nucleotídiques representen tan sols l'1.2%^{59,60}. El 33% de les DSs que existeixen en humans no existeixen en ximpanzés, però també existeixen algunes DSs específiques de ximpanzés (92 regions *versus* 296 en humans)⁶⁰. S'ha estimat que la taxa de duplicació genòmica és de 4-5 Mb per cada milió d'anys des de la divergència d'humans i ximpanzés⁵⁹. Una gran proporció dels gens continguts en les duplicacions específiques d'espècie mostren diferències a nivell d'expressió gènica, generalment sobrerregulació a favor de l'espècie amb la duplicació⁵⁹.

Les divergències a nivell nucleotídic entre homínids calculades a partir de regions autosòmiques no repetitives són: per humans i ximpanzés $1.24\% \pm 0.07\%$, humans i goril·les

1.62% \pm 0.08%, humans i orangutans 3.08 \pm 0.11%, ximpanzés i goril·les 1.63% \pm 0.08%, ximpanzés i orangutans 3.12% \pm 0.11% i goril·les i orangutans 3.09 \pm 0.11%. Assumint que l'especiació d'orangutans va tenir lloc fa 12-16 Ma, s'estima que la de goril·la va ser fa 6.2-8.4 Ma i la divergència d'*Homo-Pan* fa 4.6-6.2 Ma⁶¹ (Figura 3).

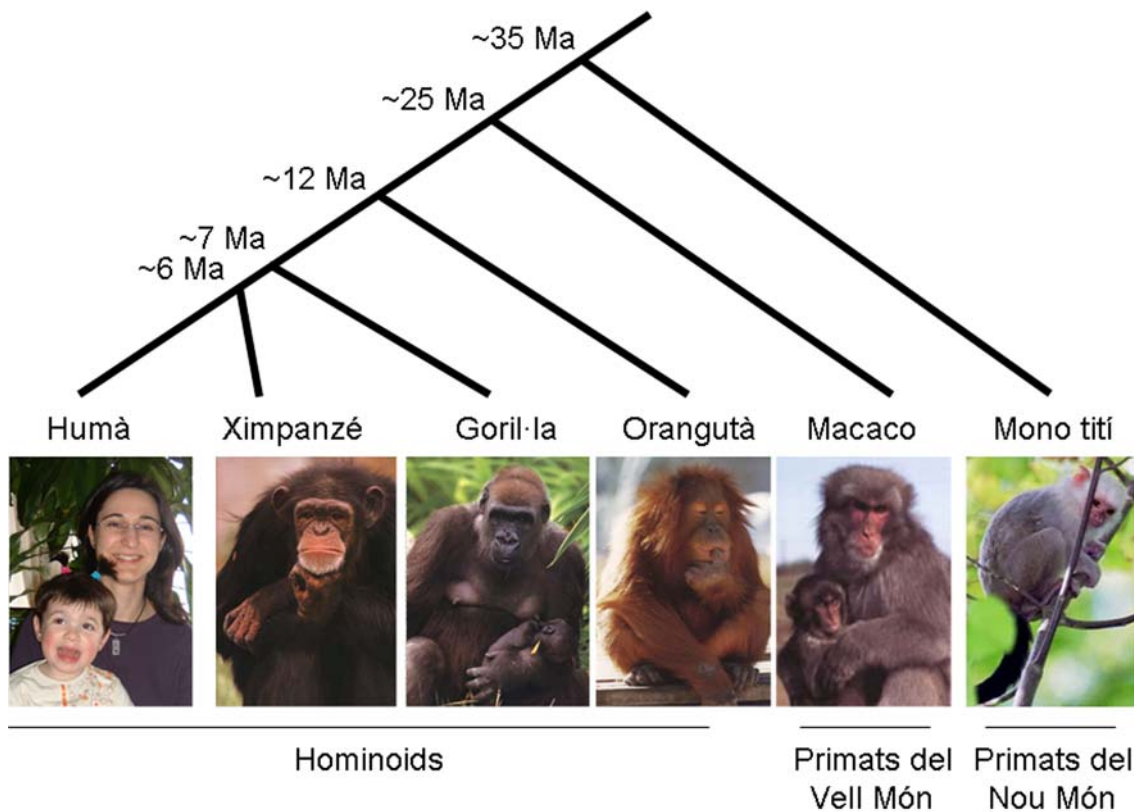


Figura 3.- Filogènia de primats. Filogènia generalment acceptada dels primats del Nou Món, Vell Món i hominoides. Es mostren els temps estimats de divergència en milions d'anys (Ma). Adaptada de Samonte i Eichler, 2002¹.

1.3.3.-Plasticitat genòmica

1.3.3.1.-Diferències entre espècies

Entre el genoma humà i el dels primats superiors s'han observat diferències en el nombre de còpies i localització de les DSs, majoritàriament als centròmers i telòmers^{13,62,63}. També s'han detectat canvis més subtils en el nombre de còpies de DSs intracromosòmiques, els quals normalment són coherents amb les relacions filogenètiques de les espècies implicades.

La datació de l'aparició de DSs pot ser confusa a partir del rellotge molecular degut a l'homogeneïtzació de les còpies paràlogues mitjançant conversió gènica, la qual cosa fa que

els paràlegs no evolucionin segons una taxa de mutació neutral². Per això, en moltes regions s'ha utilitzat una aproximació de múltiples tècniques per reconstruir els reordenaments que resulten en aquesta complexa arquitectura genòmica.

Alguns exemples de regions de les quals es coneix l'evolució de les DSs en primats són:

- Regió cromosòmica 17p12, implicada en la neuropatia de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A (CMT1A), que són presents només en ximpanzés i humans^{21,22}.
- Regió cromosòmica 17p11.2, implicada en la Síndrome d'Smith-Magenis (SMS), que es van originar fa ~ 40-65 Ma, després de la divergència dels primats del Nou Món i els pre-primats⁶⁴.
- Regió cromosòmica 15q11-15q13, implicada en la síndrome de Prader-Willi o la síndrome d'Angelman (SA), que s'estima que van sorgir fa ~15-20 Ma⁶⁵.
- Regió cromosòmica 22q11.2, implicada en la Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial, que es van originar abans de la divergència dels primats del Nou món, fa ~ 40 Ma⁶⁶.

1.3.3.2.-Diferències dins d'una mateixa espècie

Els polimorfismes estructurals (inversions/translocacions) o de nombre de còpies (PNCs) (duplicacions/deleccions), descrits recentment, són reordenaments cromosòmics de tamany gran (>30 kb) sense conseqüències fenotípiques i transmesos entre generacions dins d'una mateixa espècie^{67,68}. S'ha detectat un enriquiment d'aquestes variants en les regions flanquejades per DSs, la qual cosa ha fet que s'hipotetitzés que el mecanisme de producció dels polimorfismes podria ser la RHNA entre DSs^{69,70}. Aquestes diferències genètiques estructurals i en el nombre de còpies són prou prevalents per representar variació genètica entre individus i podrien explicar les bases moleculars de la variabilitat fenotípica humana i la susceptibilitat a patir certes malalties^{13,56,71,72}.

1.3.4.- Malaltia

El concepte de mutació genòmica es refereix a la malaltia causada per una modificació del genoma que resulta en una pèrdua, guany o disrupció de la integritat estructural de gens sensibles a dosi^{73,74}. A diferència de les mutacions puntuals, que sorgeixen per errors en la replicació o reparació de l'ADN, les mutacions genòmiques estan causades per mecanismes de recombinació o d'unió d'extrem no homòlegs després d'una ruptura⁷⁵. S'han descrit nombroses síndromes causades per mutacions genòmiques a nivell meiótic, però també poden ser somàtiques i associar-se a càncer⁷⁶.

1.3.4.1.-Reordenaments recurrents

El mal aparellament seguit d'una RHNA és el mecanisme més comú pel qual es produeixen els reordenaments genòmics associats a malaltia (Taula 2). La incidència global de

reordenaments *de novo* coneguts com a causants de malaltia és de 0.7/1000 nascuts vius^{73,77,78}.

Taula 2.- Malalties genòmiques recurrents causades per RHNA entre DSs.

Malaltia	Reordenament cromosòmic	Regió cromosòmica	Tamany (Mb)
Charcot-Marie-Tooth Tipus 1A ^{89,90}	Duplicació	17p12	1.5
Neuropatia hereditària amb paràlisi per pressió ^{73,89}	Deleció	17p12	1.5
Síndrome d'Smith Magenis ⁹¹	Deleció	17p11.2	5
Síndrome dup(17)(p11.2;p11.2) ⁹²	Duplicació	17p11.2	5
Neurofibromatosis tipus 1 ⁹³	Deleció	17p11.2	1.5
Síndrome de Prader-Willi ^{65,94,95}	Deleció	15q11-q13	4
Síndrome d'Angelman ^{65,94}	Deleció	15q11-q13	4
Síndrome dup(15)(q11;q13)/ Autisme ⁹⁶	Duplicació	15q11-q13	4
Síndrome inv dup(15) ⁹⁷⁻⁹⁹	Crom. marcador supernumerari	15q11-15q14	>16
Síndrome de Williams-Beuren ^{100,101}	Deleció	7q11.23	1.55
Síndrome dup(7)(q11.23;q11.23) ¹⁰²	Duplicació	7q11.23	1.55
Síndrom dup(22)(q11.2;q11.2) ^{103,104}	Duplicació	22q11.2	6
Síndrome de DiGeorge/ Velocardiofacial ^{66,105,106}	Deleció	22q11.2	3
Síndrome d'ulls de gat ¹⁰⁷	Crom. marcador supernumerari	22q11.2	3
Síndrome de Sotos ¹⁰⁸	Deleció	5q35	2.2
Infertilitat masculina del AZFa ^{109,110}	Deleció	Yq11.2	3.5
Infertilitat masculina del AZFc ¹¹¹	Deleció	Yq11.2	0.8

Estudis recents han implicat les DSs com a substrats per aquesta RHNA, degut a la seva llargada i alta homologia de seqüència. Segons l'orientació de les DSs i la recombinació intra- o inter-cromosòmica, s'originen els diferents tipus de reordenaments (Figura 4).

La delimitació del punt de ruptura dins de les DSs en una regió relativament petita ha permès identificar en alguns casos seqüències que podrien actuar en *cis* augmentant la predisposició als trencaments de doble cadena. Alguns exemples són: (i) les seqüències χ -like de les DSs involucrades en la Neurofibromatosis de tipus 1, (ii) elements transposables *mariner-like* en les DSs de CMT1A i neuropatia hereditària amb paràlisi per pressió, i (iii) repeticions riques en palíndroms (A+T) en una de les DSs de 22q11 involucrades en la t(11;22)⁷⁹⁻⁸². En altres síndromes també s'ha demostrat una preferència en la posició on es dona la recombinació dins de les DSs, tot i que no s'han trobat elements especials en *cis*, com per exemple en la Síndrome de Williams-Beuren (SWB), la SMS i delecions del cromosoma Y associades a azoospermia i infertilitat⁸³⁻⁸⁵.

A més a més, existeixen polimorfismes que consisteixen en la inversió d'una regió cromosòmica flanquejada per DSs invertides, els quals poden predisposar a reordenaments causants de les mutacions genòmiques, com en el cas dels progenitors de la SWB, de la SA de classe II, o les translocacions 4p16 i 8p23⁸⁶⁻⁸⁸.

TIPUS DE RECOMBINACIÓ

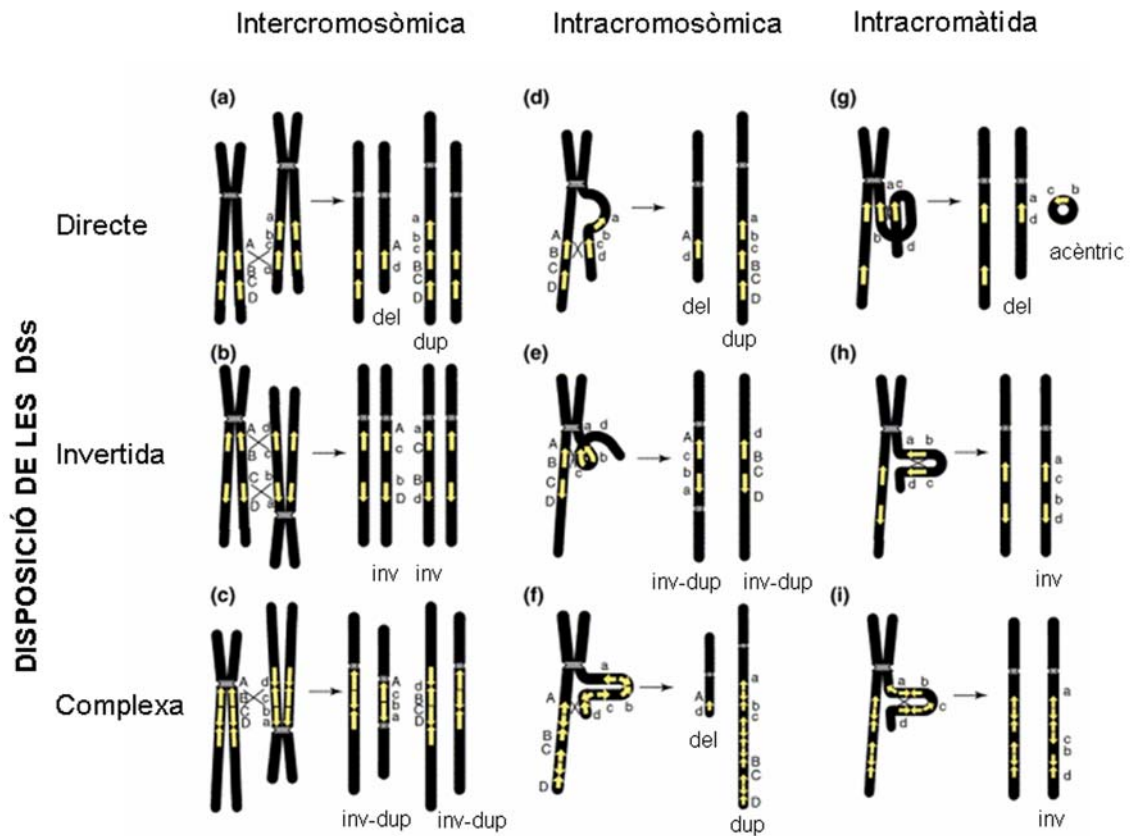


Figura 4.- Representació esquemàtica de RHNA entre DSs com a mecanisme mutacional de les malalties genòmiques recurrents. Les DSs estan representades sobre el dibuix d'un cromosoma com a fletxes grogues que indiquen la seva orientació. Segons la localització i l'organització de les DSs, es poden produir diferents tipus d'entrecreuaments entre les diferents còpies paràlogues i donen lloc a duplicacions (dup), delecions (del), inversions (inv), fragments acèntrics i altres reordenaments més complexos. Adaptada de Stankiewicz i Lupski, 2002⁷⁴.

1.3.4.2.-Reordenaments no recurrents

En el fragment d'unió d'alguns punts de trencament s'ha detectat una seqüència de 12-34 pb d'origen desconegut i comú en els reordenaments generats per unió d'extremes no homòlegs¹¹². En són un exemple diferents translocacions o delecions no recurrents intersticials de la regió 17p¹¹³.

Els reordenaments no recurrents, tot i que no tenen els dos punts de trencament situats en DSs i per tant aquestes no serien el mecanisme mutacional per la seva generació, poden ser propiciats o afavorits per la presència de DSs a la regió¹¹⁴.

2.- MUTACIONS GENÒMIQUES RECURRENTS A LA REGIÓ 7q11.23 ASSOCIADES A PATOLOGIA

2.1.-LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

La SWB (OMIM#194050) és una aneusomia segmentària de la regió cromosòmica 7q11.23, que té una incidència recentment estimada d'1/7,500 nascuts vius¹¹⁵.

2.1.1-Descripció clínica

La SWB presenta una gran variabilitat en el seu fenotip, com demostra la seva descripció inicial com a dues entitats diferents: la hipercalcèmia idiopàtica infantil¹¹⁶ i l'estenosis supralvular aòrtica (ESVA)¹¹⁷. Posteriorment, Williams i col·laboradors¹¹⁸ i Beuren i col·laboradors¹¹⁹ la van descriure com una síndrome que consistia en ESVA, característiques facials distintives i retard mental. Avui en dia se sap que és una alteració genètica amb manifestacions que afecten principalment el teixit connectiu, el sistema endocrí i el sistema nerviós central.

L'afectació vascular, que pot ser progressiva, afecta aproximadament al 75% dels pacients. La manifestació més freqüent és l'ESVA (50-60%), caracteritzada per l'obstrucció de l'aorta ascendent¹²⁰. També pot existir una arteriopatia generalitzada amb afectació de qualsevol de les altres artèries musculars. Un 40% dels adults amb la SWB presenten hipertensió arterial (HTA), que en alguns casos és d'origen renal¹²¹.

L'afectació del teixit connectiu de sosteniment es manifesta per una laxitud articular lleu durant la infància, que posteriorment pot evolucionar cap a escoliosi, cifosi i lordosi, així com a diferents graus de contractures¹²². La debilitat en el teixit connectiu també pot comportar l'aparició d'hèrnies inguinals o diverticulosis intestinals¹²³. La pell normalment és suau, amb disminució de la grassa subcutània i signes d'envelliment prematur. La veu és típicament ronca i aspre.

Les característiques facials dels nens amb la SWB inclouen un estretament bitemporal, plenitud periorbital, plecs epicàntics, patró estel·lat de l'iris, malars plans, galtes caigudes i plenes, pont nasal aplanat amb punta nasal bulbosa, llavis plens, mentó petit i boca ampla amb dents petites i normalment mala oclusió dental¹²³. Aquests trets facials proporcionen un aspecte o *gestalt* característic que s'ha anomenat cara de follet i que és la base pel diagnòstic clínic (Figura 5).

Les manifestacions endocrines més importants afecten al metabolisme del calci i al creixement. La hipercalcèmia es manifesta en l'etapa infantil, desapareixent als 2-4 anys¹²⁴. Els pacients mostren una disminució lleu de l'alçada en l'edat adulta, d'aproximadament 10 cm per sota de la mitjana, degut a la combinació del retard en el creixement prenatal, en el creixement durant la infància i el curt i prematur creixement pubertal¹²⁵.



Figura 5.- Característiques facials dels pacients amb la SWB.

Els pacients amb la SWB mostren un retard mental lleu-moderat, amb una puntuació mitjana en el quocient intel·lectual (QI) de 60, i un rang entre 40 i 90^{126,127}. El seu perfil cognitiu es caracteritza per una integració visual-motora pobre (Figura 6) i una preservació relativa del llenguatge, especialment d'alguns elements com la quantitat i qualitat del vocabulari i l'ús social del llenguatge. També mostren anormalitats en la marxa, possiblement degudes als problemes d'integració visual-espacial¹²⁸.

Una altra característica d'aquests pacients és la hiperacúcia (o disminució de l'umbral en què els sorolls són molestos o dolorosos), que es manifesta en un 96% dels casos. A més a més, la majoria d'ells mostren una resposta emocional més alta a la música i la seva bona memòria auditiva facilita que molts cantin o toquin algun instrument musical¹²⁹.

La personalitat i el comportament dels pacients amb la SWB pot anar canviant al llarg de la seva vida. Durant la infància, són especialment sociables i empàtics, amb tendència a preferir la companyia dels adults¹³⁰. Així, poden arribar a establir una excessiva amistat amb els desconeguts, sense vergonya ni por. Els adults, per contra, en general són menys actius i alegres que els infants, amb unes relacions socials pobres i desinhibides¹³¹. Aproximadament un 70% dels pacients presenten transtorn per dèficit d'atenció, podent també presentar ansietat i fòbies simples^{132,133}.

Malgrat la simptomatologia comentada anteriorment, molts pacients adquireixen certa independència en les activitats de la vida diària, tot i que la majoria continuen vivint a casa dels pares quan són adults i dependent de les seves famílies¹³⁴.

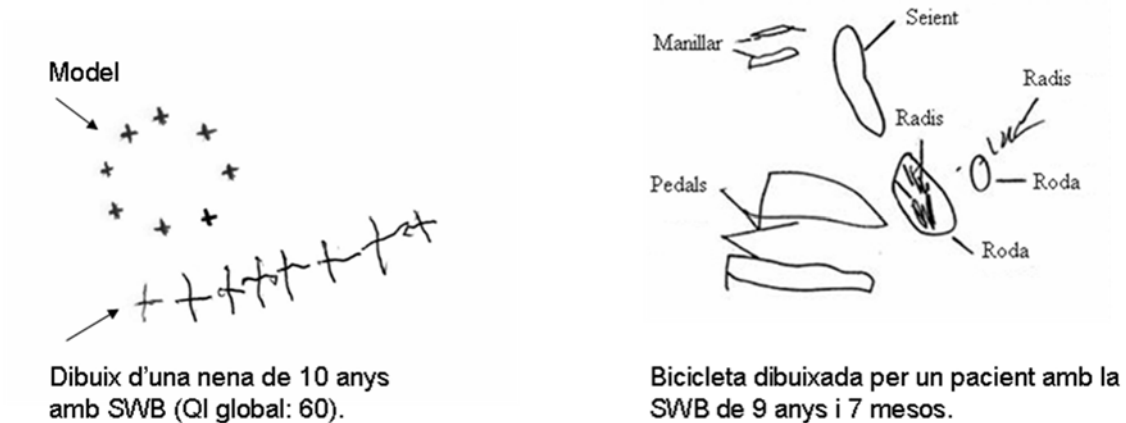


Figura 6.- Dibuixos realitzats per pacients amb la SWB. Aquí es pot observar en dos exemples com els pacients amb la SWB són capaços de dibuixar les parts però no d'integrar-les, degut als seus problemes d'integració visual-espacial.

2.1.2.-Bases Moleculares

La SWB està causada en >98% dels casos per una deleció submicroscòpica en heterozigosis de gens contigus de la regió cromosòmica 7q11.23¹³⁵ (Figura 7). El tamany de l'interval delecionat és d'1.55 Mb en un 90% dels pacients, mentre que en la resta la deleció és més extensa, afectant a un interval d'1.84 Mb⁸³. També s'han descrit alguns casos amb deleccions parcials. L'interval delecionat en la majoria dels casos conté uns 26-28 gens, els quals codifiquen per proteïnes amb una gran varietat de funcions (factors de transcripció, proteïnes estructurals, receptors transmembrana, metiltransferases i proteïnes involucrades en transducció de senyals i tasques neuronals) (Taula 3).

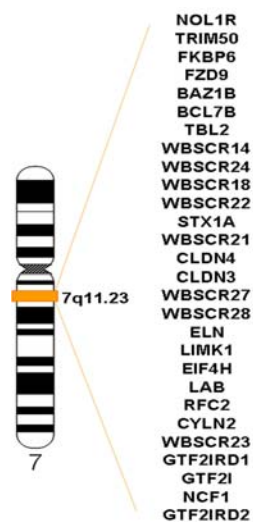


Figura 7.- Esquema del cromosoma 7 humà amb ampliació de la regió 7q11.23. Es poden observar tots els gens de l'interval delecionat, ordenats de centròmer a telòmer.

Taula 3.- Gens deleccionats en la SWB. Els gens es mostren ordenats de centròmer a telòmer.

Gen	Proteïna i Funció proteica
NOL1R/ WBSCR20	<i>NOL1Related</i> . Possible funció de regulació del cicle cel·lular. Té homologia amb la proteïna nucleolar proliferadora P120 ^{136,137}
TRIM50/ WBSCR23	<i>Tripartite motif protein 50</i> . Possible fosfoproteïna nuclear amb dits de zinc. Funció desconeguda ¹³⁸
FKBP6	<i>FK-506 Binding Protein 6</i> . Membre de la família de les immunofilines que és component del complex sinaptonèmic. Funció en fertilitat masculina i aparellament dels cromosomes homòlegs durant la meiosi ^{139,140}
FZD9	<i>Frizzled 9</i> . Receptor transmembrana per proteïnes de tipus Wnt de senyal en desenvolupament. Podria estar implicada en polaritat de teixits i desenvolupament ¹⁴¹
BAZ1B/ WBSCR9/ WSTF	<i>Drosophila Acf1</i> homolog. Forma part del complex WINAC, implicat en l'assemblatge de la cromatina. Possible funció en la regulació de la transcripció ^{142,143}
BCL7B	<i>B-cell lymphoma 7B</i> . Autoantigen relacionat amb IgE en dermatitis atòpica ^{144,145}
TBL2/ WS- βTRP	<i>Transducin β-like 2</i> . Membre de la família de les β-transducines, de funció desconeguda ¹⁴⁶
WBSCR14/ WS-bHLH	Proteïna bàsica Helix-Loop-Helix. Factor de transcripció repressor, que podria tenir un paper en diferenciació cel·lular i/o proliferació ¹⁴⁷
WBSCR24	Proteïna predita. Homologia amb la proteïna de <i>D.melanogaster</i> Mod(r)
WBSCR18	Proteïna predita. Possible funció d'unió a proteïnes de xoc tèrmic i plegament proteic ¹³⁸
WBSCR22	Metiltransferasa predita HUSSY-03 ¹³⁶
STX1A	Sintaxina 1A. Proteïna de membrana pre-sinàptica, involucrada en exocitosis de vesícules que contenen neurotransmissors ^{148,149}
WBSCR21	Proteïna que conté un domini α/β-hidrolasa. Té activitat hidrolasa ¹³⁸
CLDN3 i CLDN4	Membres de la família "Claudin". Receptors per enterotoxines de <i>Clostridium perfringens</i> . Formen part d'estructures <i>tight junction</i> /barreres paracel·lulars en teixits epitelials hepàtics ^{150,151}
WBSCR27	Metiltransferasa predita de la família UbiE/COQ5
WBSCR28	Proteïna predita de funció desconeguda
ELN	Elastina. És el principal component de les fibres elàstiques de la matriu extracel·lular. Funció en la morfogènesis arterial ^{152,153}
LIMK1	<i>LIM-kinase 1</i> . És una quinasa Ser/Thr amb dominis LIM. Implicada en la transducció de senyals en sinapsis neuronals a través de la depolimerització del citoesquelet d'actina ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶
EIF4H/ WBSCR1	<i>Eukaryotic initiator factor 4H</i> . Regulador positiu de l'inici de traducció a nivell d'ARNm ^{157,158}
LAB/WBSCR5	<i>Linker for activation of B cells</i> . Implicada en el desenvolupament normal i activació de cèl·lules B ^{159,160}
RFC2	Subunitat 2 del factor de replicació C. Elongació de l'ADN durant la replicació ^{161,162}
CYLN2	<i>Cytoplasmic linker neuronal protein</i> CLIP-115. Uneix orgànuls al citoesquelet a través de microtúbuls ^{163,164}
WBSCR23	Proteïna hipotètica LOC80112 de funció desconeguda
GTF2IRD1/ WBSCR11	<i>GTF2I-related domain 1</i> . Regulador transcripcional ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷
GTF2I	GTF2I/TFII-I/BAP135/SPIN. Factor iniciador de la transcripció implicat tant en transcripció basal com d'activació ^{101,168}
NCF1	<i>Neutrophilic cytosolic factor 1</i> . Subunitat p47 ^{phox} de l'oxidasa NAD(P)H. Activitat antimicrobial ¹⁶⁹
GTF2IRD2	<i>GTF2I-related domain 2</i> . Possible factor de transcripció ¹⁷⁰

2.1.3.- Correlacions clínico-moleculares

2.1.3.1.- Pacients amb delecions parcials

La descripció de pacients amb delecions parcials ha permès establir algunes correlacions clínico-moleculares (Figura 8).

