



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Εργαστηριακή διερεύνηση παιδιών με σύνδρομο Williams.”

Μαρία Κουτσογιάννη
Α.Μ.: 20190793

ΑΘΗΝΑ
Φεβρουάριος 2022



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Εργαστηριακή διερεύνηση παιδιών με σύνδρομο Williams.”

Μαρία Κουτσογιάννη
Α.Μ.: 20190793

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Τζέτη Μαρία

Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ε.Κ.Π.Α.

Κολιαλέξη Αγγελική (Επιβλέπουσα)

Βιοπαθολόγος, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ε.Κ.Π.Α.

Τσούτσου Ειρήνη

Παιδίατρος, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ
Φεβρουάριος 2022



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian
University of Athens**

— EST. 1837 —

**School of Health Sciences
Department of Medicine**

**MASTER PROGRAM IN
“Medical Genetics: Clinical & Laboratory Direction”**

MASTER THESIS

“Laboratory investigation of children with Williams syndrome.”

**Maria Koutsogianni
Registration Number: 20190793**

Examining Board Members

Tzeti Maria

Professor of Genetics, Medical Genetics Laboratory, University of Athens

Kolialeksi Aggeliki (Supervisor)

Biopathologist, Medical Genetics Laboratory, University of Athens

Tsoutsou Irini

Paediatrician, Medical Genetics Laboratory, University of Athens

**Athens
February, 2022**

© [2022]

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

[Μαρία Κουτσογιάννη, Παιδιάτρος]

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ.

“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ” αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και της φοιτήτριας, ο/η καθένας/μια από τους/τις οποίους/ες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

[Εργαστηριακή διερεύνηση παιδιών με σύνδρομο Williams.]

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του Π.Μ.Σ. **“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρόεπουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής. Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στην **“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: **Μαρία Κουτσογιάννη**
Αριθμός Μητρώου: **20190793**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	(σελ. 6)
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	(σελ. 8)
ABSTRACT.....	(σελ. 9)
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	(σελ. 10)
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	(σελ.11)
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	(σελ.12)
1.1 Γονίδια της χρωμοσωμικής περιοχής 7q11.23 και η λειτουργία τους	(σελ.12)
1.2 Σύνδρομο Williams: φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	(σελ.14)
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	(σελ.17)
1.1 Κρίσιμη περιοχή του συνδρόμου Williams (WBSCR) στο Χρωμόσωμα 7.....	(σελ.17)
1.2 Τα γονίδια στην WBSCR του χρωμοσώματος 7, η έλλειψη των οποίων σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου.....	(σελ.18)
1.3 Γραφική αναπαράσταση των LCRs της περιοχής του ελλείματος	(σελ.20)
1.4 Τα επαναλαμβανόμενα ελλείματα της κρίσιμης περιοχής του συνδρόμου Williams. (WBSCR).....	(σελ.21)
1.5 Κλινικά διαγνωστικά κριτήρια του Συνδρόμου Williams από την Αμερικάνικη Παιδιατρική Ακαδημία (AAP)	(σελ.22)
1.6 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προσώπου ασθενών με σύνδρομο Williams σε διάφορες ηλικίες.....	(σελ.23)
1.7 Ανιχνευτής FISH για το σύνδρομο Williams από την εταιρεία Cytocell aquarius	(σελ.25)
1.8 Απεικόνιση FISH από το μικροσκόπιο	(σελ.26)
1.9 Array- CGH για την ανίχνευση του ελλείματος του συνδρόμου Williams.....	(σελ.27)
1.10 Αίτια παραπομπής ασθενών για εργαστηριακή διερεύνηση ΣW	(σελ.28)
1.11 Κλινικά χαρακτηριστικά των 32 ασθενών που εκτιμήθηκαν για πιθανό σύνδρομο Williams.....	(σελ.28)
1.12 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣW.....	(σελ.29)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	(σελ.30)
1.1 Γενετική του συνδρόμου Williams	(σελ.30)
1.2 Ιστορική αναδρομή του συνδρόμου Williams	(σελ.32)
1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣW που οφείλονται στην έλλειψη των γονιδίων ELN, LMK1, CLIP2	(σελ.33)
1.4 Φαινότυπος- γονότυπος.....	(σελ.34)
1.5 Εργαστηριακή επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης του ΣW με χρήση FISH- Η χρυσή τεχνική	(σελ.36)
2. ΣΚΟΠΟΣ	(σελ.37)
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	(σελ.38)
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	(σελ.40)
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	(σελ.42)
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	(σελ.47)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΤΙΤΛΟΣ

Το σύνδρομο Williams (ΣW) είναι μια πολύ γνωστή νευροαναπτυξιακή διαταραχή που έχει επιπολασμό 1 / 7500-20000 ζωντανών γεννήσεων και προκύπτει κυρίως από ένα *de novo* έλλειμμα στην περιοχή 7q11.23 με μήκος 1,5 -1,8 Mb. Η αναδρομική μελέτη των ανήλικων ασθενών που παραπέμφθηκαν και εκτιμήθηκαν με κλινική εικόνα πιθανού ΣW από τις κλινικές γενετικής του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με έδρα το Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο στο Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία» μεταξύ των ετών 2009-2016 καθώς και η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για το συγκεκριμένο σύνδρομο είναι το θέμα της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός των πιο κοινών φαινοτυπικών γνωρισμάτων του συνδρόμου στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και ο καθορισμός των αποτελεσματικότερων γενετικών εργαστηριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται ευρέως για την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης παιδιών με σύνδρομο Williams.

Έγινε σύγκριση των διαθέσιμων μέχρι σήμερα μοριακών κυτταρογενετικών τεχνικών και της εργαστηριακής ανάλυσης του DNA και συμπερασματικά η χρήση της τεχνικής του φθορίζοντα in-situ υβριδισμού (FISH) είναι, έως σήμερα, ο χρυσός κανόνας για τη διάγνωση του ΣW. Η μοριακή τεχνική MLPA θεωρείται πολύ αξιόπιστη με χαμηλό κόστος και ισάξια αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την ανάλυση χρωμοσωμικών μικροσυστοιχιών (chromosomal microarray analysis- CMA). Νέες μέθοδοι που χρησιμοποιούν μονονουκλεοτιδικές αλλαγές είναι τώρα διαθέσιμες για ευρεία χρήση ως δείκτες μικροδορυφορικών αλληλουχιών και βοηθούν να προσδιοριστεί τόσο το μέγεθος όσο και τη γονική προέλευση του ελλείματος στο ΣW, το οποίο είναι εξίσου σημαντικό για την περαιτέρω ανάπτυξη της ήδη υπάρχουσας γνώσης για αυτό το γενετικά σύνθετο σύνδρομο.

Τα κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών που διαγνώστηκαν με ΣW στο εργαστήριο είναι τρία: το χαρακτηριστικό προσωπείο του συνδρόμου (elfin face), η νοητική καθυστέρηση και η συγγενής καρδιοπάθεια, ευρήματα που συμβαδίζουν με την διεθνή βιβλιογραφία. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει γενετική εξέταση που να προβλέπει τη σοβαρότητα του φαινοτύπου του συνδρόμου Williams σε έναν συγκεκριμένο ασθενή. Περισσότερες μελέτες πρέπει να επικεντρωθούν σε έναν συσχετισμό φαινοτύπου-γονότυπου και να αποκαλύψουν πιθανές υποκείμενες επιγενετικές επιδράσεις που δεν έχουν αποδοθεί προς το παρόν στο μηχανισμό πρόκλησης του συνδρόμου.

Επιστημονική περιοχή εργασίας: Γενετική, σύνδρομο Williams

Λέξεις κλειδιά: σύνδρομο Williams/ Williams-Beuren syndrome, microdeletion syndrome, FISH.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΚΟΠΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ABSTRACT

TITLE

Williams syndrome (WS) is a well-known neurodevelopmental disorder that has a prevalence of 1/7500–20000 live births and results principally from a *de novo* deletion in 7q11.23 with a length of 1.5 -1.8 Mb. The retrospective data collection and analysis of the children that were referred and examined by the clinical geneticists with possible phenotype of WS in the Medical Genetics Laboratory of the University of Athens, based at the Choremio Research Laboratory of Aghia Sophia Children's hospital between 2009-2016 as well as the literature review of WS is my master's thesis project. It aims to determine the most common phenotypic characteristics of the syndrome in the Greek population and define the effectiveness of the existing laboratory investigations used to confirm the clinical diagnosis of children with WS.

Through comparing the available to date molecular cytogenetic techniques and DNA analysis laboratory testing, I would conclude that fluorescence in situ hybridisation (FISH) is the gold standard method used for the WS diagnosis. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is found to be very reliable and cost effective compared to array based comparative genomic hybridization (aCGH). New methods using nucleotide polymorphisms are now available to be used broadly as microsatellite markers and will help us determine both the size and parental origin of the deletion in WS, which is equally important in elaborating further our already existing knowledge of this genetically complex syndrome.

The common characteristics of the patients diagnosed with WS through our laboratory are three: the elfin face, mental retardation and congenital cardiac defects, findings that are in line with the existing literature. Currently, there is no genetic test that predicts the severity of the Williams syndrome phenotype in a given patient. More studies need to be focused towards a phenotype - genotype correlation and reveal possible underlying epigenetic effects that are not currently linked with the syndrome.

BACKGROUND

AIM

METHODOLOGY

RESULTS

CONCLUSIONS

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ελληνικός Όρος

ζεύγη μεγαβάσεων

επαναλήψεις αλληλουχιών χαμηλού
αριθμού αντιγράφων

διπλότυπα

μηχανισμός ομόλογου ανασυνδυασμού μη
αλληλόμορφων αλληλουχιών

σύνδρομα ελλειμμάτων «γειτονικών
συμβάντων»

τεχνική του φθορίζοντα in-situ υβριδισμού
ανάλυση χρωμοσωμικών μικροσυστοιχιών
μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού
υβριδισμού

πολυμορφικοί δείκτες μικροδορυφόρων

ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση

πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

παράλογος ποσοτικός προσδιορισμός
αλληλουχίας

υψηλής ανάλυσης πολυμορφισμός ενός
νουκλεοτιδίου

πολυμορφισμός με επανάληψη
δινουκλεοτιδίων

παραλλαγή αριθμού αντιγράφων

μεταβλητός αριθμός διαδοχικών
επαναλήψεων

εμβρυϊκός βόειος ορός

Ξενόγλωσσος όρος

mega base pairs

low copy repeats blocks

duplicons

nonallelic homologous recombination

contiguous gene deletion syndromes

fluorescence in-situ hybridization

chromosomal microarray analysis

array based comparative genomic
hybridization

polymorphic microsatellite markers

quantitative real-time polymerase chain
reaction

paralogous sequence quantification

high-resolution single nucleotide
polymorphism

dinucleotide repeat polymorphism

copy number variants

variable number of tandem repeats

fetal bovine serum

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ελληνικές συντομογραφίες:

ΔΑΦ: διαταραχή αυτιστικού φάσματος

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

ΠΠΣ: περιφερική πνευμονική στένωση

ΣW: Σύνδρομο Williams

ΥΣΑ: υπερβαλβιδική στένωση αορτής

ΨΚΚ: ψυχοκινητική καθυστέρηση

Ξενόγλωσσες συντομογραφίες:

AAP: American Academy of Paediatrics

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

ADHD: Attention deficit hyperactivity disorder

CGH: Comparative Genomic Hybridization

CMA: Chromosomal Microarray Analysis

CNS: Central Nervous System

CNV: Copy Number Variant

CYLN2: Cytoplasmic linker 2

DNA: Deoxyribonucleic acid

DNRP: Dinucleotide Repeat Polymorphism

ELN: Elastin

FISH: Fluorescence in Situ Hybridisation

FKBP6: FK506 binding protein 6

FZD9: Frizzled Class Receptor 9

LCR: Low Copy Repeat

LIMK1: LIM kinase 1 gene

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

NAHR: Nonallelic Homologous Recombination

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMM: polymorphic microsatellite markers

PPS: Peripheral Pulmonary Stenosis

PSQ: Paralogous Sequence Quantification

QPCR: Quantitative Real time Polymerase Chain Reaction

RFC2: Replication Factor C Subunit 2

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

STX1A: Syntaxin 1A

SVAS: Supravalvular Aortic Stenosis

TBL2: Transducin beta-like protein 2

VNTR: Variable number of tandem repeats

WBS/ WS: Williams Beuren Syndrome/ Williams syndrome

WES: whole exome sequencing

WSCR/ WBSCR: Williams syndrome critical region

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Γονίδια της χρωμοσωμικής περιοχής 7q11.23 και η λειτουργία τους.

Γονίδιο	Λειτουργία	Κλινικές συνέπειες του ελλείματος
<i>ELN</i>	Ανάπτυξη των αγγείων, δομική πρωτεΐνη, συστατικό των ινών ελαστικής, ρόλος στην αρτηριακή μορφογένεση.	Συγγενής καρδιοπάθεια.
<i>STX1A</i>	Ρύθμιση της λειτουργίας διαύλων Fe ⁺⁺ , ρόλος κλειδί στην ενδοκυτταρική μεταφορά και απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.	Μαθησιακά προβλήματα και προβλήματα συμπεριφοράς, μειωμένη ανοχή στην γλυκόζη.
<i>LIMK1</i>	Ανάπτυξη εγκεφάλου, επανοργάνωση της κυτταροσκελετικής ακτίνης για την κατευθυντική κίνηση των νευρώνων.	Μαθησιακά προβλήματα και προβλήματα συμπεριφοράς, μειωμένες οπτικο-χωρικές ικανότητες.
<i>CLIP2 (CYLN2)</i>	Διατήρηση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας των νευρικών κυττάρων του ΚΝΣ.	Προβλήματα συμπεριφοράς, Μειωμένες οπτικο-χωρικές και κινητικές ικανότητες.
<i>FZD9</i>	Πιθανή συσχέτιση με την πολικότητα και ανάπτυξη ιστών.	Οστεοπενία.
<i>BAZ1B</i>	Πιθανή εμπλοκή στην εξαρτώμενη από χρωματίνη ρύθμιση μεταγραφής και στην έκφραση των ενζύμων σύνθεσης και καταβολισμού της βιταμίνης D.	Υπεργλυκαιμία, ενδοκαρδιακές δυσπλασίες, βρεφική υπερασβεστιαμία.
<i>NCF1</i>	Συστατικό του συστήματος NADPH-οξειδάσης φαγοκυττάρων και σημαντική συμμετοχή στην ανοσία.	Μειωμένος κίνδυνος υπέρτασης.
<i>GTF2I, GTF2IRD1</i>	Πολυλειτουργικός συντελεστής μεταγραφής ως μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας GTF2I με ενεργοποιητικό ρόλο.	Κraniοπροσωπικές, συμπεριφορικές και οδοντικές ανωμαλίες, καθυστέρηση ανάπτυξης, μειωμένες οπτικές αντιδράσεις.
<i>RFC2</i>	Συμμετέχει στην επιμήκυνση των DNA αλυσίδων που αποτελούν το «καλούπι» για τη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας.	Άγνωστη.
<i>LAT2</i>	Διαμεμβρανικός προσαρμοστής των μαστοκυττάρων.	Άγνωστη.
<i>EIF4H</i>	Συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης.	Άγνωστη.

<i>CLDN3</i> και <i>CLDN4</i>	Σχηματισμός και λειτουργία των κυτταρικών συνδέσμων “tight junctions” και ρύθμιση της διαπερατότητας του παρακυτταρικού μονοπατιού (παρακυτταρική διάχυση).	Απώλεια κυτταρικής πολικότητας, καρκινογένεση.
<i>ABHD11</i>	Παραγωγή άλφα/βήτα υδρολάσης (a-b hydrolase domain)	Άγνωστη.
<i>FKBP6</i>	Ομόλογος ανασυνδυασμός χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση και την σπερματογένεση.	Άγνωστη.
<i>BCL7B</i>	Έκφραση κατά την εμβρυική ανάπτυξη.	Άγνωστη.
<i>DNAJC30</i>	Γονίδιο χωρίς ιντρόνια που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ (HSP40= heat shock proteins) ως απάντηση σε στρεσογόνες καταστάσεις.	Άγνωστη.
<i>MLXIPL</i>	Κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα bHLHZip (basic-helix-loop-helix leucine zipper) που συμμετέχει στην γονιδιακή μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή. Πιθανή εμπλοκή στην διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων.	Άγνωστη.
<i>VPS37D</i>	Συστατικό του πρωτεϊνικού συμπλέγματος ESCRT-I (endosomal sorting complex required for transport), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του MVB (multivesicular body= πολύ-κυστιδιακό σώμα) και την καταστροφή των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.	Νευροεκφυλιστικά νοσήματα (πχ. η κληρονομική σπαστική παραπληγία).
<i>BUD23</i> ή <i>WBSCR22</i>	Συμμετοχή στη μεθυλίωση του DNA. Εκφράζεται σε όλους του ιστούς, αλλά κυρίως στους όρχεις.	Άγνωστη.
<i>TBL2</i>	Εκφράζεται καθολικά αλλά κυρίως στους όρχεις, σκελετικό μυ, καρδιά και σε κάποιους ενδοκρινικούς ιστούς. Η ακριβής λειτουργία του δεν είναι γνωστή; μπορεί να παίζει ρόλο στην κυτταροσκελετική οργάνωση και σε οδούς ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Υπάρχουν αναφορές ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμπεριφέρονται σαν ογκοκατασταλτικά γονίδια.	Άγνωστη.
<i>TRIM50</i>	Κωδικοποιεί μια λιγάση της ουβικουϊτίνης (E3-ubiquitin-ligase). Σχετίζεται με τον σχηματισμό αλυσίδων ουβικουϊτίνης και με τη μεταφορά και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα κατά τη διαδικασία της πρωτεόλυσης.	Άγνωστη.