L'ESVA és l'única manifestació de la SWB que s'ha associat directament amb l'haploinsuficiència d'un gen de la regió, el gen de l'elastina (*ELN*). L'estudi de pacients amb ESVA familiar i esporàdica va mostrar una disrupció del gen *ELN* per translocació, mutacions puntuals o delecions¹⁷¹, establint així la seva contribució a aquest fenotip. El model animal també va confirmar aquesta associació¹⁷².

La contribució que pot tenir el gen de la LIM-quinasa 1 (*LIMK1*) al fenotip és actualment ambigua, ja que els diferents casos descrits són contradictoris. Inicialment, basant-se en 2 famílies amb delecions parcials que afectaven només *ELN* i *LIMK1*, es va proposar que l'hemizigositat per *LIMK1* contribuïa a la mala integració visual-espacial¹⁷³. No obstant, la posterior descripció de tres pacients amb delecions semblants que no mostraven aquest dèficit no ha confirmat aquesta associació^{174,175}. A més a més, s'han descrit dos pacients amb delecions que abarquen la regió entre *BAZ1B* i *EIF4H* (que inclou també els gens *ELN* i *LIMK1*) que presenten ESVA i una mínima alteració cognitiva, la qual cosa exclou que els gens contigus a *ELN* contribueixin significativament al fenotip cognitiu⁵⁷. D'aquesta manera, sembla que la delecio d'una còpia del gen *LIMK1* no és suficient per causar els problemes d'integració visual-espacial, tot i que no es descarta que hi contribueixi en combinació amb la delecio d'altres gens de la regió.

També s'han descrit dos pacients amb el fenotip complet de la SWB que tenen una delecio entre *ELN* i *GTF2I*, la qual cosa suggereix que els gens principalment responsables del fenotip cognitiu es localitzen a l'interval telomèric de la delecio, que inclou els gens *CYLN2*, *GTF2IRD1* i *GTF2I*¹⁷⁶. La descripció d'una delecio semblant que no inclou el gen *GTF2I* va suggerir que *GTF2I* podria contribuir a alguns dels trets craniofacials i en aspectes del perfil cognitiu, com per exemple la integració visual-espacial i el dèficit de QI, ja que els membres afectats presentaven ESVA, absència dels trets craniofacials, dèficits cognitius lleus, personalitat entusiasta i integració visual-espacial normal¹⁷⁷.

2.1.3.2.- Variabilitat fenotípica

Existeix un ampli ventall de variabilitat clínica entre pacients amb la SWB, fins i tot dins de la mateixa família¹⁷⁸. És habitual trobar un rang molt ampli de QI global, així com diferències de puntuació en diferents tests. Però les bases moleculares d'aquesta variabilitat, si n'hi ha, encara es desconeixen, si bé es considera típic de síndromes provocades per l'haploinsuficiència de diversos gens. Es postula que factors ambientals, variants genètiques en l'al·lel no deleccionat, efectes subtils d'imprinting, petites variacions en el punt de ruptura cromosòmic de delecions aparentment del mateix tamany o el fons genètic podrien contribuir a la presentació variable del fenotip.

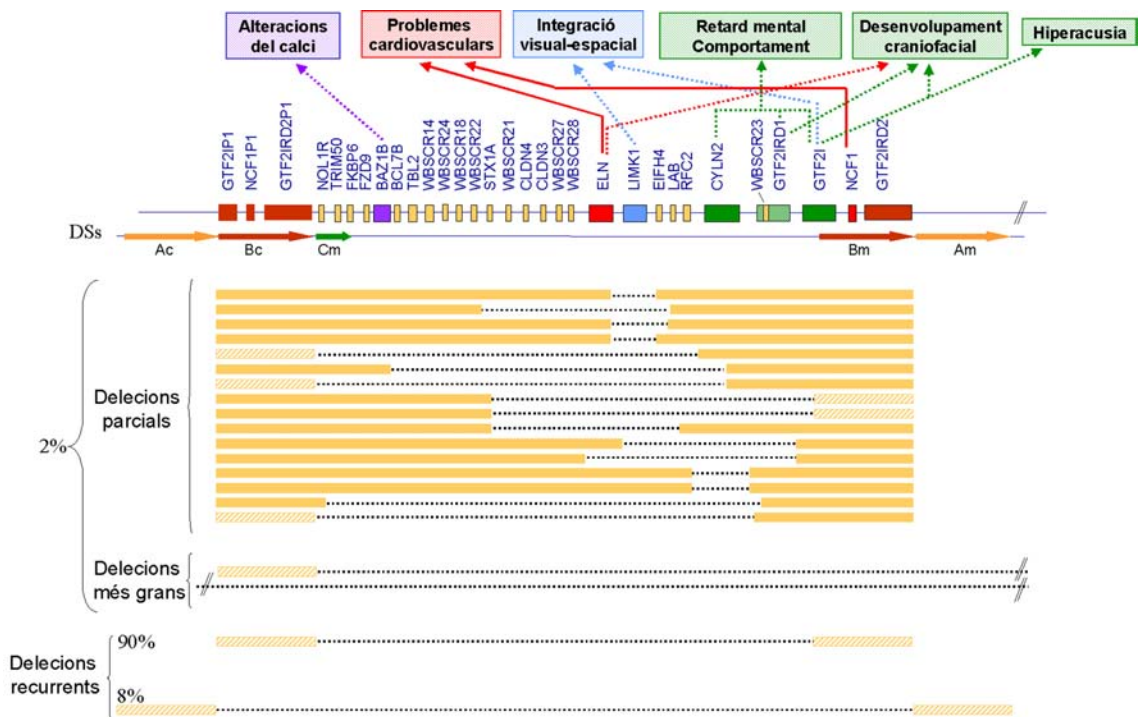


Figura 8.- Representació de les delecions observades en pacients amb la SWB i correlacions gen-fenotip. A la part superior es mostren les contribucions individuals de gens a aspectes concrets del fenotip de la SWB. Amb fletxes contínues s'indiquen les contribucions ja descrites i amb fletxes discontinues les probables però encara no demostrades. A la part inferior es detallen totes les delecions atípiques i el seu interval delecionat, així com l'interval afectat en les delecions recurrents^{9,57,83,175,177,179-183}.

2.1.4.- Models animals

Una altra aproximació per conèixer la rellevància i funció dels gens són els models animals. En l'última dècada la tecnologia per generar-los ha avançat molt, permetent la generació de models que mimetitzen les mutacions trobades en pacients.

Existeix una conservació de la sintènia entre la regió cromosòmica humana 7q11.23 i la cromosòmica de ratolí 5G1-G2¹⁸⁴ (Figura 9). Tot i així, no es disposa d'un model animal que mimetizzi la delecio de la regió completa present en els pacients amb la SWB. Sí que es disposa, però, de diversos models animals en els que s'ha lesionat específicament un gen de la regió. En la taula 4 es presenten aquests models i el seu fenotip més característic. Com es pot observar, només algun dels ratolins *knockout* (KO) (*Eln*, *LimK1*, *Cyln2*, *Fzd9*, *Gtf2i* i *Gtf2ird1*) presenten analogies amb característiques fenotípiques presents en la SWB.

Taula 4.- Animals *knockout* (KO) pels gens de la regió de la SWB.

Gen	Fenotip
<i>Eln</i>	El ratolí KO per <i>Eln</i> és letal durant la gestació o al néixer, ja que l'elastina és essencial per la correcta morfogènesis arterial ¹⁷² . Els heterozigots presenten estenosis aòrtica i d'altres artèries, desenvolupant hipertròfia cardíaca i hipertensió ¹⁸⁵
<i>Cyln2</i>	La deficiència de la proteïna CLIP-115 genera anomalies dendrítiques i dèficit de coordinació motora en els ratolins KO, tant en heterozigots com en homozigots ¹⁸⁶
<i>Limk1</i>	El ratolí KO per <i>Limk1</i> presenta anomalies en la morfologia espinal i alteracions en l'aprenentatge espacial ¹⁸⁷
<i>Gtf2ird1</i>	L'estudi inicial d'un KO per <i>Gtf2ird1</i> no va detectar cap fenotip anormal ¹⁸⁸ . Posteriorment s'han detectat anomalies cràneo-encefàliques ¹⁸⁹ . No obstant, en un altre model generat de manera independent, els heterozigots mostren problemes d'aprenentatge ¹⁹⁰
<i>Fkbp6</i>	Els mascles KO per la proteïna del complex sinaptonèmic FKBP6 presenten tan sols esterilitat per bloqueig de la meiosis ¹³⁹
<i>Chrebp</i> (<i>Wbscr14</i>)	El KO per <i>Chrebp</i> presenta una reducció de la lipogènesis hepàtica amb alteració del metabolisme glucídica, que no afecta l'esperança de vida ¹⁹¹
<i>Fzd9</i>	Els animals KO per <i>Fzd9</i> no presenten característiques de la SWB, però sí que desenvolupen esplenomegàlia, atròfia tímica i amb l'edat limfoadenopaties ¹⁹² . No obstant, en un altre model generat quasi en paral·lel s'han detectat dèficits d'aprenentatge i memòria visual-espacial ¹⁹³
<i>Gtf2i</i>	Els ratolins amb una alteració de la proteïna GTF2I en heterozigosis presenten algiacúsia i dificultats d'aprenentatge, mentre que els homozigots presenten una reducció de l'ansietat i un aprenentatge més ràpid ¹⁹⁴

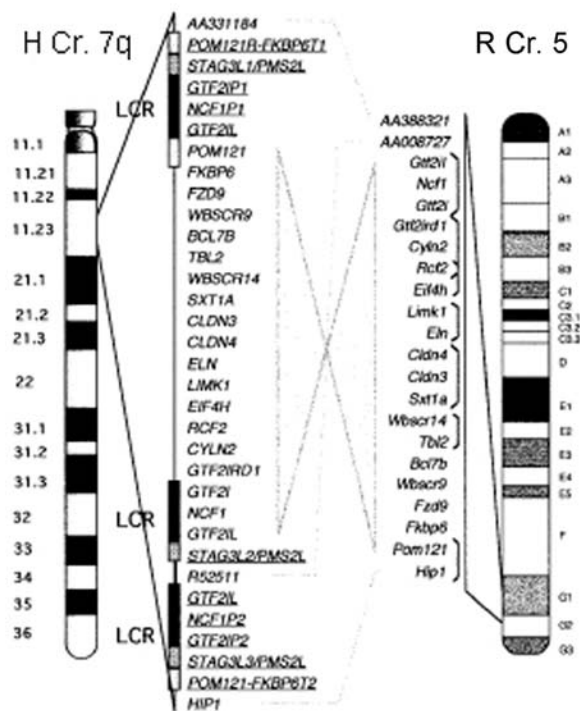


Figura 9.- Sintènia humà-ratolí. L'interval delecionat en humans mostra una conservació total de la sintènia, però amb ordre invertit, amb el ratolí. Adaptada de Valero et al., 2000¹⁹⁵.

2.1.5.-Les duplicacions segmentàries de la regió 7q11.23

La presència de DSs a la regió 7q11.23 es va suggerir per primer cop després d'identificar un marcador polimòrfic de la regió (*D7S489*) que reconeixia almenys tres *loci*^{196,197}. La posterior caracterització dels gens *GTF2I* i *NCF1* i dels seus pseudogens va confirmar l'existència de duplicacions a la regió, juntament amb la caracterització dels gens *STAG3* i *PMS2L*^{101,198-200}.

2.1.5.1.-Estructura en humans

A la regió 7q11.23 existeixen tres grans DSs, anomenades segons la seva posició relativa al centròmer com a DS centromèrica, mitja i telomèrica. Cada duplicació està formada per tres blocs diferents, anomenats A, B i C. És interessant destacar que els blocs de les DSs centromèrica i mitja es troben en la mateixa orientació centròmer-telòmer (en *tàndem*), encara que amb un ordre diferent, mentre que la DS telomèrica es troba en direcció oposada però amb el mateix ordre de blocs que la centromèrica¹⁹⁵ (Figura 10).

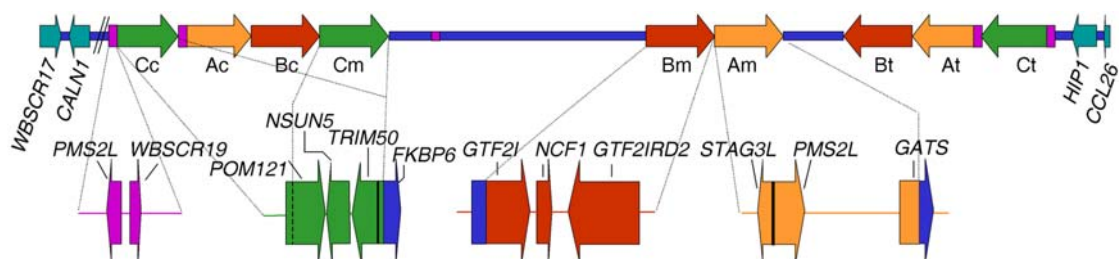


Figura 10.- Estructura de la regió 7q11.23. Esquema de l'estructura de la regió 7q11.23 i contingut gènic de les DSs que en formen part. Els blocs estan representats amb fletxes que indiquen la seva orientació relativa i els subíndexs c, m i t indiquen centromèric, mig i telomèric. El bloc A està representat en groc, el bloc B en vermell i el bloc C en verd. En blau fosc es mostra la regió de gens de còpia única i en lila una regió duplicada comú en alguns blocs A i C. Adaptada d'Antonell et al., 2005²⁰¹.

En la taula 5 queden reflectides les principals característiques de cada bloc, com la seva longitud, les unitats transcripcionals que en formen part i la seva transcripció.

Taula 5.-Descripció de les DSs de la regió 7q11.23. Coordenades i tamany de les DSs de 7q11.23, basat en l'assemlatge de Maig 2004 (hg17, NCBI Build 35), amb el seu contingut gènic i dades d'expressió. La informació d'expressió està basada en tres fonts diferents: descrit en articles publicats, RT-PCR i bases de dades d'ESTs. El signe + indica transcripció, i el - no transcripció. ND es refereix a No Descrit o No Detectat. La columna d'observacions conté informació sobre algunes característiques del gen/pseudogen i les seves proteïnes predites o conegudes. * indica que probablement hi ha un error en l'assemlatge de la seqüència en aquesta regió, ja que hi ha un gap d'aproximadament 400 kb que no existiria. De fet, el tamany del bloc A telomèric és gairebé idèntic al del bloc A centromèric. ** indica que l'homologia entre bloc A de 7q22 i els blocs paràlegs a 7q11.23 és de 118726. No obstant, la seqüència a 7q22 ha sofert posteriorment reordenaments i l'alineament amb 7q11 està dividit en tres parts (d'aproximadament 40, 30 and 30 kb). Adaptada d'Antonell et al., 2005²⁰¹.

	Inici	Final	Tamany	Gens	Expressió	Observacions
Bloc A	Descrit^(ref) / RT-PCR / ESTs					
centromèric	71887009	72033457	146448	STAG3L1	+ ⁽²⁰⁰⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: vari exons d' <i>STAG3 der</i> (ORF 134 aa)
				PMS2L13	+ ⁽¹⁹⁹⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: exons 1-5 <i>PMS2 der</i> + exons addicionals
				WBSCR19	ND / ND / +	Gen predit (ORF 265 aa)
Mig	73730701	73843282	112581	STAG3L2	+ ⁽²⁰⁰⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: vari exons d' <i>STAG3 der</i> (ORF 134 aa)
				PMS2L5	+ ⁽¹⁹⁹⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: exons 1-5 <i>PMS2 der</i> + exons addicionals (ORF 134 aa)
				LOC402670	ND / + / +	Gen ancestral (329 aa)
Telomèric	74667190	74078402	588788	STAG3L3	+ ⁽²⁰⁰⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: vari exons d' <i>STAG3 der</i> (ORF 134 aa)
				PMS2L2	+ ⁽¹⁹⁹⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: exons 1-5 <i>PMS2 der</i> + exons addicionals (ORF 297 aa)
				WBSCR19	ND / ND / +	Gen predit (ORF 265 aa)
7q22	99464465	99583191	118726	STAG3	+ ⁽²⁰⁰⁾ / ND / +	Gen ancestral (1225 aa)
				GATS	ND / + / +	Trànscripció de fusió: exons 1-5 <i>LOC402670 der</i> + exons addicionals (163 aa)
Bloc B						
centromèric	72033655	72139140	105485	GTF2IP1	+ ⁽¹⁰¹⁾ / ND / +	Trànscripció de fusió: exó 1 <i>GATS der</i> - exons 13-35 <i>GTF2 der</i> Proteïna no detectada amb anticossos per <i>GTF2I</i> ⁽²⁰²⁾
				NCF1P1	+ ⁽¹⁹⁸⁾ / ND / +	Proteïna truncada (ORF molt curt)
				GTF2IRD2P1	- ⁽¹⁷⁰⁾ / - / -	Exons 3-16 <i>GTF2IRD2</i>
Mig	73587324	73730691	143367	GTF2I	+ ⁽¹⁰¹⁾ / ND / +	Gen ancestral (998aa)

					NCF1	+ ⁽¹⁹⁶⁾ / ND / +	Gen ancestral (390 aa)
					GTF2IRD2	+ ⁽¹⁷⁰⁾ / + / +	ORF complet (949 aa)
Telomèric	74078076	73934914	143162		GTF2IP2	+ ⁽¹⁰¹⁾ / ND / +	Trànscrip de fusió: exó 1 <i>GATS der</i> - exons 13-35 <i>GTF2I der</i> Proteïna no detectada amb anticossos per <i>GTF2I</i> ⁽²⁰²⁾
					NCF1P2	+ ⁽¹⁹⁶⁾ / ND / +	Proteïna truncada (ORF molt curt)
					GTF2IRD2B	+ ⁽¹⁷⁰⁾ / + / +	Probablement gen ancestral (949 aa)
Bloc C							
centromèric	71808890	71887008	78118		POM121	+ ⁽¹⁰⁰⁾ / + / +	Trànscrip de fusió amb 4 exons 5' <i>RBAK der</i> (ORF complet 984 aa)
					NSUN5P1	+ ⁽¹³⁸⁾ / + / +	ORFs molt curts (mutacions truncadores en pauta)
					TRIM50C	ND / + / +	Proteïna truncada (250 aa)
					FKBP6T1	ND / ND / +	Trànscrip quimèric: exons 1-4 <i>FKBP6 related</i> + exó addicional
					WBSR19	ND / ND / +	Gen predict (ORF 172 aa)
Mig	72145098	72189105	44007		POM121T	ND / - / -	Deleció exons 1-5
					NSUN5	+ ⁽¹³⁸⁾ / + / +	Gen ancestral (466 aa)
					TRIM50A	+ ⁽²⁰³⁾ / + / +	Gen ancestral (487 aa)
					FKBP6	+ ⁽¹⁴⁰⁾ / ND / +	Gen ancestral (327 aa)
Telomèric	74745704	74667191	78513		POM121	+ ⁽¹⁰⁰⁾ / + / +	Gen ancestral (987 aa)
					NSUN5P2	+ ⁽¹³⁸⁾ / + / +	ORFs molt curts (mutacions truncadores en pauta)
					TRIM50B	ND / + / +	Proteïna truncada (250 aa)
					FKBP6T2	ND / ND / +	Trànscrip quimèric: exons 1-4 <i>FKBP6 related</i> + exó addicional
					PMS2L9	+ ⁽¹⁹⁹⁾ / ND / +	Trànscrip de fusió : exons 1-5 <i>PMS2 der</i> + exons addicionals (ORF 179 aa)
					WBSR19	ND / ND / +	Gen predict (ORF 312 aa)

2.1.5.2.-Caracterització en altres espècies

La regió ortòloga en el ratolí no presenta les DSs, però sí que conté tots els gens de còpia única disposats de manera invertida respecte als gens flanquejants en el mapa humà. Cal destacar que els punts de trencament de la inversió cromosòmica entre humans i ratolins es troben localitzats a les DSs presents en humans^{55,195}.

L'absència de DSs a la regió en el genoma del ratolí i en la majoria de mamífers dóna suport a la idea que els successos de duplicació han tingut lloc recentment durant l'evolució dels primats. DeSilva i col·laboradors⁵⁵ van realitzar FISH comparatiu entre diferents espècies de primats amb el BAC RG350L10 (que conté entre altres el pseudogen *PMS2L5*) i van observar múltiples senyals en tots els primats (ximpanzés, goril·les, orangutans i gibons) però no en ratolí. En ximpanzés i goril·les les senyals es van detectar a les regions ortòlogues a 7q22 i 7p22, com en humans. Korenberg i col·laboradors⁵⁷ van realitzar FISH amb sondes de les regions duplicades (239C10 i 611E3) i una de la regió de còpia única (592D8) en orangutans, goril·les, ximpanzés i humans. Els resultats van indicar que la regió 7q11.23 ha estat involucrada en els reordenaments cromosòmics que hi ha hagut entre orangutans i goril·les (inversió pericèntrica) i entre goril·les i ximpanzés (inversió paracèntrica). A més, el BAC 239C10 es troba ja parcialment duplicat a orangutà, i sembla augmentar d'intensitat a cada reordenament, suggerint duplicacions parcials associades a la inversió (Figura 2 B). Per altra banda, Roesler i col·laboradors²⁰⁴ no van trobar evidències de la presència de pseudogens d'*NCF1* ni en ximpanzés ni macacos.

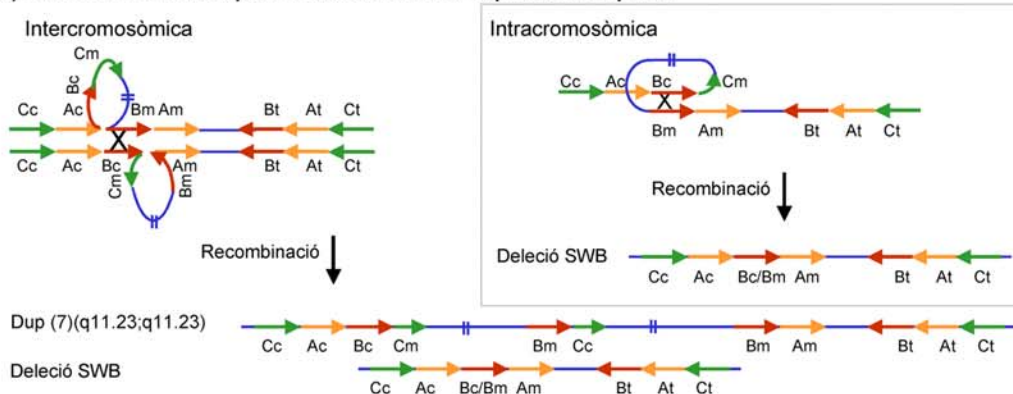
2.1.6.- Mecanismes mutacionals

2.1.6.1.-La deleció

La majoria de casos de la SWB són esporàdics, essent la mutació *de novo*. No obstant, s'han descrit comptats casos de transmissió vertical autosòmica dominant²⁰⁵⁻²⁰⁷. La taxa de mutacions *de novo* aproximada és d' 1.33×10^{-4} per gàmeta i generació, amb una freqüència molt semblant en el cromosoma patern i matern²⁰⁸.

Normalment la deleció és deguda a RHNA⁸³ entre les DSs que flanquegen la regió delecionada (Figura 11 A). La recombinació és intercromosòmica en un 67% dels casos i intracromosòmica en un 33%^{209,210}. La deleció més comú, d'1.55 Mb, té lloc entre els blocs B centromèric (Bc) i B mig (Bm). La caracterització dels punts de trencament de la deleció dins del bloc B recombinant ha identificat un punt calent (>27% pacients) en una regió de 1.4 kb en el gen *GTF2I/GTF2IP1*, sent l'origen de les delecions esbiaixat cap a patern. En el cas de les delecions d'1.84 Mb, la RHNA es dóna entre els blocs A centromèric (Ac) i A mig (Am)^{83,211}.

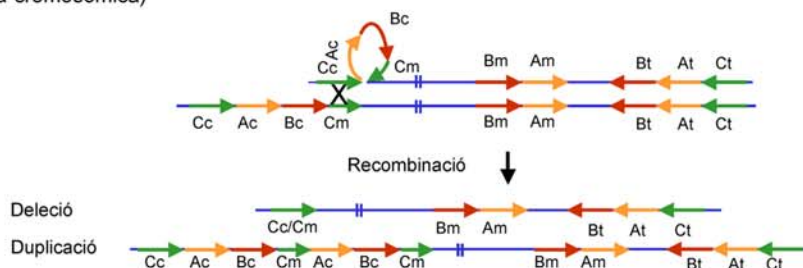
A) Deleció recurrent en pacients amb la SWB / Duplicació recíproca



B) Variants estructurals

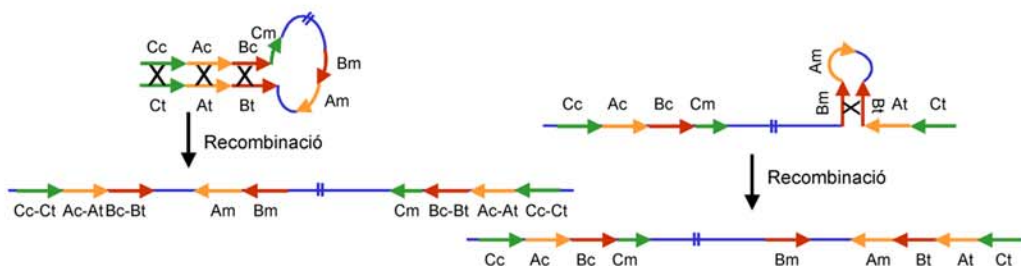
B.1) Polimorfismes de nombre de còpies

(inter/intra-cromosòmica)



B.2) Inversions

(inter/intra-cromosòmica)



C) Reordenaments germinals en portadors de la variant estructural d'inversió de la regió delecionada en pacients amb la SWB

Intercromosòmica

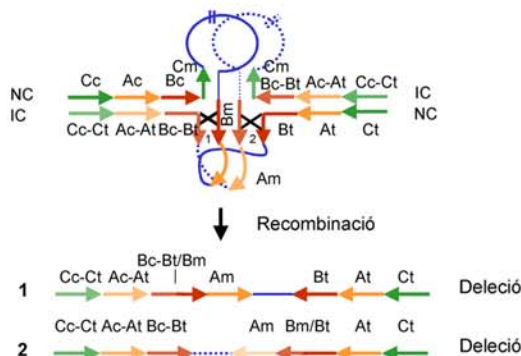


Figura 11.- Mecanismes mutacionals per als reordenaments estructurals de la regió 7q11.23. L'estructura de la regió està representada en colors diferents: en blau la regió de gens de còpia única, en groc el bloc A de les DSs, en vermell el bloc B i en verd el bloc C. Es mostren els cromosomes malalineats i els cromosomes reordenats després de la recombinació (X).

2.1.6.2.- La inversió

Les DSs de la regió poden afavorir una inversió d'1.79 Mb-2.56 Mb (Figura 11 B.2). Aquesta inversió es troba en un 4-5% de la població i una quarta part dels progenitors transmissors del cromosoma que es delecta en els pacients amb la SWB, la qual cosa fa pensar que és un al·lel de predisposició^{88,211,212}. Quan el progenitor transmissor del cromosoma reordenat és portador d'una inversió en la regió, el punt de trencament de la delectió es localitza a les últimes 38 kb del bloc B (gen *GTF2IRD2*), present només a Bm i B telomèric (Bt)⁸³ (Figura 11 C). Molt recentment, s'ha delimitat el punt de ruptura a dos punts calents, de 956 pb i 1.4 kb, observant-se una diferència significativa segons l'origen matern o patern de la delectió²¹¹.

2.1.6.3.- Els Polimorfismes de nombre de còpies

Una altra variant present en el 0.8% de la població i un 5-6% dels pares transmissors és un PNCs per delectió o duplicació de DSs (Corominas et al., resultats no publicats) (Figura 11 B.1). Aparentment, cap d'aquestes variants genòmiques afecten a gens ni s'associen a un fenotip definit, tot i que l'heterozigositat per aquestes variants predisposa a l'aparellament anormal d'aquesta regió durant la meiosi.

2.2.- TRANSTORN ESPECÍFIC DEL LLENGUATGE - DUP (7)(q11.23;q11.23)

El primer cas de la duplicació recíproca a la delectió de la regió 7q11.23 s'ha descrit fa molt poc¹⁰². Aquesta mutació és un esdeveniment *de novo* mediat pel mateix mecanisme mutacional que la SWB, localitzant-se el punt de ruptura dins el gen *NCF1* dels blocs Bc i Bm (Figura 11 A). La freqüència mutacional esperada és igual a la dels casos de SWB intercromosòmics, perquè n'és el reordenament recíproc ($\sim 0.9 \times 10^{-4}$).

El fenotip del proband es caracteritza principalment per un retard greu del llenguatge expressat i per una integració visual-espacial normal, la qual cosa contrasta amb el fenotip observat en els pacients amb la SWB. Això suggereix que alguns gens de la regió 7q11.23 són molt sensibles a alteracions de dosis i podrien contribuir a aspectes del fenotip com el llenguatge i les habilitats visuals-espacials. A més a més, molt recentment s'ha publicat un altre cas d'un pacient i el seu pare amb la mateixa duplicació, que presenten un fenotip bastant diferent²¹³. El pacient mostra craniocinostosis i problemes lleus del llenguatge, però degut a la seva edat no es disposa d'informació sobre la seva capacitat d'integració visual-espacial. El pare presenta sindactília completa III-IV de la mà i II-III del peu i un carcinoma *in situ* de testicles. Així, el fenotip de la duplicació 7q11.23 segurament es podrà caracteritzar millor al augmentar el nombre de casos descrits.

3.- GENS CONTINGUTS A LES DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES

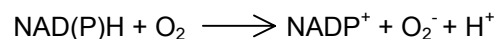
3.1.- EL GEN *NCF1*

El gen *NCF1* està localitzat al bloc Bm de les DSs de la regió cromosòmica 7q11.23, i els seus dos pseudogens es localitzen al bloc Bc i Bt, presentant un 99.6% d'homologia amb el gen¹⁹⁵. El tamany del gen és de 15,236 pb des de l'inici de traducció fins a l'inici del poli-A, i consta d'11 exons. El seu contingut en GC és del 54.12% i el d'elements repetitius del 50.37%²¹⁴. *NCF1* codifica pel factor citosòlic p47^{phox}, un component essencial de l'oxidasa NAD(P)H (NOX) de les cèl·lules fagocítiques.

La malaltia granulomatosa crònica es caracteritza per infeccions bacterianes i fúngiques recurrents, especialment de la pell, pulmons, ganglis limfàtics, fetge i ossos. Existeix una forma recessiva lligada al cromosoma X (OMIM#306400), associada a la deficiència de gp91^{phox}, i tres formes autosòmiques recessives, associades a la deficiència de les subunitats p22^{phox}, p67^{phox} i p47^{phox}. La deficiència de p47^{phox} és la causa del 25-30% dels casos totals de la malaltia granulomatosa crònica (OMIM#233700)²¹⁵. La mutació més freqüent (97% casos) és la deleció de 2pb (GT) entre intró 1 i exó 2, que provoca un canvi en la pauta de lectura i un codó de fi de la traducció prematur¹²⁸. El fet que aquesta mutació estigui present en els pseudogens ha fet que es proposés la conversió gènica com a mecanisme mutacional^{198,204}.

3.1.1.- L'oxidasa NAD(P)H i els seus components

La NOX és el complex enzimàtic responsable de la reducció de l'oxigen (O₂) a anió superòxid (O₂⁻), procés anomenat *oxidative burst*²¹⁶:



Aquest complex enzimàtic és funcional en cèl·lules fagocítiques, és a dir, neutròfils, monòcits, eosinòfils i macròfags²¹⁶. Tot i així, recentment s'ha demostrat que també pot ser-ho en altres tipus cel·lulars²¹⁷.

La NOX és un complex proteic format per 5 components²¹⁸:

p47^{phox} és una proteïna citosòlica molt bàsica de 390 aminoàcids (aa), que conté a la part C-terminal llocs de fosforilació importants per la seva activació²¹⁹.

gp91^{phox} és una glicoproteïna transmembrana de 570 aa, que interacciona amb els components citosòlics durant l'activació del complex²²⁰.

p22^{phox} és una proteïna transmembrana, amb porcions exposades a ambdós costats²²¹. Interacciona amb gp91^{phox} per formar el citocrom b₅₅₈.

p67^{phox} és una proteïna citosòlica de 526 aa.

p40^{phox} és una proteïna citosòlica àcida de 339 aa, amb certa homologia a p47^{phox} (222).

Rac2 (Rac1 en ratolí) és una proteïna d'unió al nucleòtid guanina (GDP o GTP), necessària per l'activitat de la NOX²²³.

3.1.2.- Activació de l'oxidasa NAD(P)H

L'activació de la NOX és un procés complex que es podria simplificar en dues etapes: (i) La fosforilació d'alguns components citosòlics, principalment p47^{phox}, i (ii) posteriorment aquests es desplacen cap a la membrana plasmàtica on s'uneixen al citocrom b₅₅₈²¹⁶ (Figura 12).

Amb més detall, la proteïna quinasa C fosforila p47^{phox} després de ser activada per diferents estímuls, com per exemple el PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)²²⁴. Es creu que el mecanisme pel qual la fosforilació desencadena l'activació del complex NOX és un canvi de conformació de p47^{phox}. Així, s'ha hipotetitzat que quan la cèl·lula està en repòs, p47^{phox} està plegada de manera que el domini de poliprolines de l'extrem N-terminal s'associa amb un domini SH3, i quan la proteïna és fosforilada es desplega, exposant els dominis abans ocupats. L'última proteïna que hi participa és p67^{phox}, que s'uniria mitjançant un dels seus dominis SH3 al domini de poliprolines alliberat. Alternativament, el domini de poliprolines alliberat es pot unir al domini SH3 de p22^{phox}.

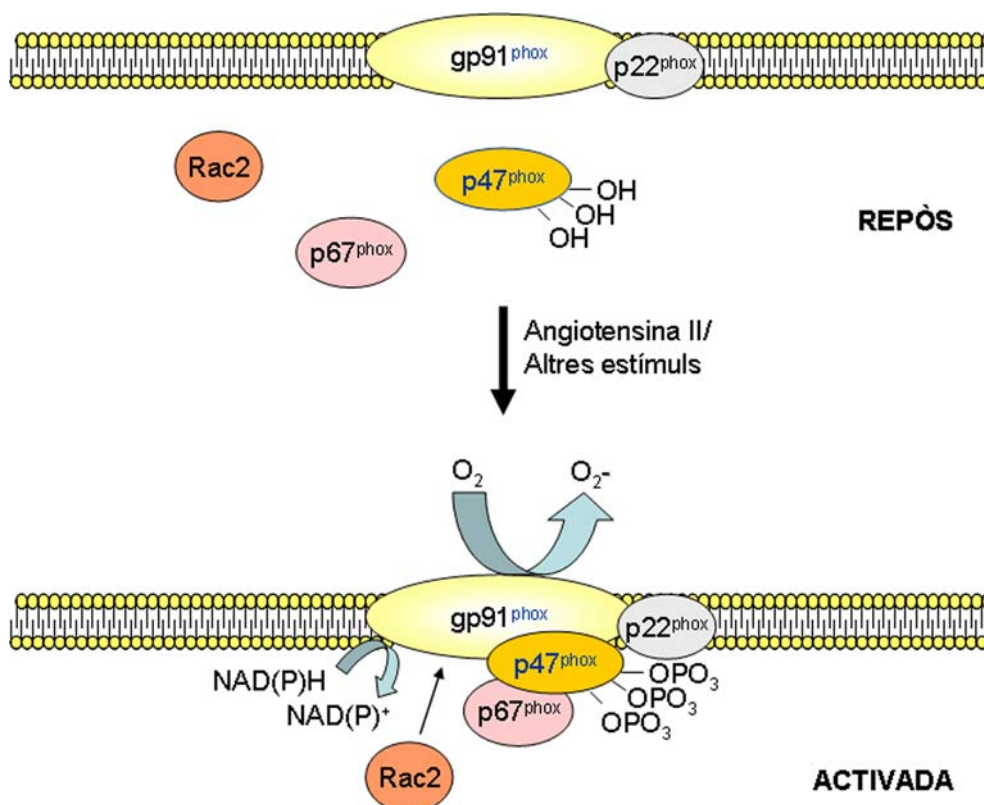


Figura 12.- Estructura i activació del complex oxidasa NAD(P)H (NOX). Durant el procés d'activació de la NOX la subunitat citosòlica p47^{phox} és fosforilada i, junt amb p67^{phox}, s'uneixen a la subunitat de membrana gp91^{phox}.

3.1.3.- Paper de l'oxidasa NAD(P)H en la biologia cardiovascular

3.1.3.1.- L'oxidasa vascular

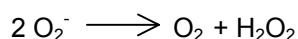
S'ha descrit una família d'enzims estructurals homòlegs a gp91^{phox} que formen part de les NOX no fagocítiques i es troben distribuïts en una gran varietat de teixits com el còlon, ronyó, múscul vascular llis i cervell²²⁵.

La NOX vascular es diferencia considerablement de la de neutròfils per les seves característiques bioquímiques²²⁶. L'estimació de la producció d'O₂⁻ en cèl·lules vasculares suggereix que la capacitat d'aquest complex enzimàtic és aproximadament una tercera part de la del complex fagocític. A més, la cinètica d'activació després de l'estimulació cel·lular també és diferent, ja que mentre la producció d'O₂⁻ es produeix en minuts-hores en les cèl·lules vasculares de múscul llis, cèl·lules endotelials i fibroblasts, en neutròfils és gairebé instantània. No obstant, els enzims vasculares semblen tenir una activitat moderada constitutiva que no tenen els de les cèl·lules fagocítiques.

L'activitat de l'oxidasa vascular pot ser regulada per factors bioquímics, canvis metabòlics locals i forces hemodinàmiques^{226,227}. Estudis *in vivo* i *in vitro* en diferents tipus cel·lulars han demostrat que la seva activitat augmenta per l'angiotensina II (AngII), un agonista vasoactiu que estimula la formació d'espècies reactives de l'O₂ (ROS) a través de p47^{phox}. Altres factors bioquímics que també activen la NOX en cèl·lules vasculares de múscul llis i en fibroblasts són la trombina, el factor de creixement derivat de plaquetes, el factor de necrosis tumoral α i la lactosilceramida. Pel què fa als canvis metabòlics, la reoxigenació i el consegüent augment en lactat estimula la NOX en miocits cardíacs.

3.1.3.2.- Espècies Reactives de l'Oxigen

Les ROS són molècules que deriven de l'O₂ però que han sofert una posterior reducció univalent, de manera que poden reaccionar amb altres productes biològics molt fàcilment²²⁸. Inclouen l'O₂⁻, el peròxid d'hidrogen (H₂O₂), els radicals hidroxil (OH), l'òxid nítric (NO) i el peroxinitrit (OONO⁻). La vida mitjana de l'O₂⁻ és molt curta (de segons), tant per la seva inestabilitat com per l'eficàcia de les defenses antioxidants de la cèl·lula. Així, els radicals O₂⁻ reaccionen amb ells mateixos, espontàniament o bé per catàlisis de la superòxid dismutasa (SOD), per formar H₂O₂ i O₂:



L'H₂O₂ és més estable, però la catalasa o la glutatió peroxidasa el converteixen a H₂O. Una altra possible via per la metabolització dels radicals O₂⁻ és la seva reacció amb l'NO, la qual cosa redueix la bioactivitat d'aquest i fa que es produeixi el radical tòxic ONOO⁻.

3.1.3.3.- Conseqüències fisiològiques de l'activació de l'oxidasa NAD(P)H

Les ROS i la NOX han estat implicades en nombrosos processos cel·lulars i malaltia vascular^{226,227}. A nivell de la paret dels vasos sanguinis, la producció d'O₂⁻ té diverses conseqüències: (i) inactiva l'NO, augmentant la producció de OONO⁻ i l'estrés hemodinàmic de la paret dels vasos, provocant vasoconstricció per una desregulació de la vasodilatació de l'endoteli, (ii) oxida LDL, (iii) augmenta l'expressió de molècules d'adhesió en cèl·lules endotelials provocant una infiltració de monòcits, i (iv) activa metaloproteïnasses de la matriu, portant al remodelatge vascular. Però les ROS també estan implicades en el creixement del múscul vascular llis i fibroblasts, en la inducció de la resposta inflamatòria vascular i en alguns casos d'apoptosis. Tots aquests mecanismes impliquen les ROS i l'activació de la NOX en patologia vascular com per exemple en arteriosclerosi i HTA.

3.1.3.4.- L'oxidasa NAD(P)H i hipertensió arterial

S'ha demostrat la implicació dels radicals O₂⁻ en diverses formes d'HTA, en models animals i en humans²²⁹.

En un model espontani de rata hipertensa es va observar un augment d'O₂⁻ en vènules i arterioles²³⁰. Posteriorment, es va evidenciar la importància funcional de les ROS al descriure que l'administració d'heparina (que s'uneix a la SOD de la paret del vas sanguini) normalitzava la pressió sanguínia d'aquestes rates²³¹. La HTA també es correlaciona amb alt estrés oxidatiu en les rates Dahl, que són sensibles a una dieta rica en sal²³². No obstant, la HTA induïda per norepinefrina no augmenta ni la producció d'O₂⁻ ni l'expressió de subunitats de la NOX²³³, suggerint que l'O₂⁻ està involucrat només en certes formes d'HTA. També s'ha demostrat que la infusió crònica d'AngII en rates sobreregula la transcripció de p22^{phox} i augmenta la producció d'O₂⁻ (233,234).

El ratolí *Ncf1*^{-/-} el van desenvolupar Jackson i col·laboradors mitjançant una disrupció del gen a l'exó 7²³⁵. El fenotip és idèntic al dels pacients amb la malaltia granulomatosa crònica, incloent una major susceptibilitat a infeccions letals i menor producció d'O₂⁻ en leucòcits. Els heterozigots (*Ncf1*^{+/-}) mostren una disminució de l'*oxidative burst* en granulòcits tractats amb PMA respecte els controls, però no en macròfags²³⁶. Existeix una altra soca deficient per p47^{phox}, originada per una mutació puntual espontània a la posició -2 de l'exó 8 d'*Ncf1*, la qual cosa provoca un error en el processament dels transcrits²³⁷. Per intentar determinar els efectes vasculars que pot tenir la deficiència de p47^{phox} es va comparar la pressió sanguínia basal del ratolí apoE^{-/-} amb la del apoE^{-/-}-*Ncf1*^{-/-} i aquesta no mostrava diferències significatives²³⁸. Més recentment, s'ha descrit que l'administració crònica d'AngII *in vivo* al ratolí KO per *Ncf1* no provoca un augment de la producció d'O₂⁻ i només un mínim augment de la pressió sanguínia, a diferència dels animals salvatges (wt) que si que augmenten la producció d'O₂⁻ i la pressió sanguínia²³⁹. A més, el tractament amb un pèptid quimèric dissenyat per inhibir l'associació de p47^{phox} amb els components de membrana de la NOX va aconseguir disminuir la pressió sanguínia en resposta a AngII²⁴⁰.

3.2.- LA FAMÍLIA DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ TFII-I

La família de factors de transcripció TFII-I està formada per GTF2I, GTF2IRD1 i GTF2IRD2. El gen *GTF2IRD1* i la regió 5' de *GTF2I* es troben dins l'interval crític pel fenotip neurològic de la SWB, mentre que els exons 13-35 de *GTF2I* i el gen *GTF2IRD2* estan localitzats a les DSs (Bloc B) que flanquegen la regió delecionada en la SWB. *GTF2IRD2* ha estat caracteritzat molt recentment i representa l'únic membre de la família que està duplicat sencer en humans. A més, per la seva posició dins el bloc B, està delecionat només en alguns pacients i podria contribuir a la variabilitat fenotípica de la SWB.

Els membres de la família TFII-I tenen unes característiques estructurals comuns. La principal és la presència de múltiples dominis de repeticions-I, els quals són estructures semblants a dominis Helix-Loop-Helix (HLH). Evidències experimentals donen suport a que aquestes repeticions són dominis de dimerització²⁴¹. També contenen tots cremalleres de leucina (LZ), les quals són estructures formades per 3 repeticions de 7 aa. Les similituds entre les LZs de GTF2I i GTF2IRD2 suggereixen que podrien formar heterodímers, mentre que és poc probable que en formin amb GTF2IRD1^{242,243}.

3.2.1.- El gen *GTF2I*

El gen *GTF2I* codifica pel factor de transcripció GTF2I (General Transcription Factor II-I) o TFII-I. Aquest gen consta de 35 exons i la seva expressió és ubiqüitària, tot i que està especialment elevada a cervell i cèl·lules B limfoides²⁴⁴.

3.2.1.1.-Estructura i propietats de GTF2I

A la proteïna GTF2I existeixen dos dominis funcionalment diferenciats: (i) una part N-terminal de 70 kDa que conté dominis d'unió a ADN, i (ii) una part C-terminal de 43 kDa que és el domini activador²⁴⁵.

L'estructura aminoacídica primària de GTF2I conté 6 repeticions-I (R1-R6) que representen llocs potencials d'interacció amb altres proteïnes²⁴⁶. També presenta una regió bàsica (BR) just abans d'R2 (aa 301-306)²⁴⁴. En proteïnes HLH s'ha vist que la BR constitueix un domini d'unió a ADN específic de seqüència²⁴⁶. Concretament, s'ha demostrat que la BR és necessària per la unió a l'element iniciador del promotor (Inr) del promotor $\nu\beta$ 5.2 i l'element *upstream* del promotor de *c-fos* que solapa amb l'element Sre. No obstant, la delecio dels 90 aa N-terminals de GTF2I, que contenen una LZ, condueix a la pèrdua de la capacitat d'unió a aquests elements de l'ADN, tot i conservar la BR intacta. Una hipòtesi per explicar aquest fet seria que la regió de 90 aa N-terminals podria tenir també contacte directe amb l'ADN o contribuir indirectament a un canvi conformacional, i l'eliminació d'aquesta regió podria exposar un domini negatiu inhibidor que encobriria el veritable domini d'unió a ADN²⁴¹.

Existeixen 4 isoformes de GTF2I derivades del processament alternatiu de l'ARNm, que es localitzen preferentment al nucli i poden formar interaccions homomèriques i heteromèriques²⁰² (Figura 13).

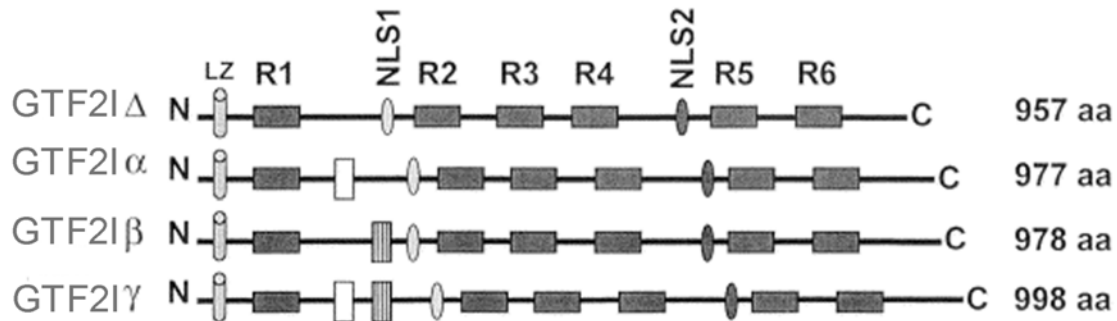


Figura 13.- Esquema de l'estructura de les 4 isoformes humanes de la proteïna GTF2I. Les sigles R1-R6 corresponen a les 6 repeticions-I, NLS1-NLS2 són les dues senyals de localització nuclear, i LZ és la cremallera de leucina. Els dos rectangles verticals (blanc i ratllat) corresponen als dos exons que varien entre les diferents isoformes. Adaptada de Roy AL, 2001¹⁶⁸.

3.2.1.2.-Funció de GTF2I en la transcripció

GTF2I és un factor de transcripció multifuncional que promou la formació de complexos activadors específics de gen i facilita la comunicació d'aquests complexos amb la maquinària basal de transcripció¹⁶⁸. GTF2I va ser descobert com a factor basal de transcripció que s'unia i funcionava a través d'un element Inr, com per exemple el del promotor $V\beta$ 5.2²⁴⁷. Al mateix temps, també es va descriure la seva capacitat d'unió a altres elements *upstream* activadors (Sie, Sre, E-box), com per exemple en el promotor c-fos²⁴⁸⁻²⁵⁰ (Figura 14).

3.2.1.3.-Funció de GTF2I en senyalització

GTF2I es troba fosforilat a residus Ser/Thr i Tyr en condicions basals (en absència de senyals extracel·lulars aparents), sent la fosforilació al residu Y248 necessària per la seva activitat transcripcional²⁵¹. A més a més, diverses senyals extracel·lulars poden augmentar la fosforilació a tirosines a través de l'unió a receptors de superfície cel·lular, portant a una major activitat transcripcional de GTF2I, la qual cosa fa pensar que a part de la seva funció transcripcional pot mediar transducció de senyals mitjançada per receptor²⁵¹⁻²⁵³.

Una fracció important de GTF2I s'associa constitutivament amb la tirosina quinasa de Bruton (Btk) al citoplasma de cèl·lules B o mieloides en repòs^{253,254}. La senyalització del receptor antigen de cèl·lules B porta a la fosforilació de GTF2I a tirosines i s'allibera de Btk per ser importat al nucli on activa la transcripció²⁵⁴ (Figura 14).

La tirosina quinasa que fosforila GTF2I a les cèl·lules no limfoides i que controla la seva translocació a nucli depenent de senyals extracel·lulars podria ser Src^{244,251}. Tot i així, el més probable és que múltiples tirosina quinases puguin unir-se a GTF2I segons el tipus cel·lular i condicions fisiològiques.

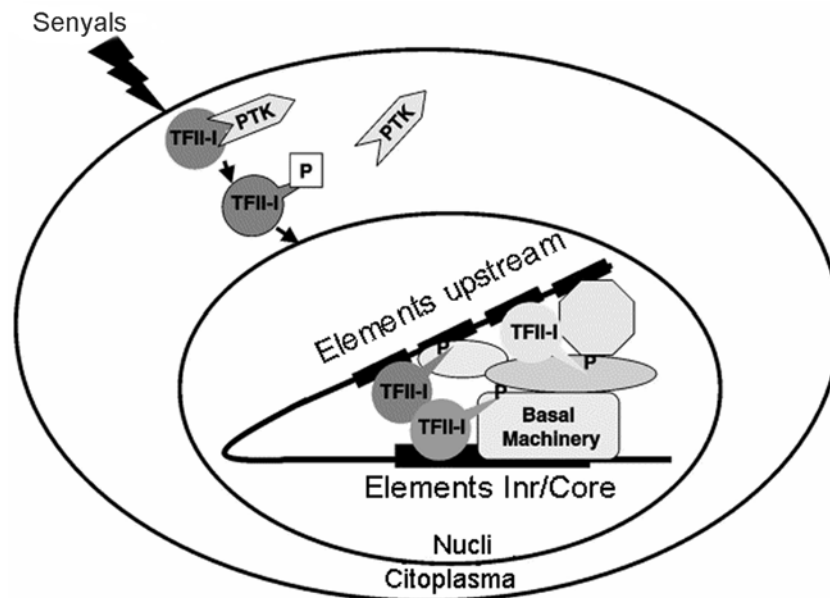


Figura 14.- Actuació de GTF2I i el seu paper en la regulació de la transcripció. GTF2I (TFII-I) es pot unir tant a elements proximals del promotor (Inr) o activadors (*upstream*). Ambdues activitats de GTF2I són dependents del seu estat de fosforilació. En cèl·lules en repòs, GTF2I és segrestat al citoplasma per la unió a una proteïna tirosina quinasa (PTK). En resposta a senyals extracel·lulars, GTF2I és fosforilat (P), alliberat de la quinasa i translocat al nucli on activa la transcripció. Adaptada de Roy AL, 2001¹⁶⁸.