[Tassabehji M 2003 Hum Mol Genet 12:R229–R237](#)

Πίνακας 1.2. Σύνδρομο Williams: φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Σύστημα	Σημεία/Συμπτώματα
Ωτο-ρινο-λαρυγγολογικό	Επαναλαμβανόμενα επεισόδια μέσης ωτίτιδας Υπερακουσία. Υπεραισθησία στον θόρυβο που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα ζωής. Ήπια - έως - μέτρια υψηλών τόνων νευροαισθητήρια απώλεια ακοής σε εφήβους.
Καρδιαγγειακό	Αγγειακή στένωση (π.χ. ΥΣΑ, ΠΠΣ), υπέρταση, περιστασιακά προσβολή νεφρικών αγγείων, ανωμαλία βαλβίδων, ενδοκαρδιακή βλάβη (π.χ. VSD), πολύ σπάνια εγκεφαλικό επεισόδιο, ξαφνικός θάνατος: πολύ σπάνιος. Παράγοντες κινδύνου είναι η χρήση αναισθησίας, δικουιλιακή υπερτροφία, απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας.
Ανάπτυξη-γνώση-νόηση	Γενικευμένη νοητική υστέρηση (μέσος όρος IQ: περίπου 55) μερικοί ασθενείς έχουν IQ εντός του φυσιολογικού εύρους. Χαρακτηριστικό μοτίβο γνωστικών δυνατοτήτων και αδυναμιών (γνωστό ως γνωστικό προφίλ του συνδρόμου Williams - Beuren).
Δόντια- αεραγωγός	Μικρά ή ασυνήθιστα διαμορφωμένα νεογιλά δόντια, υποδοντία. Απόφραξη, πιθανός δύσκολος αεραγωγός,.
Ενδοκρινολογικό	Πρώιμη έναρξη της εφηβείας περίπου 2 χρόνια νωρίτερα, δυσανεξία στη γλυκόζη ή σακχαρώδης διαβήτης. Οστεοπενία ή οστεοπόρωση, υποθυρεοειδισμός (υποκλινικός) μπορεί να σχετίζεται με ήπια υποπλασία του θυρεοειδούς αδένου, υπερασβεστιαμία που δεν περιορίζεται στην παιδική ηλικία.

Σύστημα

Σημεία/Συμπτώματα

Γαστρεντερικό – βάρος

Κολικός, δυσκολία στη διατροφή, δυσανεξία στα τρόφιμα βάση υφών, μη φυσιολογική αύξηση βάρους, δυσκοιλιότητα, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, κοιλιακός πόνος ασαφούς αιτίας, εκκολπωματική νόσος, ορθική πρόπτωση, κοιλιοκάκη.

Ουρογεννητικό

Καθυστερημένη εκπαίδευση τουαλέτας, αυξημένη συχνότητα ούρησης, επείγουσα ούρηση, ενούρηση, δομικές νεφρικές ανωμαλίες, εκτροπή της ουροδόχου κύστης, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, νεφρασβέστωση.

Διάφορα

Κοντό ανάστημα (κοινό χαρακτηριστικό αλλά όχι υποχρεωτικό), δυσλειτουργία ύπνου, σύνδρομο ανήσυχων ποδιών.

Μυοσκελετικό

Χαλάρωση και συσπάσεις αρθρώσεων, επιδείνωση συσπάσεων κάτω άκρων καθώς αυξάνεται η ηλικία, λόρδωση, σκολίωση.

Νευρολογικό

Υποτονία, υπεραντανακλαστικότητα: πιο διαδεδομένη στους εφήβους και τους ενήλικες από ό,τι σε νεότερους ασθενείς, ειδικά στα κάτω άκρα, παρεγκεφαλιδικά ευρήματα, κακή ισορροπία και συντονισμός, παραμόρφωση Chiari τύπου I.

Οφθαλμολογικό

Στραβισμός, τροποποιημένη οπτική οξύτητα, μειωμένη στερεοψία, στένωση του δακρυϊκού πόρου.

Σύστημα

Σημεία/Συμπτώματα

Προσωπικότητα- συμπεριφορά-
συναισθηματική ευεξία

Εντυπωσιακά φιλική προσωπικότητα, που μπορεί να προσδώσει ευπάθεια σε ακατάλληλες συνθήκες, παρορμητικότητα και διαταραχή προσοχής με υπερδραστηριότητα (Attention deficit hyperactivity disorder- ADHD). Δια βίου ADHD, μείωση της υπερκινητικότητας μετά την παιδική ηλικία, άγχος και φοβίες, ιδεοψυχαναγκαστικά χαρακτηριστικά, δυσθυμία.