3.2.2.- El gen *GTF2IRD1*

El gen *GTF2IRD1*, també anomenat *WBSCR11*, *GTF2IRD1* o *GTF3*, es troba a la regió de gens de còpia única deletionats en la SWB^{128,166,175}. El gen consta de 27 exons i la seva expressió és ubiqüitària.

El seu producte proteic també ha rebut diverses nomenclatures, com *GTF2IRD1*, *WBSCR11*, *BEN*, *Cream-1*, *MusTRD1* o *GTF3*. Existeixen diferents isoformes derivades del processament de l'ARNm, i el seu tamany en humans pot ser de 944 ó 959 aa^{255,256}. L'estructura proteica es caracteritza per la presència de 5 repeticions-I. La funció de *GTF2IRD1* no ha estat del tot caracteritzada, però se sap que és un activador múscul-específic del gen de la troponina i que actua com un repressor de *GTF2I*^{255,257}.

3.2.3.- El gen *GTF2IRD2*

El gen *GTF2IRD2* és un gen de fusió creat com a conseqüència d'una inserció en pauta d'un element transposable Charlie8. Existeixen 2 trànscrips diferents que corresponen al gen *GTF2IRD2*, localitzats al bloc Bm i Bt, i un pseudogen situat al bloc Bc. Els dos trànscrips presenten 6 substitucions aminoacídiques, totes a l'extrem C-terminal, concretament als residus 478, 500, 597, 609, 612 i 812. Cap d'aquests canvis, però, provoca una truncació de la proteïna i sembla que totes dues còpies podrien ser funcionals. En canvi, el pseudogen té com a principal diferència l'absència d'una regió promotora i la deleció dels dos primers exons, la qual cosa resulta en un canvi de la pauta de lectura i l'aparició d'un codó de fi de la traducció prematur que fa que no sigui transcrit. Estudis d'expressió han identificat un trànscrip d'~3.5 kb amb expressió ubiqüitària en teixits fetals i adults¹⁷⁰.

3.2.3.1.-Estructura del gen i propietats predites de les dues proteïnes funcionals

GTF2IRD2 ocupa una regió cromosòmica de 57,251 pb i està format per 16 exons. La relació entre *GTF2IRD2* i *GTF2I* és òbvia a nivell d'ADN, ja que els exons 2-11 de *GTF2IRD2* corresponen als exons 2-12 de *GTF2I* (a *GTF2IRD2* li falta l'exó 10 de *GTF2I*) i els exons 12-15 de *GTF2IRD2* corresponen als exons 28-31 de *GTF2I*²⁵⁸ (Figura 15 B). El cADN té 3,559 pb i el seu contingut en seqüències repetitives és d'un 60.3% (un 8.32% són *Alus*, un 1.46% són repeticions de baixa complexitat i un 50.52% és un element transposable de tipus MER1 anomenat Charlie8)¹⁷⁰.

La proteïna *GTF2IRD2* és de 949 aa i 107,233 Da de pes molecular. Té una estructura helicoidal, lleugerament acídica i que conté dues regions amb residus principalment hidrofílics. Segons prediccions informàtiques, *GTF2IRD2* és soluble i probablement té una localització citoplasmàtica¹⁷⁰. Pel què fa a les modificacions post-traduccionals, s'han identificat 4 llocs potencials per N-glicosilació i múltiples llocs de fosforilació per les principals quinases, entre els quals hi ha dos residus Tyr¹⁷⁰. *GTF2IRD2* podria unir-se tant a l'ADN com a proteïnes, ja que conté dues LZ, dues repeticions-I i un domini d'unió a ADN^{170,258} (Figura 15 A).

A grans trets, es poden diferenciar dues parts en la proteïna:

Part N-terminal: està formada per 410 aa i conté dues repeticions-I (localitzades als residus 107-185 i 332-410), mostrant una gran homologia amb els altres membres de la família TFII-I. Aquesta part té un 75% d'identitat i un 84% de similitud amb *GTF2I*, mentre que amb *GTF2IRD1* l'identitat és menor i està localitzada només al voltant de les repeticions-I¹⁷⁰.

Part C-terminal: està formada pels residus 414-949 de la proteïna i té una alta identitat (>78%) amb l'element transposable Charlie8 (o MER102). El transposó Charlie8 és un membre autònom de la família de les transposases MER1, específic de mamífers i caracteritzat per un lloc d'inserció de 8 pb palindròmic i dues repeticions invertides terminals flanquejants de 15 pb. Es creu que l'element Charlie8 encara podria ser funcional perquè s'hi han detectat 3 dominis relacionats amb transposases. Tot i així, es desconeix la possible funcionalitat d'aquest element

integrat en pauta, donat que només s'han descrit en el genoma dos casos més de de funció desconeguda¹⁷⁰.

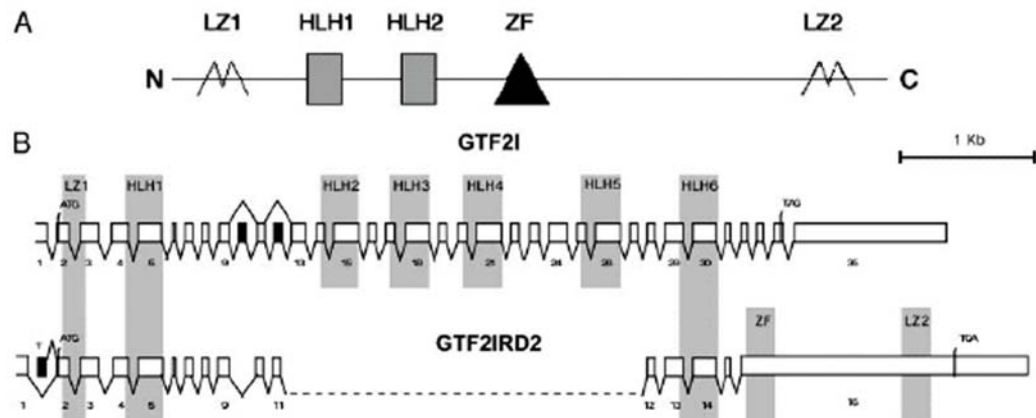


Figura 15.- Dominis proteics i estructura genòmica de GTF2IRD2. A) Organització estructural de la proteïna GTF2IRD2. LZ1 i LZ2 corresponen a les cremalleres de leucina, HLH1 i HLH2 a les 2 repeticions-I, ZF al domini dits de zinc. B) Comparació de les estructures genòmiques de *GTF2IRD2* i *GTF2I*. Els exons estan representats a escala com a caixes; les negres indiquen exons que poden patir un processament diferencial. Els dominis estructurals estan sombrejats en gris. Adaptada de Makeyev et al., 2004²⁵⁸.

3.2.4.- Evolució de la família TFII-I

El membre més antic de la família TFII-I seria *GTF2IRD1*, ja que s'ha identificat una seqüència parcial a *Danio rerio* i *Takifugu rubripes*. Després s'hauria originat *GTF2I* com a conseqüència d'una duplicació local de *GTF2IRD1* (ja present en el pollastre) i la posterior evolució de la seva estructura degut a la seva especialització funcional. Per altra banda, *GTF2IRD2* revela una major similitud amb *GTF2I* que amb *GTF2IRD1*, i es creu que la inserció en pauta d'un element transposable que probablement li atorga una nova funcionalitat a la proteïna li hauria permès la pèrdua d'alguns dels dominis HLH²⁵⁸.

Sembla ser que *GTF2IRD2* és un gen específic de mamífers, ja que no s'ha detectat el seu homòleg en els genomes seqüenciats de *D.melanogaster*, *C.elegans* o *Fugu*¹⁷⁰. Basant-se en l'existència de seqüències altament homòlogues (>80% identitat a nivell de proteïna) de vaca i porc, es pot afirmar que *GTF2IRD2* està conservat en el llinatge dels vertebrats i s'especula que la seva formació és anterior a la radiació dels mamífers²⁵⁸.

~ HIPÒTESIS ~

1.- L'estructura de la regió 7q11.23 humana podria haver sofert múltiples canvis evolutius al llarg de l'evolució dels primats, que podrien explicar l'existència de nombroses DSs en humans. L'estudi genòmic comparatiu de la regió ortòloga en espècies relacionades permetria proposar un mecanisme de generació d'aquestes DSs i contribuir al coneixement de l'evolució cromosòmica.

2.- Es desconeixen les bases moleculars de la variabilitat fenotípica en la SWB. L'existència de certa variabilitat en el punt de ruptura de la deleció podria contribuir a la variabilitat del fenotip. *NCF1* i *GTF2IRD2* són gens localitzats a les DSs que flanquegen la deleció comú i per tant candidats a determinar la variabilitat molecular i fenotípica. Els estudis detallats de correlacions clínico-moleculars en pacients, així com estudis funcionals de gens candidats poden confirmar la implicació de gens en aspectes fenotípics.

3.- La proteïna codificada pel gen *GTF2IRD2* té una funció desconeguda, però prediccions informàtiques han apuntat a un possible paper de factor de transcripció com els altres dos membres de la seva família (*GTF2I* i *GTF2IRD1*), amb els quals podria interaccionar.

~ OBJECTIUS ~

- 1.- Determinar l'absència/presència de les DSs de la regió 7q11.23 i caracteritzar en detall la regió ortòloga en 4 espècies de primats (macaco, orangutà, goril·la i ximpanzé), així com datar l'aparició de cada duplicació.
- 2.- Proposar un model evolutiu per a la generació de les DSs de la regió de la SWB en humans, detallant els reordenaments que han tingut lloc durant aquest procés i proposar els elements que podrien haver-los facilitat.
- 3.- Establir correlacions clínic-moleculars per esbrinar si diferències en el punt de ruptura de les delecions s'associen a variabilitat fenotípica.
- 4.- Determinar si l'hemizigositat pel gen *NCF1* provoca una reducció de l'expressió de $p47^{phox}$, una menor activitat del complex enzimàtic NOX i si es correlaciona negativament amb el risc de desenvolupar HTA.
- 5.- Estudiar si *GTF2IRD2* en condicions *in vitro* interactua amb els altres membres de la seva família, té una localització nuclear i és capaç d'unir-se a seqüències promotores i modular la seva transcripció.

~ MATERIALS I MÈTODES ~

Els materials i mètodes utilitzats en la present tesi queden reflectits i explicats en detall a l'apartat específic de cada treball.

En el primer treball s'han utilitzat principalment tècniques de genètica molecular, com per exemple la PCR, la seqüenciació, l'anàlisi de variants paràlogues de seqüència (PSV) utilitzant enzims de restricció, anàlisi de microsatèl·lits i FISH. A més a més, també s'han realitzat anàlisis informàtics de divergència de seqüència, construcció d'arbres filogenètics i anàlisis de selecció. Com a materials principals es va utilitzar ADN genòmic i preparacions cromosòmiques de les espècies de primats estudiades.

En el segon treball, l'aportació principal ha estat el treball realitzat amb les línies cel·lulars limfoblastoides de pacients i controls. De les línies s'ha obtingut ADN genòmic, ARN i proteïnes. De totes s'ha caracteritzat el nombre de còpies funcionals del gen *NCF1* amb l'anàlisi d'una PSV i s'ha detectat la quantitat de proteïna expressada mitjançant western-blot i immunocitoquímica. La mesura de l'activitat de l'oxidasa NAD(P)H de les línies cel·lulars s'ha realitzat mitjançant un test colorimètric de reducció del compost NBT.

En el tercer treball, les tècniques utilitzades han estat més bioquímiques, encara que també inclouen la clonació en pauta de tràncrits dins un vector d'expressió en cèl·lules de mamífers. El treball ha estat bàsicament amb cultius de cèl·lules adherents transformades COS7, les quals s'han transfectat amb els diferents vectors d'expressió. Els mètodes de transfecció utilitzats han estat la Lipofectamina, el Polyfect i el clorur de calci. Les transfeccions s'han realitzat per fer estudis de localització cel·lular, assajos d'interacció de proteïnes (GST-pull down) i assajos reporters amb renilla-luciferasa.

~ RESULTATS ~

~ CAPÍTOL 1 ~

Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23

Anna Antonell, Oscar de Luis, Xavier Domingo-Roura, Luis A. Pérez Jurado

Genome Research 2005; 15: 1179-1188

Aquest treball descriu de manera precisa l'estructura de la regió cromosòmica humana 7q11.23, que conté les DSs implicades en els reordenaments genòmics associats a la SWB i la duplicació recíproca, a part de la caracterització de les regions ortòlogues en altres primats (macaco, orangutà, goril·la i ximpanzé). Els resultats indiquen un origen molt recent, i a la vegada divergent, que hauria començat abans de la diversificació dels homínids (fa ~12-16 Ma). Durant l'evolució han tingut lloc duplicacions específiques d'espècie (com per exemple de gens de funció neurocognitiva) i reordenaments intracromosòmics (majoritàriament inversions) que han creat diferències significatives entre aquests genomes. L'estudi genòmic comparatiu entre espècies ens ha permès proposar un model específic i seqüencial dels reordenaments cromosòmics evolutius que han donat forma a l'arquitectura genòmica de la regió. S'han detectat seqüències *Alu* a tots els extrems dels blocs de DSs i per això s'ha proposat un model mecanístic basat en la transposició duplicativa mediada per elements *Alu* junt amb fenòmens de RHNA per la generació i expansió local de les DSs. L'extraordinària taxa de canvi evolutiu d'aquesta regió, extrapolable a altres regions riques en DSs, fa que existeixi una variació genòmica important entre espècies de primats homínids, la qual podria ser rellevant funcionalment i predisposar a malaltia.

Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA.
Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23.
Genome Research. 2005 Sep;15(9):1179-88

~ CAPÍTOL 2 ~

Hemizyosity at the *NCF1* gene in Williams Beuren syndrome patients decreases their risk of hypertension

Miguel Del Campo*, Anna Antonell*, Luis F. Magano, Francisco J. Muñoz, Raquel Flores, Mònica Bayés, Luis A. Pérez-Jurado

*These two authors contributed equally to this work.

American Journal of Human Genetics 2006; 78:533-542

La SWB és una síndrome de gens contigus caracteritzada per problemes en el desenvolupament, retard mental i alteracions cardiovasculars que inclouen una elevada freqüència d'HTA (50%). L'haploinsuficiència pel gen de l'elastina se sap que condueix a estenosis vascular i predisposa a HTA. S'ha realitzat una caracterització clínica i molecular molt detallada en 96 pacients, per tal de trobar correlacions clínico-moleculares. Els punts de ruptura van ser definits amb precisió i es va observar que podien resultar en variabilitat en dos gens, *NCF1* i *GTF2IRD2*. La HTA es va trobar significativament menys prevalent en els pacients amb la deleció que inclou *NCF1* ($P=.02$), un gen que codifica per la subunitat p47^{phox} de la NOX. En línies cel·lulars de pacients hemizigots per *NCF1*, es va observar una disminució dels nivells de proteïna p47^{phox}, de la producció d'O₂⁻ i de nitrotirosinació proteica. El següent treball presenta una evidència genètica i funcional per la implicació directa de l'estrés oxidatiu generat via activació de la NOX en la patogènesis de la HTA en la SWB. Els pacients amb la SWB proporcionen un model natural per demostrar que la inhibició a llarg termini del complex NOX pot ser una estratègia segura i exitosa per prevenir el desenvolupament d'HTA en individus amb risc. Per tant, es proposa que s'haurien d'iniciar assajos clínics per valorar si un tractament farmacològic amb antioxidants podria prevenir l'aparició de la HTA i les seves complicacions, tant en pacients amb la SWB com en altres formes d'HTA mediada per uns mecanismes similars.

Del Campo M, Antonell A, Magano LF, Munoz FJ, Flores R, Bayes M, Perez Jurado LA.

Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension.

American Journal of Human Genetics. 2006 Apr;78(4):533-42. Epub 2006 Jan 31

~ CAPÍTOL 3 ~

Functional analysis of GTF2IRD2

Anna Antonell, María Isabel Tussie-Luna, Ananda L. Roy, Luis A. Pérez Jurado

(en preparació)

GTF2IRD2 està localitzat a les DSs específiques d'humans que flanquegen la regió comú delecionada en la SWB. D'aquest gen existeixen tres *loci* a la regió, els quals han sofert selecció purificadora al llarg de l'evolució, dos dels quals són transcrits (els situats a Bm i Bt). En alguns pacients amb la SWB que presenten el punt de ruptura de la delecio dins del gen *GTF2IRD2* es crea un transcrit quimèric lleugerament diferent a les altres dues còpies. Així, pel fet d'estar duplicat exclusivament en l'espècie humana podria contribuir a les diferències funcionals entre espècies. També és interessant perquè en funció del punt de ruptura de la delecio els pacients tenen un nombre de còpies funcionals diferent del gen i podria contribuir a la variabilitat del fenotip de la SWB. A més a més, *GTF2IRD2*, *GTF2I* i *GTF2IRD1* formen part d'una família de factors de transcripció caracteritzada pels seus dominis repetits semblants a HLH que s'anomenen repeticions-I. Dos d'aquests gens (*GTF2I* i *GTF2IRD1*) es troben dins l'interval crític responsable del fenotip neurocognitiu de la SWB. La funció de *GTF2I* i *GTF2IRD1* és ben coneguda, a diferència de la de *GTF2IRD2*. Per tot això s'ha volgut realitzar un estudi funcional *in vitro* per determinar si *GTF2IRD2* podria actuar també com a factor regulador de la transcripció. Hem observat una localització cel·lular diferent per a cada una de les variants, tot i que totes tenen la capacitat d'interaccionar amb *GTF2I*. Cap d'elles modula, però, l'activació/repressió del gen *c-fos*, com fa *GTF2I*.

INTRODUCTION

Williams-Beuren syndrome (WBS; MIM 194050) is a neurodevelopmental disorder with an estimated prevalence of 1 in 7,500 newborns (1). Individuals with WBS typically present distinctive facial features, mild growth retardation, supraaortic stenoses and often infantile hypercalcemia. Their non-uniform cognitive profile, with mild to moderate mental retardation, is characterized for having problems in some areas (psychomotricity, visuospatial integration) and relative preservation of others (language, musicality). They have a friendly personality and they don't feel fear dealing with strangers (2). It is caused by a *de novo* 1.55 Mb deletion at chromosomal region 7q11.23 in most of the cases (3;4). The mutational mechanism is a non-allelic homologous recombination between segmental duplications flanking *in tandem* the commonly deleted region (3;5;6). Depending on the deletion breakpoint, the number of deleted genes can vary between 26 and 28. The two genes that introduce genotype variability among the WBS patients, and probably clinical variability, are *NCF1* and *GTF2IRD2*, located at Block B of the segmental duplications that flank the deleted region (7). Moreover, analysis of WBS patients with partial deletions have allowed the establishment of a critical region responsible for the cognitive profile, which include *GTF2I* and *GTF2IRD1* genes (8).

GTF2I, *GTF2IRD1* and *GTF2IRD2* are members of the TFII-I family of proteins, characterized by the presence of multiple helix-loop-helix (HLH)-like novel domains known as I-repeats (9;10). *GTF2I* (or TFII-I) and *GTF2IRD1* (or *GTF3*, *MustRD1*, *BEN*, *CREAM*, *WBSR11*) both contain multiple I-repeats. *GTF2I* contains both DNA and protein binding sites and is a multifunctional transcription factor that can bind enhancer (E-box) and core promoter (Inr) elements (10). Similarly, *GTF2IRD1* is also thought to have gene regulatory function through direct DNA interactions (11;12). *GTF2IRD2* gene has been reported recently in three different *loci* of chromosome band 7q11.23 (3). In two of the locations its sequence comprises 16 exons extending over 57 kb. Genomic structural analysis revealed that the first 15 exons are homologous to two regions of *GTF2I* (exons 2-12 and 28-31) and exon 16 is a Charle8 transposable element inserted in frame (13). This gene is highly conserved in mammals and *GTF2IRD2* human copies show a purifying selection in pair-wise comparisons (14;15). Despite the high degree of homology at the protein level, there are some aminoacidic changes that allow distinction of the variants (15) (Figure 1 A). It has been shown that *GTF2IRD2* located at Block B medial (Bm) and B telomeric (Bt) are transcribed, while the copy located at block B centromeric (Bc) is not transcribed due to the absence of promoter and exons 1 and 2. However, some WBS patients express a chimeric copy which consists in the 5' part of the medial copy and the 3' part of the centromeric one (7) (Figure 1 B). The three different protein products will be named by the *locus* where they are encoded either medial (*GTF2IRD2-Med*), telomeric (*GTF2IRD2-Tel*) or chimeric (*GTF2IRD2-Ch*). ORFs encode a protein of 107 kDa with several features characteristic of regulatory factors, including two I-repeats, two leucine zippers (LZ) and a single Cys-2/His-2 zinc finger (ZF) (13;16) (Figure 1 A). The presence of these domains suggests that *GTF2IRD2* possess DNA and protein binding properties.

Here we searched for potential DNA and protein binding properties of GTF2IRD2, as well as for their cellular localization. Interaction studies revealed that all the GTF2IRD2 proteins can form heterodimers with GTF2I, although only the GTF2IRD2-Tel can interact with GTF2IRD1. Regarding the localization assays, the three proteins show a different pattern, which may indicate different functionality. On the other hand, none of the GTF2IRD2 variants seem to affect the transcription of *c-fos* gene. Based on these results, we hypothesize the creation in humans of the fourth member of the TFII-I family, which is still almost identical to ancestral GTF2IRD2 although it will probably diverge to a slightly new functionality, allowing the creation of more complex networks of transcriptional control.

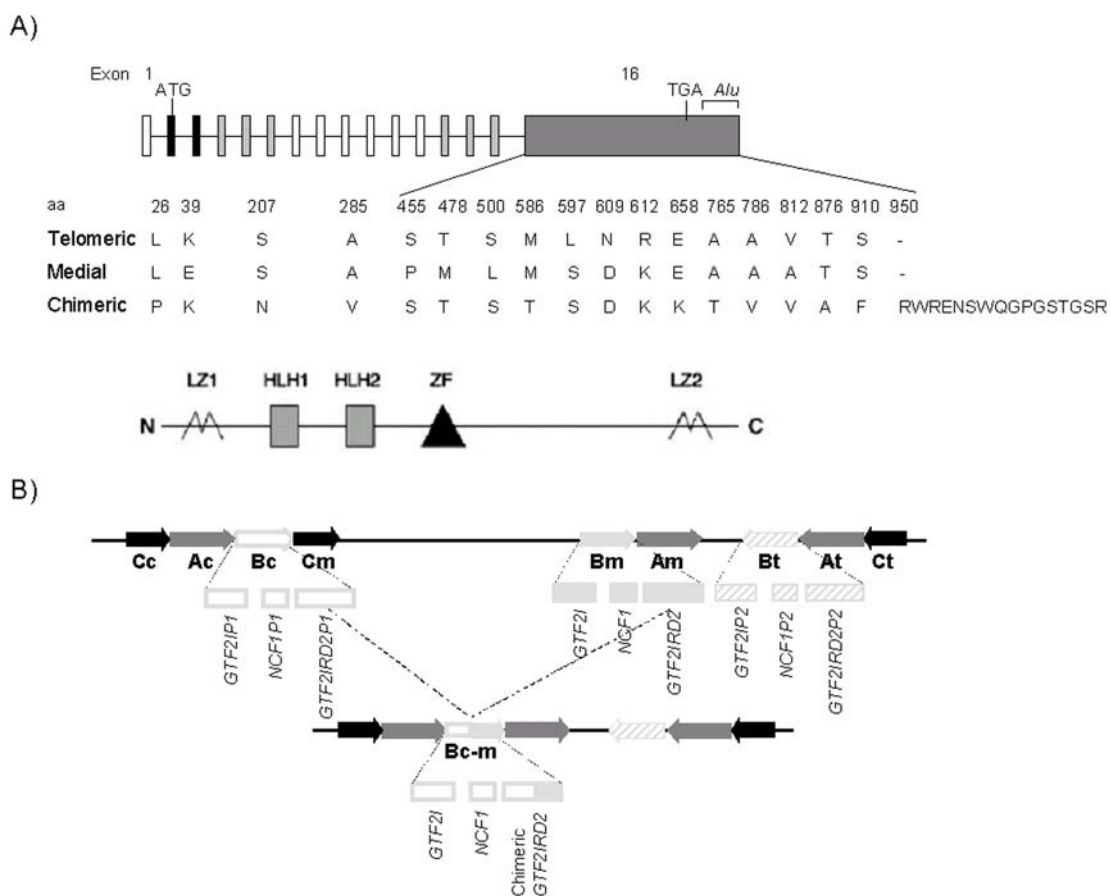


Figure 1.- GTF2IRD2 aminoacidic differences among variants, and generation of the chimeric copy. A, Schematic diagram of *GTF2IRD2* full length form. Exons are represented as rectangles. Exons coding for leucine zipper (LZ) are shaded black; I-repeats (HLH) are shaded light grey and Charlie8 domain in dark grey. In the bottom there is a detail of the aminoacidic changes among the copies and a schematic representation of the proteic structure. ZF means zinc finger domain. B, Generation of the chimeric copy in WBS patients, through non-allelic homologous recombination between *GTF2IRD2* centromeric and medial.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

COS7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (Sigma), 50 units of penicillin/ml, and 50 µg of streptomycin/ml (GIBCO BRL). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ environment.