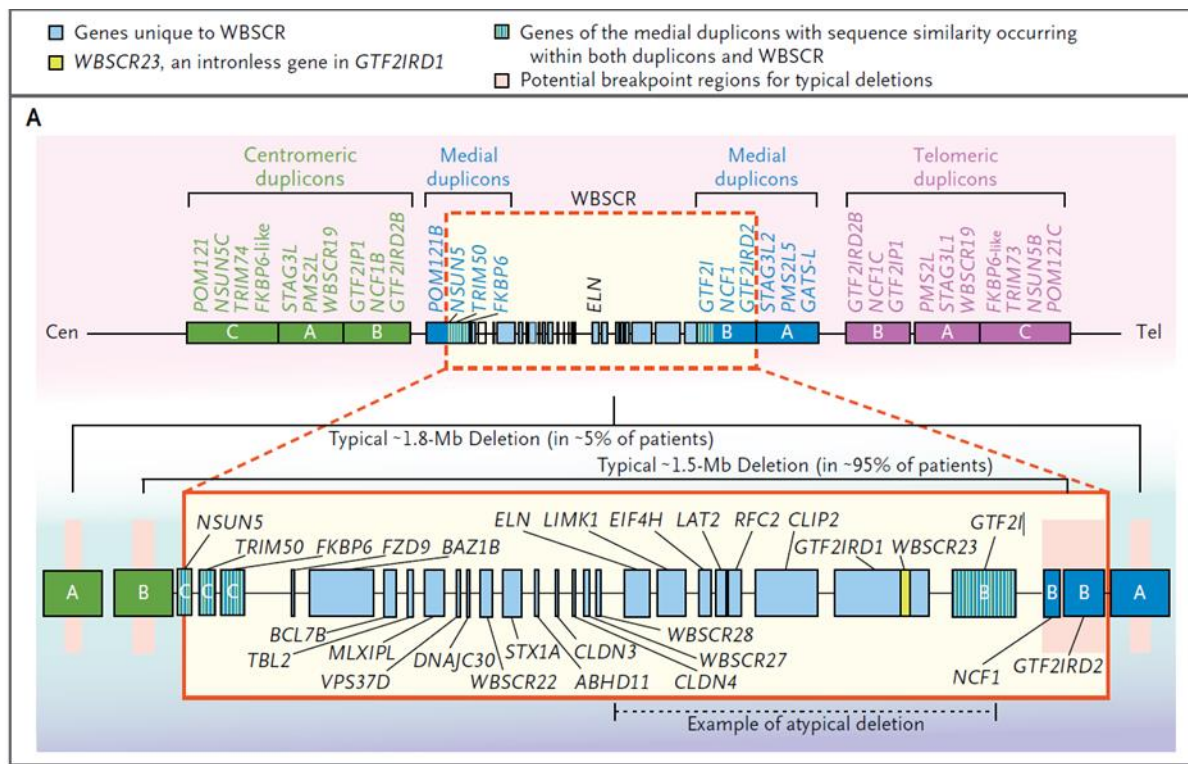
Δέρμα

Μαλακό δέρμα με ήπια πρόωρη γήρανση, πρόωρο γκριζάρισμα των μαλλιών, βουβωνοκήλη (και άλλες κήλες).

[Pober BR Williams-Beuren syndrome. N Engl J Med. 2010;362\(3\):239-52.](#)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Κρίσιμη περιοχή συνδρόμου Williams (WBSCR) στο χρωμόσωμα 7.



[Poer BR Williams-Beuren syndrome. N Engl J Med. 2010;362\(3\):239-52.](#)

Σχηματική απεικόνιση των τυπικών περιοχών του ελλείματος (1.8 Mbp που συναντάται στο 5% των ασθενών και 1.5 Mbp στο 95% των ασθενών) που περιλαμβάνουν την κρίσιμη περιοχή του συνδρόμου Williams (WBSCR) στο χρωμόσωμα 7 καθώς και παραδείγματος ενός άτυπου ελλείματος του ΣW, με τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε αυτά (γαλάζιο χρώμα). Απεικονίζονται τα κεντρομερικά (πράσινο χρώμα), μέσα (μπλε χρώμα) και τελομερικά διπλότυπα (μωβ χρώμα) οργανωμένα σε ομάδες με τα γράμματα A,B,C (duplicons in blocks A, B and C) μεταξύ των περιοχών με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες χαμηλού αριθμού αντιγράφων, που τα περιβάλλουν και στα οποία οφείλεται η λανθασμένη σύζευξη θραυσμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης και οδηγεί στη δημιουργία του ελλείματος.

Εικόνα 1.2 Τα γονίδια στη WBSCR περιοχή του χρωμοσώματος 7, η έλλειψη των οποίων σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου.

Position Chr. 7 in Kb,	LCR block	Genes	Strand	Type	Ampl. qPCR	STS marker
5'						
71.936		<i>TYW1B</i>	-	unknown	71.642	
71.938		<i>SBDSP</i>	+	non-coding		D7S2749
71.977		<i>WBSCR19</i>	-	non-coding		
71.988		<i>POM121</i>	+	coding	72.004	D7S789
72.063	C cen	<i>NSUN5C</i>	-	coding?		
72.078		<i>TRIM74</i>	-	coding		D7S1778
72.078		<i>FKBP6-like</i>	+	non-coding		
72.114		<i>STAG3L3</i>	-	non-coding	72.099	D7S489C
72.115	A cen	<i>PMS2L</i>	+	non-coding		
72.138		<i>WBSCR19</i>	-	non-coding		
72.146		<i>PMS2L</i>	+	non-coding		
72.164		<i>WBSCR19</i>	-	non-coding		
72.207	B cen	<i>GTF2IP</i>	+	non-coding		
72.273		<i>NCF1B</i>	+	non-coding		
72.324		<i>GTF2IRD2P</i>	-	non-coding		
72.347		<i>POM121B</i>	+	non-coding		
72.361	C mid	<i>NSUN5</i>	-	coding		
72.380		<i>TRIM50</i>	-	coding	72.366	D7S1778
72.380		<i>FKBP6</i>	+	coding		
72.486		<i>FZD9</i>	+			D7S489B
72.575		<i>BAZ1B</i>	-		72.496	D7S2024
72.610		<i>BCL7B</i>	-			
72.631		<i>TBL2</i>	-			
72.677		<i>MLXIPL</i>	-			D7S1624
72.720		<i>VPS37D</i>	+			
72.736		<i>DNAJC30</i>	-			
72.736		<i>WBSCR22</i>	+			
72.772		<i>STX1A</i>	-			
72.791		<i>ABHD11</i>	-			
72.823		<i>CLDN3</i>	-	coding	72.874	
72.883		<i>CLDN4</i>	+			
72.795		<i>WBSCR27</i>	-			D7S613
72.913		<i>WBSCR28</i>	+			
73.080		<i>ELN</i>	+		73.091	
73.136		<i>LIMK1</i>	+			
73.227		<i>EIF4H</i>	+			D7S613
73.262		<i>LAT2</i>	+			D7S489
73.307		<i>RFC2</i>	-		73.307	
73.342		<i>CLIP2</i>	+			
73.506		<i>GTF2IRD1</i>	+			D7S2472
73.585		<i>WBSCR23</i>	+	unknown		
73.710	B mid	<i>GTF2I</i>	+	coding	73.774	D7S1870
73.826		<i>NCF1</i>	+	coding		
73.906		<i>GTF2IRD2</i>	-	coding	73.928	
73.945	A mid	<i>STAG3L2</i>	-	non-coding		D7S489A
73.945		<i>PMS2L5</i>	+	non-coding		
73.976		<i>GATS-L</i>	+	non-coding		
74.128		<i>WBSCR16</i>	-	coding	74.119	
74.146		<i>GTF2IRD2B</i>	+	coding		
74.226	B tel	<i>NCF1C</i>	-	non-coding		
74.291		<i>GTF2IP1</i>	-	non-coding		
74.333		<i>WBSCR19</i>	+	non-coding		
74.353		<i>PMS2L</i>	-	non-coding		
74.604		<i>RCC1L</i>	+	non-coding		
74.706		<i>GATS-L</i>	-	non-coding		
74.749		<i>WBSCR19</i>	+	non-coding		
74.783		<i>WBSCR19</i>	-	non-coding		
74.795		<i>PMS2L</i>	-	non-coding		
74.805		<i>WBSCR19</i>	+	non-coding		
74.823		<i>PMS2L</i>	-	non-coding		
74.826		<i>STAG3L1</i>	+	non-coding		D7S489C
74.863		<i>FKBP6-like</i>	-	non-coding		
74.863	C tel	<i>TRIM73</i>	+	coding		D7S1778
74.877		<i>NSUN5B</i>	+	coding?		
74.953		<i>POM121C</i>	-	coding		D7S789
74.962		<i>WBSCR19</i>	+	non-coding		
74.995		<i>PMS2L3</i>	-	non-coding		
75.206		<i>HIP</i>	-	coding		

Common deletion size of 1.5 Mb with variable breakpoints within the LCR block B

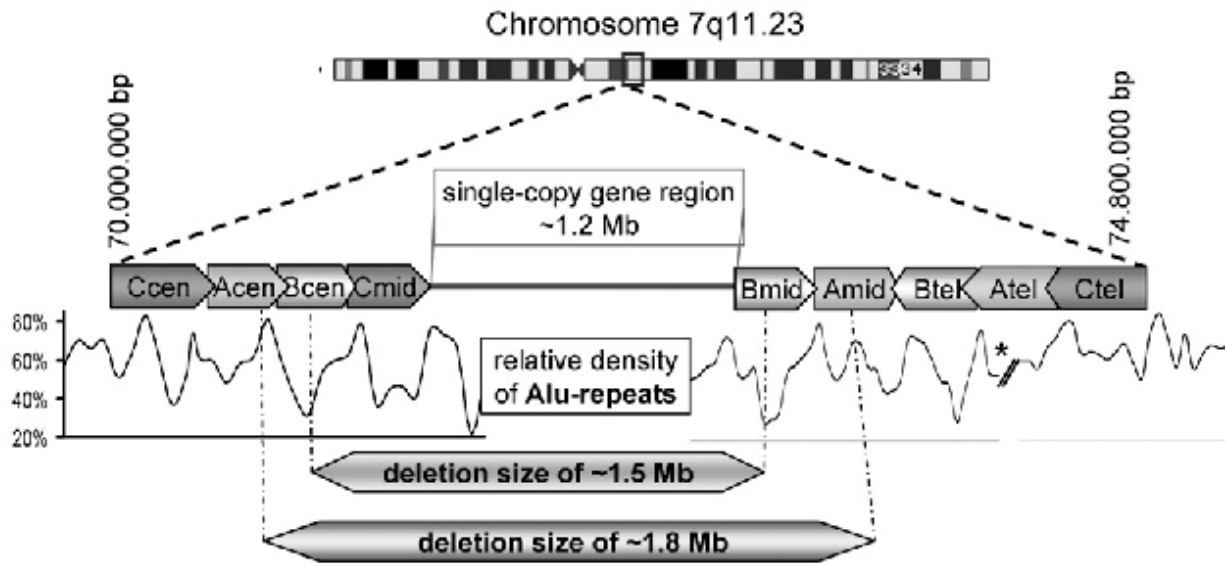
Deletion size of 1.8 Mb with variable breakpoints within the LCR block A (~ 5% of WBS patients)