Construction of Green Fluorescence Protein (GFP)-fused and Glutathione S-transferase (GST)-fused GTF2IRD2 copies

GTF2IRD2 cDNAs were amplified by RT-PCR from cell line RNAs, with primers F-CTAGAATT-CGGGATCATGGCCCAGGTAGCA and R-AATCCCAGCACTTTGTGAGGTCG. The amplified fragment was gel isolated and cloned into pCR-XL-TOPO cloning vector (Invitrogen). Sequencing of cloned products allowed us to differentiate *GTF2IRD2-Med* and *GTF2IRD2-Tel* copies. Inserts were digested with EcoRI-HindIII and HindIII-ApaI. cDNA was obtained in two fragments which were then ligated into the eukaryotic expression vector pEGFPC2 (Clontech) EcoRI-ApaI digested, and plasmids were named pEGFPC2-GTF2IRD2-Med and pEGFPC2-GTF2IRD2-Tel. The *GTF2IRD2-Ch* transcript was obtained in three fragments, two by RT-PCR from cell line RNA and one by PCR from genomic DNA, with primers for fragment 1: F-CTAGAATTCGGGATCATGGCCCAGGTAGCA and R-TCTGGAACAGTCACTTGAACG, for fragment 2: F-CGAGGTGAAAATCGAAGGAA and R-CGACACCACGGATGAATATG and for fragment 3: F-TGGGAAAACGCAAGATAGACC and R-ATGAATAGTGAGGCATACAATG. Each fragment was digested with a different pair of enzymes; for fragment 1: EcoRI-PstI, for fragment 2: PstI-HindIII and for fragment 3: HindIII-ApaI. The three fragments were then ligated in EcoRI-ApaI digested pEGFPC2 (pEGFPC2-GTF2IRD2-Ch). Constructs were entirely sequenced for confirmation. The eukaryotic expression vector pEBG, in which the human EF-1α promoter drives the expression of protein fused to GST, was used to generate GST-fused proteins. ORFs were PCR amplified from pEGFPC2 vectors, adding a hexa-histidine tag, with primers F-GCGGTACCCACCATCACCACCATCACATGGCCCAGGTAGCA and R-TCCACCGGATCTA-GATAACTGGCGGCCGCTTAA. Products were KpnI-NotI digested and inserted in frame between the KpnI and NotI site of pEBG vector (plasmids pEBG-GTF2IRD2-Ch, pEBG-GTF2IRD2-Med, pEBG-GTF2IRD2-Tel).

Plasmids

Plasmids pSOVAΔ5' *c-fos* luciferase, containing a 379 bp murine *c-fos* promoter (17) and pRL-TK (Promega), containing the *Renilla* luciferase gene under the control of the thymidine kinase promoter were used as reporters. The GTF2I and GTF2IRD1 expression vectors had been previously constructed: pEBG-II-I (18;19), pEBB-GFP-II-I (20), pEBGII-I-ΔNLS1 (a gift from Shweta Hakre), pEBG-TIRF1 wt (Roy lab), pEBB-GFP-TIRF1 wt (Roy lab), pEBG-TIRF1-ΔNLS3 (Roy lab).

Transient transfection and Immunofluorescence

COS7 cells were grown on coverslips and transfected by Lipofectamine (Invitrogen) method with each of the GTF2IRD2 proteins fused to GFP individually or co-transfected with GTF2I or GTF2IRD1 constructs fused to GST. They were serum-starved for 18-20 h, and stimulated with 20% FCS. 30 min after stimulation cells were fixed with methanol for 2 minutes and prepared for immunofluorescence. Cells were incubated with monoclonal antibody (Ab) anti-GST-2 (Sigma) at a dilution of 1:3500 for 1 h and then with Alexa 594 goat anti-mouse IgG (H+L) Ab (Molecular Probes) at a dilution of 1:15000, for 1 h. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dye (SIGMA). Immunofluorescence was detected using a fluorescence microscope.

Reporter assays

One day before transfection, COS7 cells at 80-90% of confluency were trypsinized, and each well of a 6-well plate was seeded with $2.5-3 \times 10^4$ cells. Transient transfection was done with Lipofectamine as suggested by the manufacturer, with the following modifications. In an eppendorf tube, reporter plasmids for all the experiments were mixed with DMEM plain, with 600 ngr of *c-fos*-luciferase reporter plasmid and 35 ngr of renilla luciferase plasmid (as an internal transfection control) for each well. In another eppendorf, plasmids to be assayed in each condition are mixed with DMEM plain. The total amount of DNA in each experiment was equalized with the empty vector pEBB. In a separate eppendorf, Lipofectamine was mixed with DMEM plain (4.4 μ l/1000ngr). The plasmids-containing mediums were first mixed, and finally the Lipofectamine-containing medium was added. We incubated for 40 min at room temperature to allow the formation of DNA-lipid complexes. Cells were washed once with PBS and were finally left in DMEM plain. The mixture was added in a final volume of 1 ml per well and cells were incubated overnight in a CO₂ incubator at 37°C. After 12-14 h, medium is replaced for DMEM 10% FCS and cells incubated again at least for 8 h. Media is exchanged with DMEM plain to perform serum starvation for 20 h. Finally, cells are stimulated with human Epidermal Growth Factor (hEGF) at a final concentration of 25 ngr/ml for 4 h. Cells are washed once in PBS 1x and lysed in 500 μ l of passive lysis buffer (Promega) and centrifuged at 14,000 rpm (4°C) for 10 min. Luciferase activities were determined according to the manufacturer's protocol (Dual Luciferase Assay; Promega): a 10 μ l portion of the supernatant was mixed with 50 μ l of luciferase assay reagent II for 10 s, and the luciferase activity was determined. Then, to normalize for the transfection efficiency, 50 μ l of stop-and-glow buffer was added, and the renilla luciferase activity was determined. Each experiment was done in triplicate and repeated twice.

Western blot

Samples were heated at 100°C for 5 min (mixed with 4x Laemmli sample buffer) and load onto a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Gel was transferred onto nitrocellulose or PVDF membrane by the semidry blotting method in a buffer containing 0.192 M glycine, 0.025 M Tris base and 20% methanol. The blot was blocked in Tris-buffered saline (10 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl) with 5% non-fat dry milk. Primary Abs used

were monoclonal anti-GST-2 (Sigma) in a 1:3500 dilution and monoclonal anti-GFP JL-8 (Clontech) at a dilution of 1:2000, and secondary Ab goat anti-mouse horseradish peroxidase linked (Zymed Laboratories Inc.) was used 1:10000. All Abs were incubated in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20. Western blots were developed by enhanced chemiluminescence (Western Lightning, Perkin Elmer Life Sciences).

GST Pull-down assay

COS7 cells were transfected with PolyFect Transfection Reagent (Quiagen) using 5 μ l/1 μ gr of DNA to a maximum of 12 μ gr of a specific plasmid. Serum starvation for 20 h was performed before stimulation with 20% FCS for 30 min. After approximately 40 h of transfection, COS7 cells were lysed with buffer containing 25 mM Tris-HCl [pH8.0], 100 mM KCl, 5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₇P₂O₄, 10% glycerol, antiprotease cocktail (ROCHE), 0.5% NP40 and 0.1% Triton X-100. Lysate was centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at 4°C and supernatants collected to quantify the protein concentration by the Bradford method (BioRad). 500 μ gr of protein in a final volume of 1 ml were incubated with Glutathione Sepharose beads (60 μ l; 1:1 slurry; Sigma) for 2 h with rocking at 4°C. To pull-down glutathione S-transferase (GST) fused proteins, beads were collected by centrifuging at 4,000 rpm for 3 min and washed with lysis buffer without NP40 for 10 min three times. Finally, beads were resuspended with 4x Laemmli sample buffer and western blot analyses were performed as detailed above, first with an anti-GFP Ab, and after stripping, with an anti-GST Ab.

RESULTS

Identification of in vitro cellular localization of GTF2IRD2 proteins alone and together with GTF2I and GTF2IRD1 wt

GTF2IRD2 is predicted to behave as a soluble protein with a most likely cytoplasmic location, lacking any nuclear localization signal (NLS) (15). However, GTF2IRD2 was distributed both in the nucleus and cytoplasm when over-expressed *in vitro* in COS7 cells, although there were huge differences among the three different forms. GTF2IRD2-Ch showed exclusively cytoplasmic fluorescence. In contrast, GTF2IRD2-Tel exhibited predominantly nuclear localization with very small amounts in the cytoplasm. Lastly, GTF2IRD2-Med showed a bipartite distribution, approximately 50% cytoplasmic and 50% nuclear (Figure 2A). No significant differences in their distribution were observed in the absence or presence of FBS stimulation, except for GTF2IRD2-Tel which showed more cytoplasmic localization when stimulated.

Next we attempted to determine whether GTF2IRD2 proteins change their distribution when co-transfected with GTF2I or GTF2IRD1 (Figure 2 B). None of the GTF2IRD2 forms changed significantly its distribution in the presence of GTF2IRD1. However, co-expression with GTF2I led to a significant increase of the nuclear localization of both GTF2IRD2-Med and

GTF2IRD2-Tel but not of GTF2IRD2-Ch. In addition, no change in their subcellular distribution was observed when co-expressing GTF2IRD2 proteins with a mutated form of GTF2I that lacks NLS (GTF2I- Δ NLS1), suggesting that GTF2I is likely a partner that facilitates nuclear translocation of GTF2IRD2.

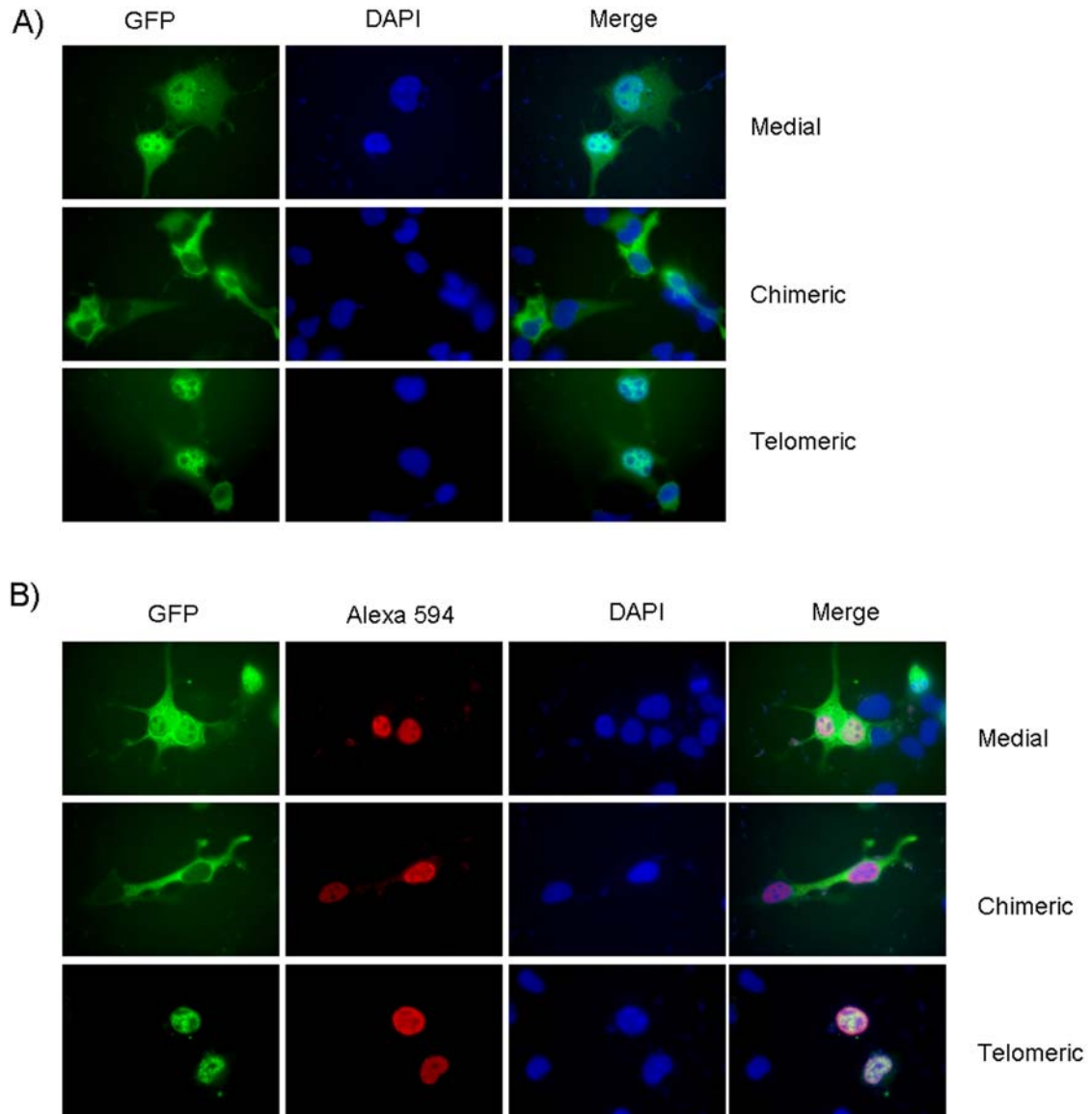


Figure 2.- Cellular localization of GTF2IRD2 proteins. A) GTF2IRD2 proteins alone and B) GTF2IRD2 proteins co-expressed with GTF2I wt, by expressing them in COS7 cells as GST (GTF2I wt) or GFP (GTF2IRD2) fusion proteins. 42 h post-transfection, after stimulation, cells were fixed with methanol and the ectopically expressed proteins were visualized by direct (GFP) or indirect (Alexa 594) immunofluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Superimposition (Merge) of GFP, Alexa 594 and DAPI images is shown in the right panels.

Heteromerization of GTF2IRD2 with GTF2I or GTF2IRD1

The presence of two putative Leucine Zipper (LZ) domains (residues 23-44 and 776-798) (13) and two I-repeats (residues 107-185 and 332-410) (15) which are conserved in all GTF2IRD2 forms suggests that they might be involved in heteromerization, as it has been shown for GTF2I isoforms (21). The GFP-tagged form of GTF2I and GTF2IRD1 were both used as baits to determine heteromeric interactions in GST pull-down assays. These proteins were ectopically co-expressed in COS7 cells with the three different GST-tagged GTF2IRD2 proteins, as well as transfected alone as specificity controls of the GST pull-down for the GST tag. Western blot analysis showed that all GTF2IRD2 proteins can interact with GTF2I, although only GTF2IRD2-Tel interacts with GTF2IRD1 (Figure 3).

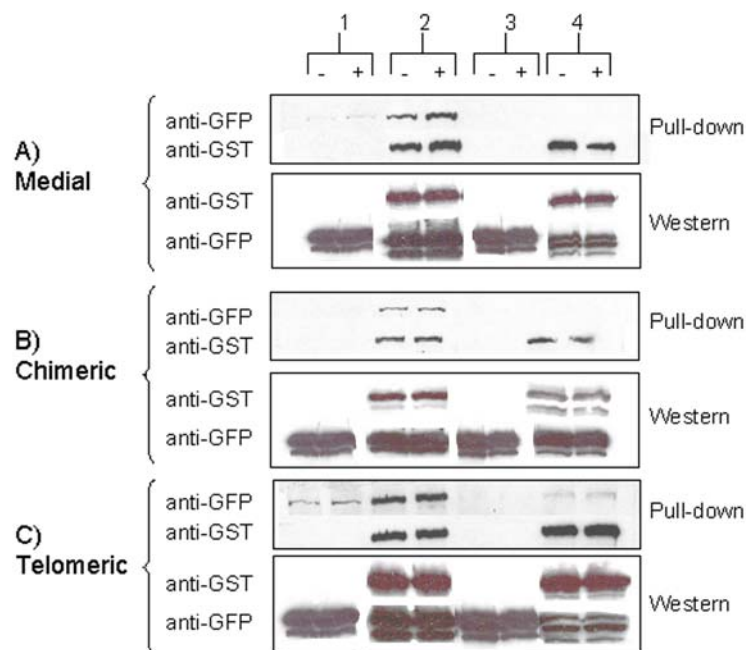


Figure 3.- Heteromeric interactions between GTF2IRD2 copies and GTF2I or GTF2IRD1. Top panel: GST pull-down. Bottom panel: whole cell extract. Numbers indicate the proteins transfected in each lane, and – means no stimulation and + stimulation; 1: pEBB-GFP-GTF2I wt, 2: pEBB-GFP-GTF2I wt + pEBG-GTF2IRD2 variant (Med-A, Ch-B or Tel-C), 3: pEBB-GFP-GTF2IRD1 wt, 4: pEBB-GFP-GTF2IRD1 wt + pEBG-GTF2IRD2 variant (Med-A, Ch-B or Tel-C).

Transcriptional properties of GTF2IRD2 proteins

Since GTF2I isoforms are documented activators of the *c-fos* promoter, we tested for the signal-responsive transactivation potentials of GTF2IRD2 forms on the same *c-fos* promoter (Figure 4) (20;22;23). GTF2I wt was used as a positive control of activation and the empty vector pEBB to establish the background. No significant differences were observed by comparing the empty vector control and each of the GTF2IRD2 proteins, both in the absence or presence of hEGF stimulation. The integrity of the GTF2IRD2 proteins were comparable to that of the GTF2I

protein and the expression levels increased with the amount of DNA transfected except for GTF2IRD2-Ch, as shown by western blot (Figure 4).

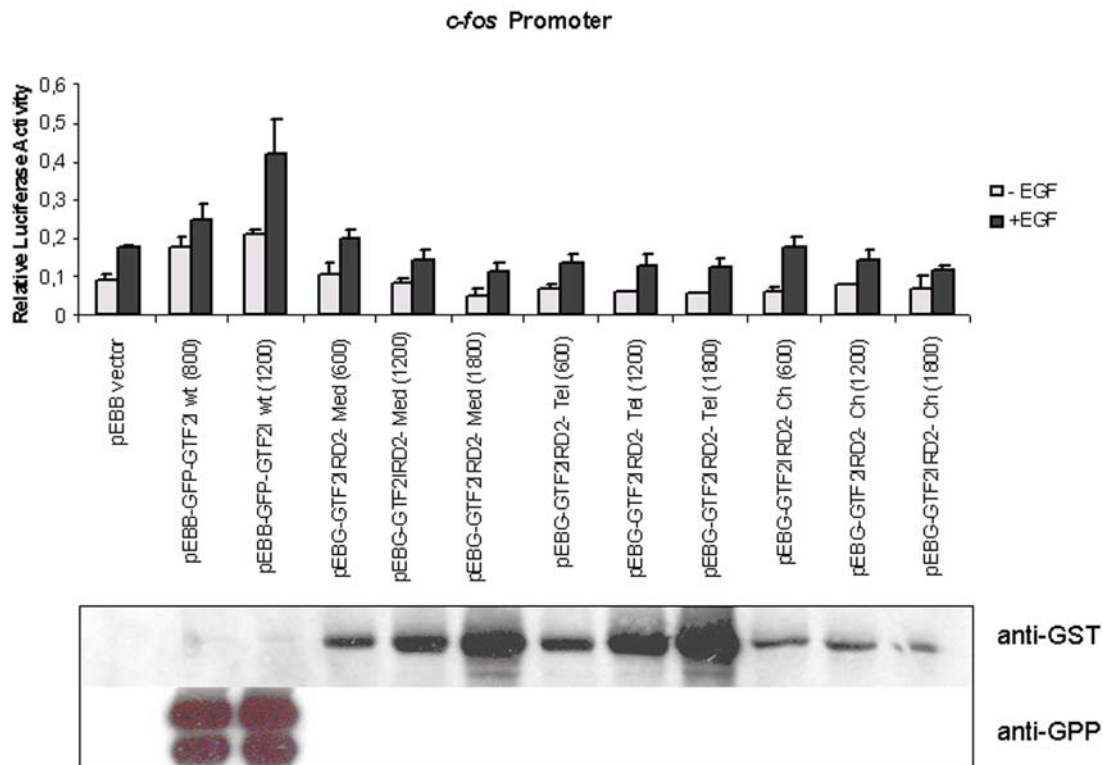


Figure 4.- Transcription function of GTF2IRD2 proteins. *Top*, transactivation potentials of GTF2I wt and GTF2IRD2 wt copies on the *c-fos* promoter. The number in parenthesis in each experiment indicates the amount of DNA transfected of the vector in μ gr. *Bottom*, panel shows western blot analyses of lysates from transfection assays in the presence of hEGF stimulation.

DISCUSSION

GTF2IRD2 is the third member of the TFII-I family of transcription factors, together with GTF2I and GTF2IRD1 (13;15). Although *in silico* data allows prediction of many putative functional domains, no experimental validation has been reported so far. In an attempt to understand the DNA binding and protein-protein interaction capabilities of GTF2IRD2, we have created expression plasmids for all the predicted variants and analyzed them in different *in vitro* functional assays.

In silico analysis did not identify any NLS throughout the GTF2IRD2 protein sequence, suggesting that these proteins would not be able to translocate to the nucleus by themselves (16). However, we have observed nuclear localization for GTF2IRD2-Med and GTF2IRD2-Tel forms, but not for GTF2IRD2-Ch. A possible explanation would be that they would interact with other proteins and/or undergo post-translational modifications required to achieve the

translocation to the nucleus. Actually, when co-expressed with GTF2I wt, GTF2IRD2-Med and GTF2IRD2-Tel showed a significant increase in nuclear distribution, indicating a possible role of GTF2I in this process. In the same way, GTF2I and GTF2IRD1 have been shown to interact (24) and, when co-expressed, GTF2IRD1 is known to influence GTF2I nuclear localization (25). The fact that the three different GTF2IRD2 forms show a different localization pattern despite their high homology at the protein level should help to identify the specific aminoacids relevant for nuclear localization or interaction with proteins.

GTF2IRD2-Tel and GTF2IRD2-Med proteins differ only in 6 aminoacids, 5 of them localized in the Charlie8 domain (Figure 1). The Charlie8 transposon (or MER102) is an autonomous mammalian-specific member of the MER1 transposase family (15;26;27). GTF2IRD2-Ch protein, which does not show nuclear localization, is slightly larger than the other two (18aa), as it contains a different stop codon. It is worth noting that N-terminal part of GTF2IRD2 proteins (first 410 aa) are highly homologous to GTF2I.

A remarkable feature of the GTF2IRD2 sequence is the presence of two I-repeats, each of which contain a potential HLH-like domain. HLH domains are implicated in homo- and heterodimerization in conventional HLH proteins and TFII-I family members (21;28). These I-repeats are highly conserved and highly homologous to the first and sixth I-repeats of GTF2I (15;29). GTF2IRD2 also contain two putative LZ, which are also dimerization motifs. The similarities between LZs of GTF2I and GTF2IRD2 suggest that heterodimers could be formed between these two proteins (29;30). Our data show that the different GTF2IRD2 proteins do indeed interact with GTF2I wt, and the GTF2IRD2-Tel protein can also interact with GTF2IRD1 wt. It would also be interesting to test for the possibility of homodimerization or heterodimerization among the different variants of GTF2IRD2.

GTF2IRD2 also contains a single Cys-2/His-2 zinc finger, which is a DNA binding motif (13;15). Moreover, the second I-repeat of GTF2IRD2 has been grouped by phylogenetic analysis to the fourth I-repeat of GTF2IRD1, which contains a conserved region of basic residues implicated in DNA binding (16). However, we have not detected any transcriptional effect (activation/repression) of GTF2IRD2 on to the *c-fos* promoter. It deserves to be explored whether GTF2IRD2 proteins can influence *c-fos* transcription by interacting with GTF2I or whether they regulate other promoter sequences.

Although the performed *in vitro* studies are providing important and useful information for the functional characterization of these proteins, the availability of a specific Ab as well as the generation of cellular and whole animal knockout models will provide unvaluable tools for *in vivo* studies to better elucidate the exact functional properties of them.

Clinical and molecular data from patients with partial deletions have implicated the TFII-I family of transcription factors in different characteristics of the pathology of WBS. However, the precise identification of individual protein contributions to these phenotypes as a result of haploinsufficiency presents an intricate task.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Raquel Flores, Victoria Campuzano and Jaume Lucena for excellent technical assistance and discussion, Shweta Hakre for plasmid pEBGII-I- Δ NLS1. A.A. was supported by the DURSI (2002-FI00790). This work was funded by grants from the Spanish Ministries of Science and Education (SAF2004-6382) and Health (Network of Cooperative Research grant C03/07) and Genome Spain (grant JLI/038).

REFERENCES

- (1) Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002; 17(4):269-271.
- (2) Perez Jurado AL. Williams-Beuren syndrome: a model of recurrent genomic mutation. *Horm Res* 2003; 59 Suppl 1:106-113.
- (3) Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 2003; 73(1):131-151.
- (4) Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999; 8(10):1947-1954.
- (5) Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5(12):1893-1898.
- (6) Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A et al. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* 1996; 59(4):958-962.
- (7) Del Campo M*, Antonell A*, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M et al. Hemizyosity at the *NCF1* gene in Williams Beuren syndrome patients decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet*. In press.
- (8) Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ et al. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A* 2003; 123(1):45-59.
- (9) Perez 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 deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet* 1998; 7(3):325-334.
- (10) Roy AL. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* 2001; 274(1-2):1-13.
- (11) 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(2):279-284.

- (12) Vullhorst D, Buonanno A. Characterization of general transcription factor 3, a transcription factor involved in slow muscle-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(10):8370-8379.
- (13) Makeyev AV, Erdenechimeg L, Mungunsukh O, Roth JJ, Enkhmandakh B, Ruddle FH et al. GTF2IRD2 is located in the Williams-Beuren syndrome critical region 7q11.23 and encodes a protein with two TFII-I-like helix-loop-helix repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(30):11052-11057.
- (14) Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA. Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res* 2005; 15(9):1179-1188.
- (15) Tipney HJ, Hinsley TA, Brass A, Metcalfe K, Donnai D, Tassabehji M. Isolation and characterisation of GTF2IRD2, a novel fusion gene and member of the TFII-I family of transcription factors, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(7):551-560.
- (16) Hinsley TA, Cunliffe P, Tipney HJ, Brass A, Tassabehji M. Comparison of TFII-I gene family members deleted in Williams-Beuren syndrome. *Protein Sci* 2004; 13(10):2588-2599.
- (17) de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7(2):725-737.
- (18) Cheriya V, Novina CD, Roy AL. TFII-I regulates Vbeta promoter activity through an initiator element. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4444-4454.
- (19) Novina CD, Cheriya V, Roy AL. Regulation of TFII-I activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33443-33448.
- (20) Cheriya V, Roy AL. Alternatively spliced isoforms of TFII-I. Complex formation, nuclear translocation, and differential gene regulation. *J Biol Chem* 2000; 275(34):26300-26308.
- (21) Cheriya V, Roy AL. Structure-function analysis of TFII-I. Roles of the N-terminal end, basic region, and I-repeats. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8377-8383.
- (22) Grueneberg DA, Henry RW, Brauer A, Novina CD, Cheriya V, Roy AL et al. A multifunctional DNA-binding protein that promotes the formation of serum response factor/homeodomain complexes: identity to TFII-I. *Genes Dev* 1997; 11(19):2482-2493.
- (23) Kim DW, Cheriya V, Roy AL, Cochran BH. TFII-I enhances activation of the c-fos promoter through interactions with upstream elements. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3310-3320.
- (24) Tantin D, Tussie-Luna MI, Roy AL, Sharp PA. Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J Biol Chem* 2004; 279(7):5460-5469.
- (25) Tussie-Luna MI, Bayarsaihan D, Ruddle FH, Roy AL. Repression of TFII-I-dependent transcription by nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(14):7789-7794.
- (26) Jurka J, Klonowski P, Trifonov EN. Mammalian retroposons integrate at kinkable DNA sites. *J Biomol Struct Dyn* 1998; 15(4):717-721.
- (27) Smit AF. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(6):657-663.
- (28) Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 1993; 363(6424):38-45.