[Schubert, C. \(2009\). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. Cell Mole Life Sci, 66, 1178–1197.](#)

Ανωτέρω απεικονίζονται οι χρωμοσωμικές θέσεις (position chr.7 in Kb), τα μπλοκ των LCR (A,B,C), τα ονόματα των γονιδίων, ο τύπος των γονιδίων (unknown=άγνωστο, non coding=μη κωδικοποιόν, coding=κωδικοποιόν) και οι πολυμορφικοί δείκτες (STS marker). Στη δεξιά στήλη απεικονίζονται σε γκρι χρώμα οι διαφορετικές θέσεις των qPCR-amplicons (Ampl.qPCR) που χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο των ασθενών με την κλινική υποψία του ΣΩ, όπως και επιλεγμένοι γνωστοί πολυμορφικοί δείκτες μέσα στην κρίσιμη περιοχή. Στα κάθετα βέλη απεικονίζονται: το συχνότερο μέγεθος ελλείμματος των ~ 1.5 Mb (τα σημεία θραύσης μέσα στα μπλοκ B LCR) και το πιο σπάνιο μέγεθος ελλείμματος των ~ 1.8 Mb (ο ανασυνδυασμός μέσα στα κεντρομερικά και μεσαία μπλοκ A LCR). Αυτοί οι ανασυνδυασμοί NAHR επηρεάζουν 26 κωδικοποιητικά γονίδια, τα οποία κατά κανόνα διαγράφονται. Επιπρόσθετα σε αυτά τα 26 γονίδια, τα NCF1 και GTF2IRD2 μπορεί μεταβλητώς να διαγράφονται ανάλογα με τον NAHR γενετικό τόπο εντός των μπλοκ A ή B.

Σημείωση: υπάρχει κενό μεγέθους ~ 250 Kb (chr. 7: 74,350-74,600 Kb), χωρίς πληροφορίες για τη γονιδιωματική οργάνωση αυτής της περιοχής.

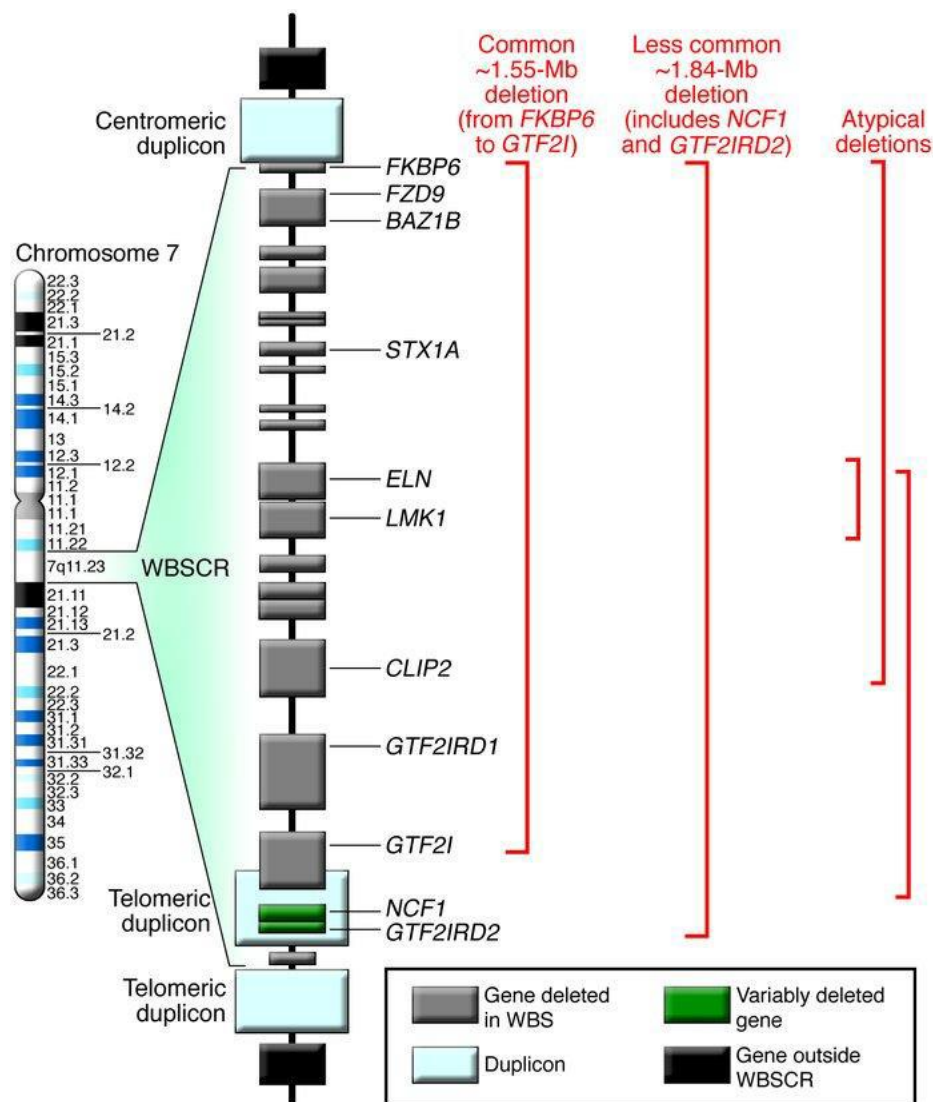
Εικόνα 1.3 Γραφική αναπαράσταση των LCRs της περιοχής του ελλείματος.