- (29) Hinsley TA, Cunliffe P, Tipney HJ, Brass A, Tassabehji M. Comparison of TFII-I gene family members deleted in Williams-Beuren syndrome. *Protein Sci* 2004; 13(10):2588-2599.
- (30) Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* 2002; 22(18):6321-6335.

~ DISCUSSIÓ ~

Les DSs representen entre el 5-10% del genoma humà i actualment són objecte d'estudi i gran interès per les seves possibles conseqüències, com l'aparició de noves funcions, l'evolució estructural dels cromosomes i especiació, la plasticitat genòmica i malaltia.

Les aproximacions bioinformàtiques a gran escala per l'anàlisi de les DSs han estat molt útils per conèixer la seva abundància i representació en diferents espècies, així com per establir-ne les característiques més representatives. No obstant, la comparació de genomes té limitacions com les espècies disponibles i els problemes d'assemblatge relacionats sovint amb les DSs^{3,5,8,9,60,259}. L'anàlisi específic de les DSs de la regió 7q11.23 ha permès implicar-les en reordenaments cromosòmics evolutius, en la generació de possibles noves proteïnes, en polimorfismes de nombre de còpies intraespècie i en el mecanisme mutacional causant de la SWB i dup(7)(q11.23;q11.23). D'altra banda, la caracterització de la regió en primats ha permès entendre millor els reordenaments que encara actualment hi tenen lloc i conèixer les diferències genètiques entre espècies que poden haver contribuït a les diferències fenotípiques.

1 Aparició en homínoids de les duplicacions segmentàries ortòlogues de la regió 7q11.23 humana

En el macaco del Japó (*M.fuscata*), al igual que en la seqüència disponible pel babuí anubis (*P.anubis*) o babuí sagrat (*P.hamadryas*), només s'ha detectat el *locus* ancestral dels blocs B i C, de còpia única, mentre que no s'ha detectat el bloc A a la regió ortòloga de 7q11.23 en humans. En tots els homínoids no humans s'han detectat dues còpies dels blocs A i C, i el *locus* ancestral del bloc B. En orangutà, les 2 còpies del bloc A es localitzen juntes a 10p, mentre que en goril·la i ximpanzé es troben en dues bandes separades a 6q, corresponent a les homòlogues en humans 7q22 i 7q11.23. Pel què fa a la localització de les dues còpies del bloc C, aquestes semblen estar una al costat de l'altra en la mateixa localització cromosòmica, 10p11 a orangutà i 6q11 a goril·la i ximpanzé. Els anàlisis de divergència de seqüència són concordants amb la duplicació d'aquests blocs després de la separació de les famílies *Cercopithecidae* i *Hominidae*, fa 25 Ma, i abans de la diversificació dels homínoids, fa aproximadament 12 Ma²⁶⁰. A més, sembla ser que els blocs que formen part de les DSs de la regió (A, B i C) han evolucionat com a entitats senceres i independents.

Altres estudis evolutius de DSs localitzades en altres regions genòmiques involucrades en aneusomies humanes (regions 17p11.2-p12, 15q11-q13 i 22q11) han mostrat patrons i espais temporals d'aparició semblants^{65,66,261}.

2 Reordenaments cromosòmics i duplicacions segmentàries

L'associació entre els punts de trencament evolutius en els ortòlegs del cromosoma 7 humà i la presència de seqüències genòmiques de la regió de la SWB és evident i s'ha documentat experimentalment^{55,195}. A més, les inversions evolutives que afecten la regió 7q11.23 tenen punts de ruptura localitzats a les DSs de la regió. El cromosoma de goril·la es

diferència dels humans i ximpanzés per una inversió paracèntrica major (~20 Mb) amb punts de trencament a 7q11.23-q21 i 7q22.1^{39,54}, trobant-se seqüències relacionades a *PMS2* a ambdues regions. En orangutans, l'ortòleg del cromosoma 7 humà presenta una inversió pericèntrica que el diferencia de la resta d'hominoids, amb punts de trencament a 7p22.1 i 7q11.23-q21³⁹. En aquest cas, també es troben seqüències relacionades a *PMS2* en la proximitat dels punts de ruptura. Els punts de trencament d'aquestes inversions s'han caracteritzat recentment: els de la inversió pericèntrica estan localitzats en regions amb duplicacions intercromosòmiques i els de la inversió paracèntrica en regions amb duplicacions intracromosòmiques. El fet que les duplicacions es trobin presents ja en orangutà fa pensar que aquestes podrien haver estat la causa i no el resultat d'aquests reordenaments⁵⁴. A favor d'aquesta hipòtesi també s'ha descrit un enriquiment de DSs en els llocs de trencament de la sintènia entre espècies^{44,56}. No obstant, deu existir algun factor de susceptibilitat per la creació de DSs en certes regions del genoma, que un cop presents faciliten reordenaments i s'expandeixen probablement mitjançant la RHNA.

3 Mecanismes moleculars per la generació de duplicacions segmentàries i model evolutiu

S'ha proposat un model per explicar l'evolució de les DSs de la regió 7q11.23 humana, basat en els resultats de múltiples aproximacions experimentals i informàtiques. L'estructura genòmica de la regió és la mateixa en ratolí, babuí/macaco i altres mamífers, la qual cosa indicaria que aquesta representa l'ancestral en mamífers. Per tant, durant els més de 50 Ma de divergència entre ratolí i l'ancestre comú dels macacos i primats superiors, no s'ha produït cap canvi en aquesta regió.

Mitjançant FISH amb BACs que contenen el gen *NCF1* i pseudogens *PMS2L*, DeSilva i col·laboradors van observar duplicacions locals a la regió ortòloga a la de la SWB en hominoids, però no en ratolí. Hem observat resultats semblants amb BACs que contenen el gen ancestral *PMS2*, la qual cosa sembla suggerir que la duplicació d'aquestes seqüències podria haver estat un dels primers passos per la generació de les DSs locals. Així, inicialment petits mòduls (10-20 kb) que contenen seqüències relacionades a *PMS2* i *WBSCR19* (derivat *RBAK*) i localitzats al costat però no dins de la regió, podrien haver-se duplicat a través de transposició duplicativa i reparació, integrant-se a diferents regions. Concretament, aquests mòduls s'haurien integrat entre els gens *HIP1* i *POM121*, a part d'altres regions del cromosoma 7 humà, ja que es troben en múltiples *loci* amb identitats de seqüència del 95-96%¹⁹⁹. Aquestes duplicacions podrien haver facilitat el mal aparellament i reordenaments addicionals, portant a un engrandiment dels blocs i noves duplicacions.

La duplicació del bloc A com a entitat sembla que va tenir lloc en l'ancestre comú de tots els llinatges dels hominoids, ja que el temps de divergència calculat per les dues còpies de cada espècie és bastant semblant (fa 12-19 Ma). El bloc A està localitzat prop dels dos punts de ruptura de la inversió paracèntrica entre q11 i q22⁵⁴. D'altra banda, l'anàlisi de divergència

de seqüència entre les còpies de bloc C de cada espècie suggeriria un duplicació d'aquest bloc comú per goril·les, ximpanzés i humans i una d'independent per orangutans. No obstant, el fragment analitzat per a totes les espècies era relativament curt en comparació amb el fragment analitzat per aquest bloc en les espècies de babuí, ximpanzé i humans, que indicava una duplicació en ximpanzés compatible amb un esdeveniment comú en tots els homínids. El perquè de les diferències de divergència de seqüència entre fragments podria ser degut en part a la llargada del fragment analitzat, a les diferents taxes de mutació entre espècies i als fenòmens de conversió gènica que provoquen una homogeneïtzació de les seqüències duplicades. Per tant, el coneixement de la taxa de conversió gènica entre DSs permetria datar amb més exactitud la seva aparició en aquesta i altres regions del genoma mitjançant la divergència de seqüència. Finalment, el bloc B s'hauria duplicat només en el llinatge dels humans, fa menys de 6 Ma.

Una altra duplicació específica d'espècie, tot i que no forma part de cap de les tres entitats com a blocs de les DSs de 7q11.23, és el duplicó que conté el gen *HIP1*, present només en ximpanzé.

4 Evolució genòmica mediada per elements *Alu*

Com a possibles mecanismes a nivell molecular per la generació de les DSs caldria esmentar els trencaments de doble cadena i la RHNA entre elements *Alu*. L'activitat transcripcional en les dues cadenes de l'ADN s'ha associat amb trencaments de doble cadena i s'ha relacionat amb la recombinació cromosòmica en llevats així com en cultius cel·lulars de mamífers^{262,263}. En aquest sentit, s'ha descrit que alguns dels gens presents en els blocs duplicats són transcrits activament durant la divisió meiótica^{101,264}. D'altra banda, la presència d'elements *Alu* als llocs d'integració dels primers mòduls de DSs de la regió suggereix la transposició duplicativa mediada per aquests elements com a mecanisme. En el nostre model hipotetitzem que aquest fenomen hauria mediat la duplicació i canvi d'orientació centròmer-telòmer de dos blocs junts (A i B) en un reordenament únic i complex que hauria implicat les quatre cadenes de l'ADN, propiciat pel mal aparellament dels blocs C ja duplicats (Figura 16). Per un mecanisme semblant, la regió del gen *HIP1* s'hauria duplicat en el llinatge dels ximpanzés. La detecció d'elements *Alu* a tots els punts entre els grans blocs de DSs de 7q11.23 dóna suport a la hipòtesi segons la qual aquests elements podrien haver participat també d'alguna manera en els últims reordenaments evolutius per la generació de les grans DSs.

La RHNA entre elements *Alu* és un fenomen conegut implicat en reordenaments patogènics i possiblement també en reordenaments evolutius. Un exemple en què els elements *Alu* també han estat implicats en la generació de DSs és la regió 22q11²³. Per anàlisis bioinformàtics s'ha trobat un enriquiment d'aquestes seqüències en els punts d'unió de DSs respecte el global del genoma^{16,20}. És interessant ressaltar la coincidència temporal entre l'aparició i propagació d'elements *Alu* al genoma dels primats i la ràpida evolució de DSs en aquestes espècies.

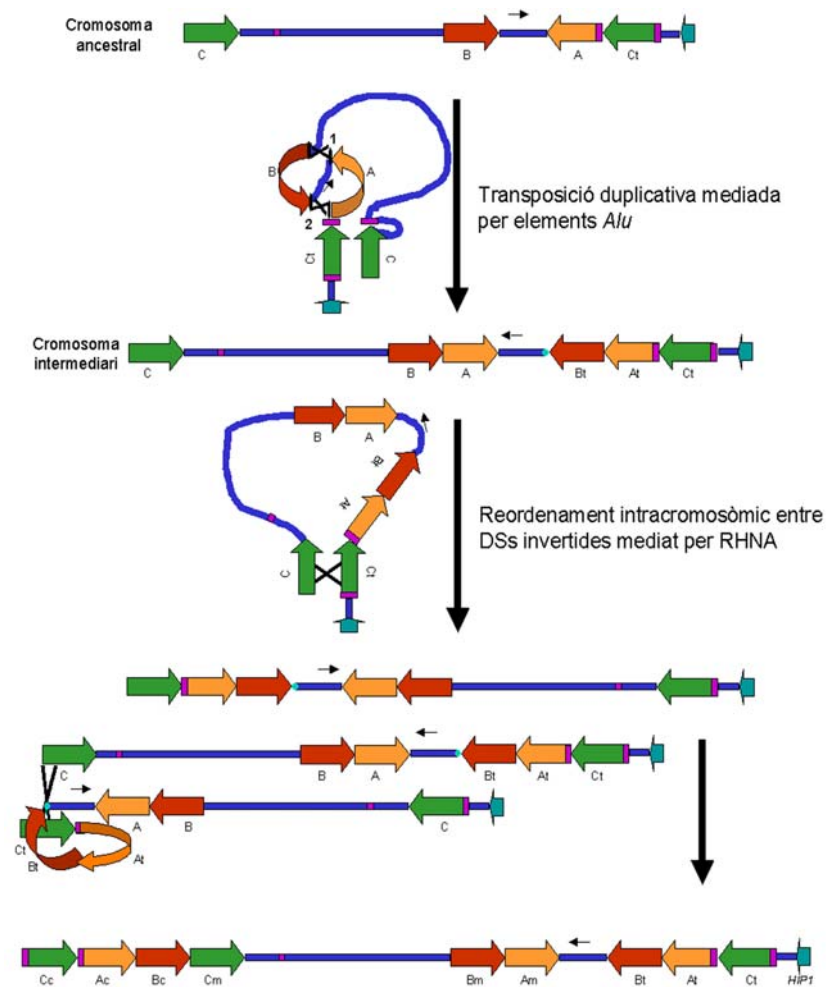


Figura 16.- Model evolutiu per la generació de les DSs de la regió 7q11.23. Reordenaments específics del llinatge humà predits, des d'un cromosoma ancestral hipotètic idèntic al del goril·la. Un reordenament intracromosòmic únic i complex en el cromosoma ancestral va crear un cromosoma intermediari mitjançant dos fenòmens de transposició duplicativa entre elements *Alu*, indicats com 1 i 2 segons l'ordre d'ocurrència. S'ha postulat una possible inversió paracèntrica intracromosòmica entre els blocs C del cromosoma intermediari, que estan disposats de manera invertida. La RHNA entre un portador d'aquesta inversió i un cromosoma intermediari normal podria haver conduït a la duplicació del bloc sencer que conté els blocs A, B i C a la regió centromèrica. La presència d'elements *Alu* als extrems dels blocs suggereix la transposició mediada per aquests elements en els passos finals de la generació de les DSs. Adaptada d'Antonell et al., 2005²⁰¹.

5 Duplicacions segmentàries i plasticitat genòmica

La generació de petites inversions paracèntriques sembla ser un fet comú en les regions riques en DSs, important tant a nivell evolutiu per la seva possible contribució en especiació com per la creació de polimorfismes intrapoblacionals^{265,266}. Així, s'han descrit múltiples inversions flanquejades per DSs, com per exemple a 15q11(9%)²⁶⁷, 22q11²⁶⁸ i 7p22 (5%)⁵⁶, 8p23 (27%)²⁶⁹ i 7q11.23 (4-5%)^{83,88}. En alguns casos, l'heterozigotisme per aquestes inversions s'ha associat a un augment del risc de tenir descendència afectada de diferents malalties causades per reordenaments genòmics addicionals d'aquestes regions. En aquests

casos les inversions es consideren al·lells de predisposició, al ser el percentatge de portadors superior entre els progenitors transmissors respecte a la població control. En són exemples la Síndrome de Sotos causada per una deleció d'1.9 Mb a 5q35²⁷⁰, la Síndrome inv-dup(8)(p) causada per reordenaments a 8p23²⁶⁹, la SWB causada per una deleció d'1.55 Mb a 7q11.23^{83,88}, la SA causada per una deleció de 4 Mb a 15q11.2-q13²⁶⁷ i en un cas descrit de la SMS causada per una deleció de la regió 17p11.2²⁷¹.

En el nostre model evolutiu hipotetitzem tres inversions evolutives en la regió, una en l'ancestre dels homínoids i dues durant les últimes fases de la generació de l'estructura humana. A més, probablement haurien existit cromosomes intermitjos que haurien sofert inversions.

6 Duplicacions segmentàries i evolució de noves funcions

Les DSs han contribuït a l'augment de pseudogens, creació de gens de fusió i nous gens. En la regió analitzada hem detectat el gen de fusió *POM-ZP3* localitzat a l'extrem telomèric però fora dels blocs descrits, present només en ximpanzés i humans. En aquesta regió també hem trobat una duplicació d'un bloc d'~80 Kb que conté el gen *HIP1* exclusiva de ximpanzés, que podria suposar un augment de funció de la proteïna original, la creació d'una proteïna amb una nova funció o d'un pseudogen. De les dues còpies de ximpanzé, una conté un codó de fi de la traducció prematur i genera una proteïna de 160 aa menys. Pel què fa als gens continguts dins dels blocs, tot i estar triplicats en humans, no suposen un augment en el nombre de còpies gèniques funcionals en la majoria de casos, sinó que corresponen a pseudogens amb mutacions o còpies truncades. Una excepció serien els gens *POM121* (del bloc C) i *GTF2IRD2* (del bloc B), que codifiquen per proteïnes potencialment funcionals en dos *loci* dels tres blocs de les DSs¹⁷⁰. A més a més, s'han descrit fenòmens de conversió gènica entre gen i pseudogens en el cas concret del gen *NCF1* (del bloc B), que poden augmentar el nombre de còpies funcionals del gen o reduir-lo. La freqüència de conversions de pseudogen a gen és molt més alta (~15% al·lells) que la de gen a pseudogen (~1/500). Teòricament, ni la pèrdua ni el guany d'una còpia gènica té conseqüències fenotípiques, però el fet que el genotip amb 3 al·lells funcionals del gen *NCF1* sigui molt més freqüent semblaria indicar una selecció postiva durant l'evolució d'aquest, probablement deguda a que confereix un avantatge evolutiu per l'organisme portador.

Tot i que seria d'esperar que els gens continguts en cromosomes reordenats haguessin sofert selecció positiva⁴¹, s'ha detectat una selecció neutre dels gens continguts en les DSs de 7q11.23, o fins i tot purificadora en el cas del gen *GTF2IRD2*.

7 Duplicacions segmentàries i la Síndrome de Williams-Beuren

La SWB és una aneusomia segmentària que afecta principalment el neurodesenvolupament. Els pacients amb la SWB presenten un fenotip complex i variable, però les bases moleculars d'aquesta variabilitat fenotípica encara es desconeixen. La deleció comú

comprèn 26-28 gens, depenent del punt de ruptura dins del bloc B de les DSs. Per tant, això podria ser en part la causa d'aquesta variabilitat, però també hi podrien estar implicades variants genètiques en l'al·lel no delectat, fenòmens d'imprinting i factors ambientals. No obstant, encara no s'ha descrit cap factor en *cis* o en *trans* causant de les diferències fenotípiques en pacients.

El mecanisme mutacional recurrent de la SWB és el mal aparellament i la posterior RHNA entre les DSs de la regió cromosòmica 7q11.23 que es troben en *tàndem*. En el 90% dels casos es dona entre els blocs Bc i Bm, la qual cosa provoca una delectió d'1.55 Mb, i en el 8% entre els blocs Ac i Am, donant lloc a una delectió d'1.84 Mb. El 2% restant correspon a delectacions atípiques no recurrents. La taxa mutacional en general és d' 1.33×10^{-4} , sent la majoria dels casos esporàdics. Tot i així, es podria diferenciar la taxa mutacional en progenitors portadors d'al·lels de predisposició ($\sim 1 \times 10^{-3}$ – $\sim 6.7 \times 10^{-4}$) de la resta de progenitors ($\sim 0.7 \times 10^{-4}$), fent que la taxa de recurrència tot i ser molt baixa en ambdós casos sigui més alta en els primers. Les delectacions parcials descrites han permès establir unes correlacions clínico-moleculares pels gens que es troben en hemizigosis en aquests pacients^{135,175,179,181,183,189,272}.

La definició detallada de la localització del punt de ruptura de la RHNA dins del bloc B recombinant en 96 pacients clínicament molt ben caracteritzats ha permès classificar-los en 5 grups. Cada grup es distingeix per un nombre determinat de còpies funcionals dels gens *NCF1* i *GTF2IRD2*. Mitjançant anàlisis estadístics hem trobat una associació entre estenosis cardiovascular i sexe masculí²⁷³, i entre microcefàlia i origen matern de la delectió^{196,274}, ambdues descrites prèviament. Això apuntaria a un possible efecte de l'imprinting genòmic sobre gens de la regió que podrien estar implicats en el tamany craneal, tot i que s'hauria de testar en sèries més grans. També en aquest sentit, recentment s'han descrit punts calents per la RHNA que són diferencials en meiosi femenina i masculina²¹¹, la qual cosa indicaria que l'origen parental de la delectió s'hauria de considerar sempre juntament amb el punt de ruptura de la delectió.

8 *NCF1* i hipertensió arterial

En els anàlisis estadístics realitzats agrupant els pacients en funció del punt de ruptura i el nombre de còpies funcionals dels gens *NCF1* i *GTF2IRD2*, l'única variable clínica explorada que va resultar estar fortament associada amb un grup en concret va ser la HTA. La seva prevalença era significativament superior entre els pacients amb la SWB que no tenen el gen *NCF1* delectat (punt de ruptura proximal al gen).

NCF1 codifica per p47^{phox}, una subunitat citosòlica del complex enzimàtic NOX implicat en estrès oxidatiu. Per tal de poder demostrar funcionalment que la no delectió del gen *NCF1* podria ser la responsable d'aquesta major prevalença d'HTA en els pacients amb la SWB, es van voler comparar els nivells de proteïna expressada i la funcionalitat del complex NOX entre pacients amb i sense delectió d'*NCF1*. Mitjançant western-blot i immunocitoquímica realitzada amb un anticòs específic per p47^{phox}, es va observar que l'hemizigotitat pel gen *NCF1* implicava una reducció important en els nivells de proteïna. També es va detectar una reducció

significativa en la capacitat de generar estrès oxidatiu en els pacients amb una còpia funcional de $p47^{phox}$ versus línies cel·lulars de pacients i controls amb dues còpies funcionals. Per tant, aquests resultats indiquen una associació entre HTA i el genotip per *NCF1*, així com una implicació de l'homeostasis redox en la patogènia de la HTA en la SWB.

Segons això, els pacients portadors de 3 còpies funcionals d'*NCF1* (13%) presentarien un augment d'expressió de $p47^{phox}$ i de l'activitat del complex NOX. No obstant, aquesta variant polimòrfica tot i que provoca un augment significatiu de l'expressió de $p47^{phox}$, no determina una major activitat del complex enzimàtic NOX i per tant no comporta un augment de la prevalença d'HTA en aquests pacients en comparació amb els pacients amb dues còpies gèniques funcionals. Aquests resultats són recolzats per l'estudi realitzat comparant el genotip d'*NCF1* en una cohort de pacients amb HTA i una de controls amb pressió normal, on es van detectar freqüències idèntiques de la variant genòmica de 3 còpies. Per tant, tampoc sembla tenir una influència significativa en l'etiologia de la hipertensió essencial en la població general.

Si la deleció d'una còpia d'*NCF1* és un factor protector per hipertensió, perquè el guany no n'augmenta el risc? L'explicació més probable per aquest fet seria que el complex NOX és heteromultimèric i requereix quantitats estoiquiomètriques d'almenys cada subunitat citosòlica ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$ i $p67^{phox}$)²⁷⁵, de manera que un augment en el número de còpies de tan sols una de les subunitats podria no conduir a un augment en l'activitat de l'oxidasa. Explicacions alternatives serien que la còpia extra d'*NCF1* fos en realitat un pseudogen per altres canvis de seqüència no detectats (a part de la inserció/deleció GT), i/o que la variant polimòrfica tingués influència només quan altres factors genètics o ambientals coincideixen.

9 Implicació del sistema renina-angiotensina i les espècies reactives de l'oxigen en hipertensió arterial

Recentment s'han implicat les ROS en diverses formes d'HTA i les seves complicacions cardiovasculars²²⁹. Un augment de la pressió intraluminal activa les oxidases vasculares com la NOX, provocant un augment de la producció d' O_2^- i l'alteració del balanç entre vasoconstrictors i vasodilatadors en l'endoteli²⁷⁶. Això contribueix a contraccions depenents d'endoteli, a una resistència vascular augmentada i a la generació de productes resultat de la reacció de les ROS, com l' $OONO^-$, el qual és perjudicial per les cèl·lules al provocar la nitrotirosinació de proteïnes.

S'ha demostrat que la infusió crònica d'AngII en rates augmenta l'expressió de la subunitat $p47^{phox}$ de la NOX en vasos sanguinis, la màcula densa i la nefrona distal, provocant l'elevació dels nivells de ROS²⁷⁷. Estudis realitzats amb el ratolí KO per *Ncf1* han evidenciat que $p47^{phox}$ és un dels principals efectors de l'acció de l'AngII, ja que l'administració d'AngII en aquest ratolí no va provocar un augment de la producció d' O_2^- ni l'elevació de la pressió sanguínia a diferència del que s'observa en els wt²⁷⁸. Els ratolins $p47^{phox-/-}$ reproduïrien d'alguna manera la situació en els pacients amb la SWB.

Els pacients amb la SWB tenen una major susceptibilitat a desenvolupar HTA per l'hemizigositat en el gen *ELN*. L'experimentació animal ha demostrat que una disminució d'elastina porta a canvis estructurals en les parets dels vasos sanguinis, amb lamel·les elàstiques més fines i un increment en el nombre de capes de múscul llis, la qual cosa porta a una reducció del diàmetre del vas sanguini i a una disminució de l'elasticitat de la paret¹⁷². Aquests són factors de predisposició per l'elevació dels nivells d'AngII i renina, com s'ha observat en els animals heterozigots per la deleció d'*Eln*. Els ratolins *Eln*^{-/+} desenvolupen HTA que pot ser disminuïda amb inhibidors de l'AngII¹⁸⁵, suggerint que el sistema renina-angiotensina juga un paper significatiu en el manteniment de la pressió sanguínia. S'ha proposat un model per explicar l'efecte protector que tindria l'hemizigositat pel gen *NCF1* en els pacients amb la SWB (deleció en hemizigosis d'*ELN*): l'elevació dels nivells d'AngII condueix al desenvolupament d'HTA només en aquells casos en què l'habilitat de generar un alt estrès oxidatiu és normal, com per exemple quan dues o més còpies del gen *NCF1* són presents.

Els antioxidants podrien restablir les funcions endotelials i disminuir la pressió sanguínia en diversos models d'HTA que impliquen AngII i el sistema redox, però el seu benefici clínic en humans encara no està del tot clar²⁷⁹. Els nostres resultats suggereixen que en la SWB, el tractament amb antioxidants podria tenir efectes protectors per HTA, donada la implicació patogènica del sistema redox. A part d'antioxidants generals, els agents anti-NAD(P)H (encara en assajos clínics), els inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina o bloquejants del receptor de l'AngII, podrien estar indicats en pacients amb la SWB. Donat que la HTA causa una morbiditat significativa en els pacients amb la SWB, contribuint a complicacions com l'isquèmia cardíaca i la mort sobtada^{280,281}, l'inici d'assajos clínics en aquests pacients sembla adequat.

10 Aproximació funcional al gen *GTF2IRD2*

El gen *GTF2IRD2* forma part de la família de factors de transcripció TFII-I, junt amb *GTF2I* i *GTF2IRD1*. Es troba duplicat exclusivament en humans i ha sofert selecció purificadora durant l'evolució. L'estudi de pacients amb delecions parcials i models animals han implicat *GTF2I* i *GTF2IRD1* en anomalies cràneo-facials, hiperacúsia, retard en el creixement i part del fenotip neurocognitiu^{102,183,189,194}.

Al igual que *NCF1*, *GTF2IRD2* és un gen que presenta variabilitat en el nombre de còpies funcionals entre els pacients amb la SWB, en funció del punt de ruptura, i que per tant podria tenir un paper important en la variabilitat del fenotip, especialment del neurocognitiu. Existeixen dues còpies funcionals de *GTF2IRD2* localitzades a Bm i Bt, mentre que la còpia present a Bc no es transcriu. Els pacients amb la SWB que tenen una deleció entre blocs A (1.83 Mb) perdrien una còpia funcional de Bm (1M+2T) (Figura 17 A). Si la deleció es dona entre blocs B es poden trobar 3 situacions diferents (Figura 17 B). Si el punt de ruptura és proximal al gen no es perdria cap de les còpies funcionals (2M+2T) i no implicaria cap diferència respecte la població control (B1,B2). Si el punt de ruptura es troba dins el gen *GTF2IRD2* es crearia una còpia quimèrica (Q) entre el final del pseudogen centromèric i el

començament del gen del bloc Bm (1M+1Q+2T) (B3). Si un dels progenitors és portador d'una inversió de la regió, la RHNA intercromosòmica té el punt de ruptura localitzat gairebé sempre a l'inici de *GTF2IRD2*, amb la qual cosa es crearia una còpia quimèrica entre Bt i Bm, que seria equivalent a una còpia telomèrica perquè els dos primers exons de Bt i Bm tenen una seqüència nucleotídica idèntica (1M+3T) (B4).

En els anàlisis de correlacions clínic-moleculares només s'ha detectat una associació significativa de *GTF2IRD2* amb HTA. Però hem observat que les dues variants teòricament normals pel que fa a la funció de *GTF2IRD2* tindrien una associació oposada amb el risc d'HTA: la variant 2M+2T (que no sol anar acompanyada de la deleció d'*NCF1*) està fortament associada amb el risc de desenvolupar HTA, mentre que la variant 1M+3T (liligada a hemizigositat d'*NCF1*) està associada amb disminució del risc. A més, les variants considerades hipomòrfiques (1M+2T i 1M+1Q+2T) no estan associades a HTA. Així, tot i que encara es disposa de poca informació sobre la funció de *GTF2IRD2*, els nostres resultats suggereixen que el més probable és que sigui *NCF1*, i no *GTF2IRD2*, el principal factor determinant de la diferent prevalença d'HTA en aquesta població, ja que les variants de *GTF2IRD2* mostrarien una associació significativa pel fet que molts reordenaments afecten *NCF1* i *GTF2IRD2* de manera conjunta (Figura 17).

Recentment s'ha caracteritzat l'estructura genòmica de *GTF2IRD2* i s'han predit les seves propietats proteiques^{170,258}. Per intentar entendre millor les seves capacitats d'unió a ADN i proteïnes, s'han generat construccions fusionades a GFP o GST de tres possibles variants funcionals: del bloc Bm (M), del bloc Bt (T), i la quimèrica Bm-Bc (Q).

No s'ha detectat cap senyal NLS a cap de les proteïnes de *GTF2IRD2*²⁸², la qual cosa podria implicar que cap d'elles fos capaç de desplaçar-se al nucli per ella mateixa. Tot i així, s'ha observat una localització nuclear tant en la variant M com T, però no en la Q. Això permetria hipotetitzar que modificacions post-traduccionals (N-glicosilacions o fosforilacions) o la interacció amb altres proteïnes serien claus per la seva translocació a nucli. De fet, la co-expressió amb *GTF2I* wt augmenta lleugerament la seva distribució nuclear, indicant un possible paper de *GTF2I* en aquest procés. Actualment se sap que *GTF2I* i *GTF2IRD1* interaccionen²⁸³ i quan es co-expressen *GTF2IRD1* influencia la localització de *GTF2I*²⁵⁵.

El fet que les tres variants de *GTF2IRD2* mostrin un patró de localització cel·lular diferent tot i la seva alta homologia a nivell de proteïna podria ajudar a identificar els aa importants en aquest procés. Les proteïnes M i T es diferencien només per 6 aa, trobant-se totes les diferències menys una al domini Charlie8. Però la proteïna més interessant és la Q perquè mostra una localització exclusivament citoplasmàtica. Aquesta és 18 aa més llarga que les altres dues (per un codó de fi de la traducció diferent) i presenta 3 diferències aminoacídiques específiques respecte les altres dues al domini Charlie8.

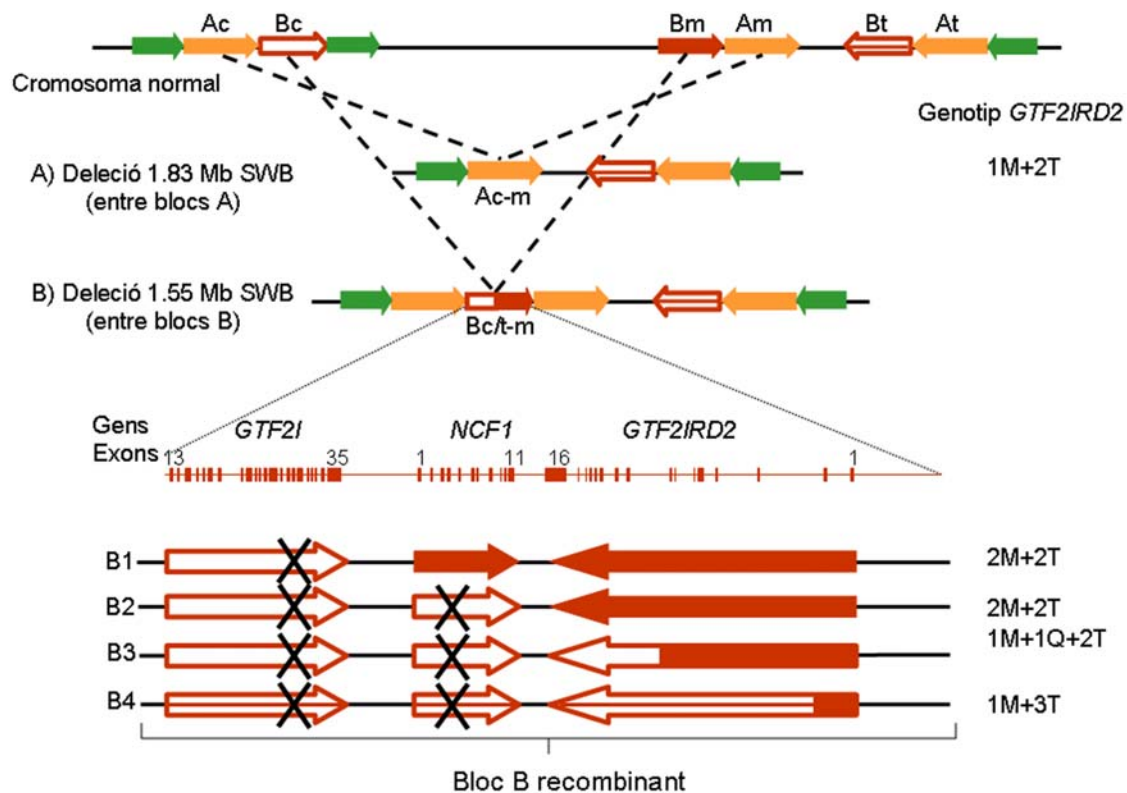


Figura 17.- Representació esquemàtica de les delecions recurrents causants del SWB i el genotip de *GTF2IRD2* resultant. El bloc B recombinant es mostra amb els tres gens que en formen part i es diferencien les localitzacions Bc (blanc), Bm (vermell) i Bt (amb ratlla vermella horitzontal al centre). Les còpies de *GTF2IRD2* s'indiquen com M (del bloc Bm), T (del bloc Bt) i Q (quimèrica entre Bm-Bc). Adaptada de Del Campo et al., 2006²⁸⁴.

Una de les característiques més importants de *GTF2IRD2* és la presència de dues repeticions I que contenen un domini HLH cada una, els quals s'han implicat en homo- i heterodimerització, com en el cas de *GTF2I*^{241,246}. Aquestes repeticions a *GTF2IRD2* es troben altament conservades i tenen una gran homologia amb les repeticions R-1 i R-6 de *GTF2I*^{170,282}. A més a més, *GTF2IRD2* també conté dues LZ, les quals també són motius de dimerització. Les LZ són altament homòlogues amb les de *GTF2I*, suggerint que aquestes dues proteïnes podrien formar heterodímers²⁴³. En estudis *in vitro* de sobreexpressió s'ha detectat que les diferents proteïnes funcionals de *GTF2IRD2* interaccionen amb *GTF2I*, però només la T ho fa amb *GTF2IRD1*. Tot i així, caldria determinar també les seves capacitats d'homodimerització i interacció entre les diferents variants de *GTF2IRD2*.

GTF2IRD2 conté un dit de zinc Cys-2/His-2, el qual és un domini d'unió a ADN^{170,258}. La repetició-I 2 (R2) de *GTF2IRD2* ha estat agrupada mitjançant anàlisis filogenètics amb l'R4 de *GTF2IRD1*, la qual conté una regió de residus bàsics conservada i implicada en unió a ADN²⁴³. No obstant, al analitzar la seva capacitat d'activar/reprimir el promotor del gen *c-fos*, tal com fa *GTF2I*, no es va detectar cap efecte en comparació amb el vector control, probablement degut a que no té la capacitat d'unir-se a aquesta seqüència. Caldria determinar, però, si *GTF2IRD2*

podria influir en la transcripció de *c-fos* mitjançant la interacció amb GTF2I, o bé si és capaç d'unir-se a altres seqüències promotores com la del promotor V β 5.2.

En resum, les tres possibles variants funcionals de GTF2IRD2 en els pacients amb la SWB es comporten de manera diferent, sent la forma Q la més diferent per la seva localització exclusivament citoplasmàtica. Les formes M i T són capaces d'interaccionar amb altres membres de la seva família i localitzar-se a nucli, però no tenen cap efecte en la transcripció del gen *c-fos*.

Tot i que els estudis *in vitro* són molt útils i importants per començar a fer la caracterització funcional d'aquestes proteïnes, la disponibilitat d'un anticòs específic per GTF2IRD2 i un model animal proporcionarà una eina molt valuosa per poder realitzar estudis *in vivo*, que permetrien determinar més exactament la seva funcionalitat.

L'estudi de la família de factors de transcripció TFII-I, que localitza a 7q11.23, junt amb la informació clínica de pacients amb delecions parcials, està ajudant a determinar la seva implicació concreta en el fenotip de la SWB. No obstant, donades les complexes interaccions que es segurament es poden establir entre els membres de la família, serà difícil determinar d'una manera precisa les contribucions individuals de l'haploinsuficiència de cada un d'aquests gens en el fenotip.

~ CONCLUSIONS ~

Breument, les aportacions d'aquest treball són:

1.- Les DSs que flanquegen el *locus* de la SWB a la regió 7q11.23 humana tenen una estructura modular i han aparegut durant els últims 25 Ma d'evolució, sent específiques de la família *Hominidae*.

2.- Els diferents mòduls de les DSs de la regió 7q11.23 han evolucionat de manera independent. Els blocs A i C es troben duplicats en tots els homínoids, mentre que el bloc B no està duplicat en cap primat no humà. Un bloc que conté el gen *HIP1* es troba duplicat exclusivament en ximpanzé.

3.- El mecanisme proposat per la generació de les DSs de la regió 7q11.23 consisteix inicialment en fenòmens de transposició duplicativa de petits mòduls a la regió, seguits de RHNA entre aquests mòduls i finalment transposició replicativa de grans blocs mediada per elements *Alu*. La presència de gens transcrits activament durant la meiosis i en direccions transcripcionals oposades i solapades hauria facilitat els trencaments de doble cadena i facilitat així la RHNA.

4.- Les DSs han contribuït a la creació de gens de fusió, pseudogens, augment de funció original i nous gens. Destacaria especialment *GTF2IRD2*, un gen amb dues còpies funcionals exclusivament en humans i sotmès a selecció purificadora durant l'evolució.

5.- El 90% dels pacients amb la SWB presenten una deleció d'idèntic tamany, 1.55 Mb, però segons la localització del punt de ruptura de la deleció existeix variabilitat en l'*status* de deleció/no deleció dels gens *NCF1* i *GTF2IRD2*.

6.- La deleció del gen *NCF1* correlaciona de manera significativa amb un menor risc de desenvolupar HTA. L'hemizigositat per *NCF1* condueix a una reducció de la quantitat de proteïna expressada p47^{phox}. Això repercuteix en una reducció de l'activitat de l'oxidasa NAD(P)H i per tant una reducció de la generació d'espècies reactives de l'oxigen.

7.- S'ha proposat un model patogènic per la HTA en la SWB, segons el qual el dèficit d'elastina condueix a un estretament de la llum vascular i a un augment mantingut de l'estrès oxidatiu estimulat per AngII. La deleció d'una còpia d'*NCF1* protegeix contra la HTA mitjançant la reducció de l'estrès oxidatiu.

8.- Hem trobat una variant de 2 còpies funcionals del gen *NCF1* present en el 7% dels cromosomes. Les cèl·lules amb aquest genotip mostren un augment de l'expressió de p47^{phox}, però no un augment de l'activitat del complex oxidasa NAD(P)H.

9.- Existeixen 2 còpies teòricament funcionals del gen *GTF2IRD2* i una forma quimèrica que es genera en alguns pacients amb la SWB. Cada una mostra una localització cel·lular diferent, la qual cosa podria indicar una especialització funcional divergent.

10.- Les proteïnes GTF2IRD2 formen part de la família de factors de transcripció TFII-I i són capaces d'interaccionar amb els altres dos membres: GTF2I i GTF2IRD1. No obstant, no semblen participar en la regulació transcripcional del promotor del gen *c-fos*.

ABREVIATURES

aa Aminoàcid

Ac Bloc A centromèric

ADN Àcid Desoxiribonucleic, més conegut com DNA (de l'anglès *Deoxyribonucleic Acid*)

Am Bloc A mig

AngII Angiotensina II

ARN Àcid Ribonucleic, més conegut com a RNA (de l'anglès *Ribonucleic Acid*)

At Bloc A telomèric

BACs Bacterial Artificial Chromosomes

Bc Bloc B centromèric

Bm Bloc B mig

BR Regió bàsica del' ADN (de l'anglès *Basic Region*)

Bt Bloc B telomèric

Btk Tirosina quinasa de Bruton (de l'anglès *Bruton Tyrosine Kinase*)

Cc Bloc C centromèric

Cm Bloc C mig

CMT1A Charcot-Marie-Tooth Tipus 1A

Ct Bloc C telomèric

DS Duplicació Segmentària

ESVA Estenosis Supraaòrtica

FISH Hibridació *In Situ* Fluorescent (de l'anglès *Fluorescent In Situ Hybridization*)

H₂O₂ Peròxid d'hidrogen

HLH Helix-Loop-Helix

HTA Hipertensió arterial

KO *Knockout*

LZ Cremallera de Leucina (de l'anglès *Leucine zipper*)

Ma Milions d'anys

NAD(P)H Nicotin-amide denine dinucleotide phosphate

NLS Senyal de Localització Nuclear (de l'anglès *Nuclear Localization Signal*)

NOX Oxidasa NAD(P)H

NO Òxid nítric

O₂ Oxigen

O₂⁻ Anió superòxid

OH Radicals hidroxil

OONO⁻ Peroxinitrit

ORF Pauta Oberta de Lectura (de l'anglès *Open Reading Frame*)

phox Phagocyte oxidase

PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate

PNCs Polimorfismes de nombre de còpies

PSVs Variants Paràlogues de Seqüència (de l'anglès *Paralogous Sequence Variants*)

QI Quocient intel·lectual

RHNA Recombinació Homòloga No Al·lèlica

ROS Espècies Reactives de l'Oxigen (de l'anglès *Reactive Oxygen Species*)

RT-PCR Transcripció Reversa-Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

SA Síndrome d'Angelman

SINE Element curt repetitiu dispers (de l'anglès *Short Interspersed Element*)

SMS Síndrome d'Smith-Magenis

SOD Dismutasa superòxid (de l'anglès *Superoxide Dismutase*)

SWB Síndrome de Williams Beuren

wt *Wild type*

~ BIBLIOGRAFIA ~

1. Samonte RV, Eichler EE. Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nat Rev Genet* 2002; 3(1):65-72.
2. Eichler EE. Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet* 2001; 17(11):661-669.
3. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 2001; 11(6):1005-1017.
4. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S et al. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002; 297(5583):1003-1007.
5. Cheung J, Estivill X, Khaja R, MacDonald JR, Lau K, Tsui LC et al. Genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence. *Genome Biol* 2003; 4(4):R25.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431(7011):931-945.
7. Zhang L, Lu HH, Chung WY, Yang J, Li WH. Patterns of segmental duplication in the human genome. *Mol Biol Evol* 2005; 22(1):135-141.
8. Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C et al. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* 2003; 424(6945):157-164.
9. Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA et al. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 2003; 300(5620):767-772.
10. Guy J, Spalluto C, McMurray A, Hearn T, Crosier M, Viggiano L et al. Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10q. *Hum Mol Genet* 2000; 9(13):2029-2042.
11. Eichler EE, Lu F, Shen Y, Antonacci R, Jurecic V, Doggett NA et al. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet* 1996; 5(7):899-912.
12. Eichler EE, Archidiacono N, Rocchi M. CAGGG repeats and the pericentromeric duplication of the hominoid genome. *Genome Res* 1999; 9(11):1048-1058.
13. Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, Friedman C, Young JM, Trask BJ. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 2005; 437(7055):94-100.
14. Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH, Jr. Isolation of an active human transposable element. *Science* 1991; 254(5039):1805-1808.
15. Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 1999; 283(5407):1530-1534.
16. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002; 3(5):370-379.

17. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
18. Jurka J, Smith T. A fundamental division in the Alu family of repeated sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(13):4775-4778.
19. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999; 67(3):183-193.
20. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet* 2003; 73(4):823-834.
21. Kiyosawa H, Chance PF. Primate origin of the CMT1A-REP repeat and analysis of a putative transposon-associated recombinational hotspot. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6):745-753.
22. Keller MP, Seifried BA, Chance PF. Molecular evolution of the CMT1A-REP region: a human- and chimpanzee-specific repeat. *Mol Biol Evol* 1999; 16(8):1019-1026.
23. Babcock M, Pavlicek A, Spiteri E, Kashork CD, Ioshikhes I, Shaffer LG et al. Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution. *Genome Res* 2003; 13(12):2519-2532.
24. Susumu O. *Evolution by Gene Duplication*. New York: Springer, 1970.
25. Ben Arie N, Lancet D, Taylor C, Khen M, Walker N, Ledbetter DH et al. Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum Mol Genet* 1994; 3(2):229-235.
26. Teglund S, Olsen A, Khan WN, Frangsmyr L, Hammarstrom S. The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster on human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG genes and identification of 6 new genes forming a third subgroup within the carcinoembryonic antigen (CEA) family. *Genomics* 1994; 23(3):669-684.
27. Cheung J, Wilson MD, Zhang J, Khaja R, MacDonald JR, Heng HH et al. Recent segmental and gene duplications in the mouse genome. *Genome Biol* 2003; 4(8):R47.
28. Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 2000; 290(5494):1151-1155.
29. Prince VE, Pickett FB. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* 2002; 3(11):827-837.
30. Kirsch S, Weiss B, Miner TL, Waterston RH, Clark RA, Eichler EE et al. Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. *Genome Res* 2005; 15(2):195-204.
31. Force A, Cresko WA, Pickett FB, Proulx SR, Amemiya C, Lynch M. The origin of subfunctions and modular gene regulation. *Genetics* 2005; 170(1):433-446.
32. Lynch M, Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 2000; 154(1):459-473.
33. Rastogi S, Liberles DA. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol* 2005; 5(1):28.

34. Dulai KS, von Dornum M, Mollon JD, Hunt DM. The evolution of trichromatic color vision by opsin gene duplication in New World and Old World primates. *Genome Res* 1999; 9(7):629-638.
35. Rosenberg HF, Dyer KD. Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family. *J Biol Chem* 1995; 270(37):21539-21544.
36. Ciccarelli FD, von Mering C, Suyama M, Harrington ED, Izaurralde E, Bork P. Complex genomic rearrangements lead to novel primate gene function. *Genome Res* 2005; 15(3):343-351.
37. Courseaux A, Nahon JL. Birth of two chimeric genes in the Hominidae lineage. *Science* 2001; 291(5507):1293-1297.
38. Kipersztok S, Osawa GA, Liang LF, Modi WS, Dean J. POM-ZP3, a bipartite transcript derived from human ZP3 and a POM121 homologue. *Genomics* 1995; 25(2):354-359.
39. Yunis JJ, Prakash O. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 1982; 215(4539):1525-1530.
40. Rieseberg LH. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* 2001; 16(7):351-358.
41. Navarro A, Barton NH. Chromosomal speciation and molecular divergence--accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* 2003; 300(5617):321-324.
42. Vallender EJ, Lahn BT. Effects of chromosomal rearrangements on human-chimpanzee molecular evolution. *Genomics* 2004; 84(4):757-761.
43. Zhang J. Frequent false detection of positive selection by the likelihood method with branch-site models. *Mol Biol Evol* 2004; 21(7):1332-1339.
44. Armengol L, Pujana MA, Cheung J, Scherer SW, Estivill X. Enrichment of segmental duplications in regions of breaks of synteny between the human and mouse genomes suggest their involvement in evolutionary rearrangements. *Hum Mol Genet* 2003; 12(17):2201-2208.
45. Bailey JA, Church DM, Ventura M, Rocchi M, Eichler EE. Analysis of segmental duplications and genome assembly in the mouse. *Genome Res* 2004; 14(5):789-801.
46. Goidts V, Szamalek JM, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H. Segmental duplication associated with the human-specific inversion of chromosome 18: a further example of the impact of segmental duplications on karyotype and genome evolution in primates. *Hum Genet* 2004; 115(2):116-122.
47. Kehrer-Sawatzki H, Schreiner B, Tanzer S, Platzer M, Muller S, Hameister H. Molecular characterization of the pericentric inversion that causes differences between chimpanzee chromosome 19 and human chromosome 17. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2):375-388.
48. Kehrer-Sawatzki H, Sandig C, Chuzhanova N, Goidts V, Szamalek JM, Tanzer S et al. Breakpoint analysis of the pericentric inversion distinguishing human chromosome 4 from the homologous chromosome in the chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Hum Mutat* 2005; 25(1):45-55.
49. Kehrer-Sawatzki H, Sandig CA, Goidts V, Hameister H. Breakpoint analysis of the pericentric inversion between chimpanzee chromosome 10 and the

- homologous chromosome 12 in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108(1-3):91-97.
50. Locke DP, Archidiacono N, Miscio D, Cardone MF, Deschamps S, Roe B et al. Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. *Genome Biol* 2003; 4(8):R50.
 51. Stankiewicz P, Park SS, Inoue K, Lupski JR. The evolutionary chromosome translocation 4;19 in *Gorilla gorilla* is associated with microduplication of the chromosome fragment syntenic to sequences surrounding the human proximal CMT1A-REP. *Genome Res* 2001; 11(7):1205-1210.
 52. Murphy WJ, Agarwala R, Schaffer AA, Stephens R, Smith C, Jr., Crumpler NJ et al. A rhesus macaque radiation hybrid map and comparative analysis with the human genome. *Genomics* 2005; 86(4):383-395.
 53. Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T et al. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(18):8611-8615.
 54. Muller S, Finelli P, Neusser M, Wienberg J. The evolutionary history of human chromosome 7. *Genomics* 2004; 84(3):458-467.
 55. DeSilva U, Massa H, Trask BJ, Green ED. Comparative mapping of the region of human chromosome 7 deleted in williams syndrome. *Genome Res* 1999; 9(5):428-436.
 56. Feuk L, MacDonald JR, Tang T, Carson AR, Li M, Rao G et al. Discovery of human inversion polymorphisms by comparative analysis of human and chimpanzee DNA sequence assemblies. *PLoS Genet* 2005; 1(4):e56.
 57. Korenberg JR, Chen XN, Hirota H, Lai Z, Bellugi U, Burian D et al. VI. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. *J Cogn Neurosci* 2000; 12 Suppl 1:89-107.
 58. Fujiyama A, Watanabe H, Toyoda A, Taylor TD, Itoh T, Tsai SF et al. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science* 2002; 295(5552):131-134.
 59. Cheng Z, Ventura M, She X, Khativich P, Graves T, Osoegawa K et al. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 2005; 437(7055):88-93.
 60. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 2005; 437(7055):69-87.
 61. Chen FC, Li WH. Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet* 2001; 68(2):444-456.
 62. Eichler EE, Budarf ML, Rocchi M, Deaven LL, Doggett NA, Baldini A et al. Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Mol Genet* 1997; 6(7):991-1002.
 63. Regnier V, Meddeb M, Lecointre G, Richard F, Duverger A, Nguyen VC et al. Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. *Hum Mol Genet* 1997; 6(1):9-16.

64. Park SS, Stankiewicz P, Bi W, Shaw C, Lehoczky J, Dewar K et al. Structure and evolution of the Smith-Magenis syndrome repeat gene clusters, SMS-REPs. *Genome Res* 2002; 12(5):729-738.
65. 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(6):1025-1037.
66. Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* 2001; 3(1):6-13.
67. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305(5683):525-528.
68. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; 36(9):949-951.
69. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005; 77(1):78-88.
70. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 2005; 37(7):727-732.
71. Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 2006; 38(1):82-85.
72. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 2006; 38(1):86-92.
73. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998; 14(10):417-422.
74. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18(2):74-82.
75. Roth DB, Wilson JH. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* 1986; 6(12):4295-4304.
76. Stankiewicz P, Lupski JR. Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(3):312-319.
77. Mazzarella R, Schlessinger D. Pathological consequences of sequence duplications in the human genome. *Genome Res* 1998; 8(10):1007-1021.
78. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000; 34:297-329.
79. Kiyosawa H, Chance PF. Primate origin of the CMT1A-REP repeat and analysis of a putative transposon-associated recombinational hotspot. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6):745-753.
80. Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet* 2000; 9(11):1665-1670.

81. Lopez-Correa C, Dorschner M, Brems H, Lazaro C, Clementi M, Upadhyaya M et al. Recombination hotspot in NF1 microdeletion patients. *Hum Mol Genet* 2001; 10(13):1387-1392.
82. Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA et al. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 1996; 12(3):288-297.
83. Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 2003; 73(1):131-151.
84. Bi W, Park SS, Shaw CJ, Withers MA, Patel PI, Lupski JR. Reciprocal crossovers and a positional preference for strand exchange in recombination events resulting in deletion or duplication of chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet* 2003; 73(6):1302-1315.
85. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, van d, V, Oates RD et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 2002; 71(4):906-922.
86. Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R et al. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2):276-285.
87. Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L et al. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8):849-858.
88. Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet* 2001; 29(3):321-325.
89. Chance PF, Abbas N, Lensch MW, Pentao L, Roa BB, Patel PI et al. Two autosomal dominant neuropathies result from reciprocal DNA duplication/deletion of a region on chromosome 17. *Hum Mol Genet* 1994; 3(2):223-228.
90. Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms. *Mol Med* 1998; 4(1):3-11.
91. Chen KS, Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, Chinault AC et al. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat Genet* 1997; 17(2):154-163.
92. Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V et al. Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 2000; 24(1):84-87.
93. Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K. NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum Mol Genet* 2000; 9(1):35-46.
94. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB et al. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 1999; 65(2):370-386.

95. Pujana MA, Nadal M, Guitart M, Armengol L, Gratacos M, Estivill X. Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(1):26-35.
96. Repetto GM, White LM, Bader PJ, Johnson D, Knoll JH. Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* 1998; 79(2):82-89.
97. Huang B, Crolla JA, Christian SL, Wolf-Ledbetter ME, Macha ME, Papenhausen PN et al. Refined molecular characterization of the breakpoints in small inv dup(15) chromosomes. *Hum Genet* 1997; 99(1):11-17.
98. Wandstrat AE, Leana-Cox J, Jenkins L, Schwartz S. Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4):925-936.
99. Wandstrat AE, Schwartz S. Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma* 2000; 109(7):498-505.
100. Peoples R, Franke Y, Wang YK, Perez-Jurado L, Paperna T, Cisco M et al. 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(1):47-68.
101. Perez 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 deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet* 1998; 7(3):325-334.
102. Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S et al. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med* 2005; 353(16):1694-1701.
103. Knoll JH, Asamoah A, Pletcher BA, Wagstaff J. Interstitial duplication of proximal 22q; phenotypic overlap with cat eye syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 55(2):221-224.
104. Hased SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ. A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Clin Genet* 2004; 65(5):400-404.
105. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N et al. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 1999; 8(7):1157-1167.
106. Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 1999; 64(4):1076-1086.
107. McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE. Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 81(3-4):222-228.
108. Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, Niikawa N, Lupski JR. Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet* 2005; 14(4):535-542.
109. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of

- intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 2000; 9(17):2563-2572.
110. Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R et al. Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet* 2000; 9(15):2291-2296.
 111. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001; 29(3):279-286.
 112. Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1:R57-R64.
 113. Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M et al. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5):1101-1116.
 114. Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:199-242.
 115. Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002; 17(4):269-271.
 116. FANCONI G, GIRARDET P, SCHLESINGER B, BUTLER N, BLACK J. [Chronic hyperglycemia, combined with osteosclerosis, hyperazotemia, nanism and congenital malformations.]. *Helv Paediatr Acta* 1952; 7(4):314-349.
 117. SISSMAN NJ, NEILL CA, SPENCER FC, TAUSSIG HB. Congenital aortic stenosis. *Circulation* 1959; 19(3):458-468.
 118. WILLIAMS JC, BARRATT-BOYES BG, LOWE JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 1961; 24:1311-1318.
 119. BEUREN AJ, APITZ J, HARMJANZ D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation* 1962; 26:1235-1240.
 120. EISENBERG R, YOUNG D, JACOBSON B, BOITO A. FAMILIAL SUPRAVALVULAR AORTIC STENOSIS. *Am J Dis Child* 1964; 108:341-347.
 121. 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(5):356-360.
 122. Kaplan P, Kirschner M, Watters G, Costa MT. Contractures in patients with Williams syndrome. *Pediatrics* 1989; 84(5):895-899.
 123. Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr* 1988; 113(2):318-326.
 124. Kruse K, Pankau R, Gosch A, Wohlfahrt K. Calcium metabolism in Williams-Beuren syndrome. *J Pediatr* 1992; 121(6):902-907.
 125. Partsch CJ, Dreyer G, Gosch A, Winter M, Schneppenheim R, Wessel A et al. Longitudinal evaluation of growth, puberty, and bone maturation in children with Williams syndrome. *J Pediatr* 1999; 134(1):82-89.

126. Bellugi U, Lichtenberger L, Jones W, Lai Z, St George M. I. The neurocognitive profile of Williams Syndrome: a complex pattern of strengths and weaknesses. *J Cogn Neurosci* 2000; 12 Suppl 1:7-29.
127. Mervis CB, Robinson BF, Bertrand J, Morris CA, Klein-Tasman BP, Armstrong SC. The Williams syndrome cognitive profile. *Brain Cogn* 2000; 44(3):604-628.
128. Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999; 8(10):1947-1954.
129. Levitin DJ, Cole K, Chiles M, Lai Z, Lincoln A, Bellugi U. Characterizing the musical phenotype in individuals with Williams Syndrome. *Neuropsychol Dev Cogn C Child Neuropsychol* 2004; 10(4):223-247.
130. Bellugi U, Adolphs R, Cassady C, Chiles M. Towards the neural basis for hypersociability in a genetic syndrome. *Neuroreport* 1999; 10(8):1653-1657.
131. Davies M, Udwin O, Howlin P. Adults with Williams syndrome. Preliminary study of social, emotional and behavioural difficulties. *Br J Psychiatry* 1998; 172:273-276.
132. Bellugi U, Bihle A, Jernigan T, Trauner D, Doherty S. Neuropsychological, neurological, and neuroanatomical profile of Williams syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1990; 6:115-125.
133. Dilts CV, Morris CA, Leonard CO. Hypothesis for development of a behavioral phenotype in Williams syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1990; 6:126-131.
134. Davies M, Howlin P, Udwin O. Independence and adaptive behavior in adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 70(2):188-195.
135. Perez Jurado AL. Williams-Beuren syndrome: a model of recurrent genomic mutation. *Horm Res* 2003; 59 Suppl 1:106-113.
136. Doll A, Grzeschik KH. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 95(1-2):20-27.
137. Fonagy A, Henning D, Jhiang S, Haidar M, Busch RK, Larson R et al. Cloning of the cDNA and sequence of the human proliferating-cell nucleolar protein P120. *Cancer Commun* 1989; 1(4):243-251.
138. Merla G, Ucla C, Guipponi M, Reymond A. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Hum Genet* 2002; 110(5):429-438.
139. Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H et al. Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 2003; 300(5623):1291-1295.
140. Meng X, Lu X, Morris CA, Keating MT. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. *Genomics* 1998; 52(2):130-137.
141. Wang YK, Samos CH, Peoples R, Perez-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(3):465-472.
142. Jones MH, Hamana N, Shimane M. Identification and characterization of BPTF, a novel bromodomain transcription factor. *Genomics* 2000; 63(1):35-39.

143. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D et al. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 2003; 113(7):905-917.
144. Jadayel DM, Osborne LR, Coignet LJ, Zani VJ, Tsui LC, Scherer SW et al. The BCL7 gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrome. *Gene* 1998; 224(1-2):35-44.
145. Natter S, Seiberler S, Hufnagl P, Binder BR, Hirschl AM, Ring J et al. Isolation of cDNA clones coding for IgE autoantigens with serum IgE from atopic dermatitis patients. *FASEB J* 1998; 12(14):1559-1569.
146. Perez Jurado LA, Wang YK, Francke U, Cruces J. TBL2, a novel transducin family member in the WBS deletion: characterization of the complete sequence, genomic structure, transcriptional variants and the mouse ortholog. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 86(3-4):277-284.
147. Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A, Reymond A. WBSR14, 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(6):617-627.
148. Zhang R, Maksymowych AB, Simpson LL. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human syntaxin 1A, a polypeptide essential for exocytosis. *Gene* 1995; 159(2):293-294.
149. Horton N, Quick MW. Syntaxin 1A up-regulates GABA transporter expression by subcellular redistribution. *Mol Membr Biol* 2001; 18(1):39-44.
150. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 1997; 136(6):1239-1247.
151. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(2):511-516.
152. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 1993; 7(13):1208-1218.
153. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998; 393(6682):276-280.
154. Stanyon CA, Bernard O. LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(3-4):389-394.
155. Mizuno K, Okano I, Ohashi K, Nunoue K, Kuma K, Miyata T et al. Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* 1994; 9(6):1605-1612.
156. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999; 285(5429):895-898.
157. Richter NJ, Rogers GW, Jr., Hensold JO, Merrick WC. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* 1999; 274(50):35415-35424.
158. Richter-Cook NJ, Dever TE, Hensold JO, Merrick WC. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* 1998; 273(13):7579-7587.

159. Doyle JL, DeSilva U, Miller W, Green ED. Divergent human and mouse orthologs of a novel gene (WBSR15/Wbscr15) reside within the genomic interval commonly deleted in Williams syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 90(3-4):285-290.
160. Janssen E, Zhu M, Zhang W, Koonpaew S, Zhang W. LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* 2003; 4(2):117-123.
161. Noskov VN, Araki H, Sugino A. The RFC2 gene, encoding the third-largest subunit of the replication factor C complex, is required for an S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4914-4923.
162. Peoples R, Perez-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; 58(6):1370-1373.
163. Hoogenraad CC, Eussen BH, Langeveld A, van Haperen R, Winterberg S, Wouters CH et al. The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. *Genomics* 1998; 53(3):348-358.
164. 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 (Pt 12):2285-2297.
165. Calvo S, Vullhorst D, Venepally P, Cheng J, Karavanova I, Buonanno A. Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 2001; 21(24):8490-8503.
166. Osborne LR, Campbell T, Daradich A, Scherer SW, Tsui LC. Identification of a putative transcription factor gene (WBSR11) that is commonly deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* 1999; 57(2):279-284.
167. O'Mahoney JV, Guven KL, Lin J, Joya JE, Robinson CS, Wade RP et al. Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MustRD1. *Mol Cell Biol* 1998; 18(11):6641-6652.
168. Roy AL. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* 2001; 274(1-2):1-13.
169. Nauseef WM. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(5):373-382.
170. Tipney HJ, Hinsley TA, Brass A, Metcalfe K, Donnai D, Tassabehji M. Isolation and characterisation of GTF2IRD2, a novel fusion gene and member of the TFII-I family of transcription factors, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(7):551-560.
171. Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M et al. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* 1997; 6(7):1029-1036.
172. Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP et al. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest* 1998; 102(10):1783-1787.
173. Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF et al. LIM-kinase1 hemizygosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 1996; 86(1):59-69.

174. Gray V, Karmiloff-Smith A, Funnell E, Tassabehji M. In-depth analysis of spatial cognition in Williams syndrome: A critical assessment of the role of the LIMK1 gene. *Neuropsychologia* 2005.
175. Tassabehji M, Metcalfe K, Karmiloff-Smith A, Carette MJ, Grant J, Dennis N et al. Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999; 64(1):118-125.
176. Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J et al. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *J Med Genet* 1999; 36(6):478-480.
177. del Campo M, Magano LF, Martínez Iglesias J, Pérez Jurado LA. Partial features of Williams-Beuren syndrome in a family with a novel 700 kb 7q11.23 deletion. *Eur J Hum Genet* 2001; 9((suppl)) (Abstract)
178. Pankau R, Siebert R, Kautza M, Schneppenheim R, Gosch A, Wessel A et al. Familial Williams-Beuren syndrome showing varying clinical expression. *Am J Med Genet* 2001; 98(4):324-329.
179. Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J et al. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *J Med Genet* 1999; 36(6):478-480.
180. Gagliardi C, Bonaglia MC, Selicorni A, Borgatti R, Giorda R. Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. *J Med Genet* 2003; 40(7):526-530.
181. Howald C, Merla G, Digilio MC, Amenta S, Lyle R, Deutsch S et al. Two high-throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren Syndrome patients with atypical deletions. *J Med Genet* 2005.
182. 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(3):178-181.
183. Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ et al. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A* 2003; 123(1):45-59.
184. DeBry RW, Seldin MF. Human/mouse homology relationships. *Genomics* 1996; 33(3):337-351.
185. Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE et al. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest* 2003; 112(9):1419-1428.
186. Hoogenraad CC, Koekkoek B, Akhmanova A, Krugers H, Dortland B, Miedema M et al. Targeted mutation of *Cyln2* in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat Genet* 2002; 32(1):116-127.
187. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M et al. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 2002; 35(1):121-133.
188. Durkin ME, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Thorgeirsson SS. Integration of a c-myc transgene results in disruption of the mouse *Gtf2ird1* gene, the homologue of

- the human GTF2IRD1 gene hemizygotously deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* 2001; 73(1):20-27.
189. Tassabehji M, Hammond P, Karmiloff-Smith A, Thompson P, Thorgeirsson SS, Durkin ME et al. GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. *Science* 2005; 310(5751):1184-1187.
 190. Onay T, Young E, Lipina T, Mandel A, Jia Z, Roder J et al. Mice heterozygous for the GTF2I transcription factors exhibit behaviours seen Williams-Beuren syndrome. 54th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics 2004; (Abstract)
 191. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(19):7281-7286.
 192. Ranheim EA, Kwan HC, Reya T, Wang YK, Weissman IL, Francke U. Frizzled 9 knockout mice have abnormal B-cell development. *Blood* 2005; 105(6):2487-2494.
 193. Zhao C, Aviles C, Abel RA, Almli CR, McQuillen P, Pleasure SJ. Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. *Development* 2005; 132(12):2917-2927.
 194. Campuzano V, Lucena J, Carreiro C, Valero MC, Barthelemi I, Pezzi S. Use of murine models as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes of Williams-Beuren syndrome. 37th European Society of Human Genetics 2005; (Abstract)
 195. Valero MC, de Luis O, Cruces J, Perez 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):1-13.
 196. Perez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, 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(4):781-792.
 197. Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D et al. Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics* 1996; 34(1):17-23.
 198. Gorlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED et al. A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1997; 100(8):1907-1918.
 199. Osborne LR, Herbrick JA, Greavette T, Heng HH, Tsui LC, Scherer SW. PMS2-related genes flank the rearrangement breakpoints associated with Williams syndrome and other diseases on human chromosome 7. *Genomics* 1997; 45(2):402-406.
 200. Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Perez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J et al. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* 2000; 14(3):581-592.
 201. Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA. Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res* 2005; 15(9):1179-1188.

202. Cheriya V, Roy AL. Alternatively spliced isoforms of TFII-I. Complex formation, nuclear translocation, and differential gene regulation. *J Biol Chem* 2000; 275(34):26300-26308.
203. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36(1):40-45.
204. Roesler J, Curnutte JT, Rae J, Barrett D, Patino P, Chanock SJ et al. Recombination events between the p47-phox gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Blood* 2000; 95(6):2150-2156.
205. Metcalfe K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M. Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clin Dysmorphol* 2005; 14(2):61-65.
206. Morris CA, Thomas IT, Greenberg F. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 1993; 47(4):478-481.
207. Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 1993; 47(4):468-470.
208. Antonell A, del Campo M, Flores R, Campuzano V, Pérez Jurado LA. Síndrome de Williams: aspectos clínicos y bases moleculares. *Rev Neurol*. 2006;(In Press)
209. Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5(12):1893-1898.
210. Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A et al. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* 1996; 59(4):958-962.
211. Rivera N, Pérez Jurado LA. Sex-preferential hotspots for non-allelic homologous recombination within segmental duplications in Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet*. 2005;(In Press)
212. Scherer SW, Gripp KW, Lucena J, Nicholson L, Bonnefont JP, Perez-Jurado LA et al. Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Hum Genet* 2005; 117(4):383-388.
213. Kriek M, White SJ, Szuhai K, Knijnenburg J, van Ommen GJ, den Dunnen JT et al. Copy number variation in regions flanked (or unflanked) by duplicons among patients with developmental delay and/or congenital malformations; detection of reciprocal and partial Williams-Beuren duplications. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(2):180-189.
214. Chanock SJ, Roesler J, Zhan S, Hopkins P, Lee P, Barrett DT et al. Genomic structure of the human p47-phox (NCF1) gene. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26(1):37-46.
215. Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nuno H, Volpp BD, Pearson DW et al. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med* 1989; 321(10):647-652.
216. Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 2002; 4(11):1023-1024.

217. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 2004; 279(33):34250-34255.
218. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269(40):24519-24522.
219. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(18):7195-7199.
220. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987; 327(6124):717-720.
221. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1729-1737.
222. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 1993; 296 (Pt 3):557-561.
223. Bokoch GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6(2):212-218.
224. Karlsson A, Nixon JB, McPhail LC. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 2000; 67(3):396-404.
225. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401(6748):79-82.
226. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5):494-501.
227. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(10):2175-2183.
228. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91(1-3):21-27.
229. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(9-10):1302-1314.
230. Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 1995; 25(5):1083-1089.
231. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(22):10045-10048.
232. Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 1997; 30(6):1628-1633.

233. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97(8):1916-1923.
234. Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griending KK. Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1231(3):215-219.
235. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 1995; 182(3):751-758.
236. Mitchison NA, Harbord M, Hankin A, Roes J. Conditional haploinsufficiency of NCF1 (encoding p47(phox)), a signaling gene with a heterozygous phenotype potentially subject to natural selection. *Immunol Lett* 2005; 97(1):63-67.
237. Huang CK, Zhan L, Hannigan MO, Ai Y, Leto TL. P47(phox)-deficient NADPH oxidase defect in neutrophils of diabetic mouse strains, C57BL/6J-m db/db and db/+. *J Leukoc Biol* 2000; 67(2):210-215.
238. Hsich E, Segal BH, Pagano PJ, Rey FE, Paigen B, Deleonardis J et al. Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox) : An essential component of NADPH oxidase. *Circulation* 2000; 101(11):1234-1236.
239. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002; 40(4):511-515.
240. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001; 89(5):408-414.
241. Cheriya V, Roy AL. Structure-function analysis of TFII-I. Roles of the N-terminal end, basic region, and I-repeats. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8377-8383.
242. Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* 2002; 22(18):6321-6335.
243. Hinsley TA, Cunliffe P, Tipney HJ, Brass A, Tassabehji M. Comparison of TFII-I gene family members deleted in Williams-Beuren syndrome. *Protein Sci* 2004; 13(10):2588-2599.
244. Roy AL, Du H, Gregor PD, Novina CD, Martinez E, Roeder RG. Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *EMBO J* 1997; 16(23):7091-7104.
245. Cheriya V, Novina CD, Roy AL. TFII-I regulates Vbeta promoter activity through an initiator element. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4444-4454.
246. Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 1993; 363(6424):38-45.
247. Cheriya V, Novina CD, Roy AL. TFII-I regulates Vbeta promoter activity through an initiator element. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4444-4454.
248. Kim DW, Cheriya V, Roy AL, Cochran BH. TFII-I enhances activation of the c-fos promoter through interactions with upstream elements. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3310-3320.

249. Grueneberg DA, Henry RW, Brauer A, Novina CD, Cheriya V, Roy AL et al. A multifunctional DNA-binding protein that promotes the formation of serum response factor/homeodomain complexes: identity to TFII-I. *Genes Dev* 1997; 11(19):2482-2493.
250. Roy AL, Meisterernst M, Pognonec P, Roeder RG. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 1991; 354(6350):245-248.
251. Novina CD, Cheriya V, Roy AL. Regulation of TFII-I activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33443-33448.
252. Kim DW, Cheriya V, Roy AL, Cochran BH. TFII-I enhances activation of the c-fos promoter through interactions with upstream elements. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3310-3320.
253. Yang W, Desiderio S. BAP-135, a target for Bruton's tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(2):604-609.
254. Novina CD, Kumar S, Bajpai U, Cheriya V, Zhang K, Pillai S et al. Regulation of nuclear localization and transcriptional activity of TFII-I by Bruton's tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1999; 19(7):5014-5024.
255. Tussie-Luna MI, Bayarsaihan D, Ruddle FH, Roy AL. Repression of TFII-I-dependent transcription by nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(14):7789-7794.
256. Bayarsaihan D, Ruddle FH. Isolation and characterization of BEN, a member of the TFII-I family of DNA-binding proteins containing distinct helix-loop-helix domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13):7342-7347.
257. O'Mahoney JV, Guven KL, Lin J, Joya JE, Robinson CS, Wade RP et al. Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MusTRD1. *Mol Cell Biol* 1998; 18(11):6641-6652.
258. Makeyev AV, Erdenechimeg L, Mungunsukh O, Roth JJ, Enkhmandakh B, Ruddle FH et al. GTF2IRD2 is located in the Williams-Beuren syndrome critical region 7q11.23 and encodes a protein with two TFII-I-like helix-loop-helix repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(30):11052-11057.
259. Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K et al. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 2005; 437(7055):88-93.
260. Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J et al. Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Mol Phylogenet Evol* 1998; 9(3):585-598.
261. Stankiewicz P, Shaw CJ, Withers M, Inoue K, Lupski JR. Serial segmental duplications during primate evolution result in complex human genome architecture. *Genome Res* 2004; 14(11):2209-2220.
262. Nickoloff JA. Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12):5311-5318.
263. Vedel M, Nicolas A. CYS3, a hotspot of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Effects of heterozygosity and mismatch repair functions on gene conversion and recombination intermediates. *Genetics* 1999; 151(4):1245-1259.

264. Nicolaides NC, Kinzler KW, Vogelstein B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene. *Genomics* 1995; 29(2):329-334.
265. Szamalek JM, Cooper DN, Schempp W, Minich P, Kohn M, Hoegel J et al. Polymorphic micro-inversions contribute to the genomic variability of humans and chimpanzees. *Hum Genet* 2005;1-10.
266. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; 7(2):85-97.
267. Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L et al. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8):849-858.
268. Gebhardt GS, Devriendt K, Thoelen R, Swillen A, Pijkels E, Fryns JP et al. No evidence for a parental inversion polymorphism predisposing to rearrangements at 22q11.2 in the DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(2):109-111.
269. Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K et al. Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 2003; 82(2):238-244.
270. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N et al. Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* 2005; 76(1):52-67.
271. Yang SP, Bidichandani SI, Figuera LE, Juyal RC, Saxon PJ, Baldini A et al. Molecular analysis of deletion (17)(p11.2p11.2) in a family segregating a 17p paracentric inversion: implications for carriers of paracentric inversions. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1184-1193.
272. Hirota H, Matsuoka R, Chen XN, Salandanan LS, Lincoln A, Rose FE et al. Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. *Genet Med* 2003; 5(4):311-321.
273. Sadler LS, Pober BR, Grandinetti A, Scheiber D, Fekete G, Sharma AN et al. Differences by sex in cardiovascular disease in Williams syndrome. *J Pediatr* 2001; 139(6):849-853.
274. Wang YK, Sporle R, Paperna T, Schughart K, Francke U. Characterization and expression pattern of the frizzled gene Fzd9, the mouse homolog of FZD9 which is deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* 1999; 57(2):235-248.
275. Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 2002; 277(12):10121-10128.
276. Ungari S, Katari RS, Alessandri G, Gullino PM. Cooperation between fibronectin and heparin in the mobilization of capillary endothelium. *Invasion Metastasis* 1985; 5(4):193-205.
277. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002; 39(2):269-274.

278. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002; 40(4):511-515.
279. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44(3):248-252.
280. Bird LM, Billman GF, Lacro RV, Spicer RL, Jariwala LK, Hoyme HE et al. Sudden death in Williams syndrome: report of ten cases. *J Pediatr* 1996; 129(6):926-931.
281. Wollack JB, Kaifer M, LaMonte MP, Rothman M. Stroke in Williams syndrome. *Stroke* 1996; 27(1):143-146.
282. Hinsley TA, Cunliffe P, Tipney HJ, Brass A, Tassabehji M. Comparison of TFII-I gene family members deleted in Williams-Beuren syndrome. *Protein Sci* 2004; 13(10):2588-2599.
283. Tantin D, Tussie-Luna MI, Roy AL, Sharp PA. Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J Biol Chem* 2004; 279(7):5460-5469.
284. Del Campo M*, Antonell A*, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M et al. Hemizyosity at the *NCF1* gene in Williams Beuren syndrome patients decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet.* 2005;(In Press)

~ ANNEX ~

REVISIÓ

Síndrome de Williams: aspectos clínicos y bases moleculares

Anna Antonell, Miguel Del Campo, Raquel Flores, Victoria Campuzano, Luis
Alberto Pérez Jurado.

Revista de Neurología 2006; 42 Suppl 1: S69-75.

Antonell A, Del Campo M, Flores R, Campuzano V, Perez-Jurado LA.

[Williams syndrome: its clinical aspects and molecular bases]

[Article in]

Rev Neurol. 2006 Jan 7;42 Suppl 1:S69-75.