[*Schubert, C. \(2009\). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. Cell Mole Life Sci, 66, 1178–1197.*](#)

Στην εικόνα φαίνεται η γραφική αναπαράσταση του ελλείματος της WBSCR περιοχής στο χρωμόσωμα 7q11.23, η θέση και ο προσανατολισμός των μπλοκ (A,B,C) των LCRs, η πυκνότητα (επί τις %) των επαναλήψεων Alu, καθώς και οι θέσεις των συχνότερων ελλειμμάτων μεγέθους ~1,5 Mb και ~1,8Mb με σημεία θραύσης μέσα στο κεντρομερικό και μεσαίο αντίγραφο του LCR μπλοκ B και μέσα στο κεντρομερικό και μεσαίο αντίγραφο του LCR μπλοκ A, αντίστοιχα.

Εικόνα 1.4 Τα επαναλαμβανόμενα ελλείμματα της κρίσιμης περιοχής του συνδρόμου Williams-Beuren (WBSCR).



[Pober BR, Mark Johnson, Zsolt Urban. \(2008\) Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. J Clin Invest; 118\(5\).](#)

Στην εικόνα απεικονίζεται σχηματικά αναπαράσταση τυπικών και άτυπων ελλειμάτων του ΣΩ που περιλαμβάνουν μέρος ή ολόκληρη την κρίσιμη περιοχή του ΣΩ (WBSCR). Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που διαγράφονται, με γαλάζιο τα μπλοκ επαναλήψεων μικρού αριθμού αντιγράφων (LCRs) ή duplicons τα οποία προδιαθέτουν σε NAHR, με πράσινο τα γονίδια (NCF1, GTF2IRD2) που δεν διαγράφονται σε όλα τα ελλείματα και με μαύρο τα γονίδια έξω από την WBSCR περιοχή. Σε ποσοστό 90% των ασθενών το έλλειμα έχει μέγεθος ~1,55 Mbp και επεκτείνεται από το FKBP6 έως το GTF2I γονίδιο. Τα λιγότερα συχνά (≈ 5%) ελλείματα μεγέθους ~1,84 Mbp περιέχουν τα NCF1 και GTF2IRD2 γονίδια. Τα άτυπα ελλείματα είναι συνήθως μικρότερου μεγέθους και σπάνια.

Εικόνα 1.5 Κλινικά διαγνωστικά κριτήρια του Συνδρόμου Williams από την Αμερικάνικη Παιδιατρική Ακαδημία (AAP).

		Scored Points*
Growth (Past or Present Evidence of) <i>If 3 of 5 items are checked, score 1 point</i>		_____
<input type="checkbox"/> Post-term birth > 41 wk gestation	<input type="checkbox"/> Prolonged colic > 4 m irritability	
<input type="checkbox"/> Failure to thrive/height and weight < 5th percentile	<input type="checkbox"/> Chronic constipation	
<input type="checkbox"/> Vomiting or gastroesophageal reflux		
Behavior and Development <i>If 3 of 6 items are checked, score 1 point</i>		_____
<input type="checkbox"/> Overly friendly personality	<input type="checkbox"/> Visuospatial problems	
<input type="checkbox"/> Hypersensitivity to sound	<input type="checkbox"/> Delayed speech acquisition, followed by excessive talking	
<input type="checkbox"/> Anxiety		
<input type="checkbox"/> Developmental delay or mental retardation		
Facial Features <i>If 8 of 17 items are checked, score 3 points</i>		_____
<input type="checkbox"/> Bitemporal narrowing	<input type="checkbox"/> Broad brow	
<input type="checkbox"/> Epicanthal folds or flat nasal bridge	<input type="checkbox"/> Periorbital fullness	
<input type="checkbox"/> Strabismus (present or past)	<input type="checkbox"/> Stellate lacy iris pattern	
<input type="checkbox"/> Short nose or anteversion of nares	<input type="checkbox"/> Bulbous or full nasal tip	
<input type="checkbox"/> Full cheeks	<input type="checkbox"/> Malar hypoplasia (flat cheek bones)	
<input type="checkbox"/> Long philtrum	<input type="checkbox"/> Full prominent lips	
<input type="checkbox"/> Small, widely spaced teeth	<input type="checkbox"/> Malocclusion	
<input type="checkbox"/> Wide mouth	<input type="checkbox"/> Small jaw	
<input type="checkbox"/> Prominent ear lobes		
Cardiovascular Problems (by Echocardiography) (a) <i>If 1 of 2 items are checked, score 5 points</i>		_____
<input type="checkbox"/> SVAS [†]	<input type="checkbox"/> Peripheral pulmonary artery stenosis	
Cardiovascular Problems (b) <i>If 1 of 3 items are checked, score 1 point</i>		_____
<input type="checkbox"/> Other congenital heart disease	<input type="checkbox"/> Hypertension	
<input type="checkbox"/> Cardiac murmur		
Connective Tissue Abnormality <i>If 2 of 6 items are checked, score 2 points</i>		_____
<input type="checkbox"/> Hoarse voice	<input type="checkbox"/> Long neck or sloped shoulders	
<input type="checkbox"/> Inguinal hernia	<input type="checkbox"/> Joint limitation or laxity	
<input type="checkbox"/> Bowel or bladder diverticula	<input type="checkbox"/> Rectal prolapse	
Calcium Studies <i>If 1 of 2 items are checked, score 2 points</i>		_____
<input type="checkbox"/> Hypercalcemia	<input type="checkbox"/> Hypercalciuria	
Total Points:		=====

* If the score is < 3, a diagnosis of Williams syndrome is unlikely. If the score is ≥ 3, FISH studies should be considered. (Mean score for Williams syndrome was 9 [standard deviation = 2.86]. The scoring system is based on a study of 107 persons with Williams syndrome [confirmed by FISH] evaluated by Colleen A. Morris, MD; Frank Greenberg, MD; Paige Kaplan, MD; Martin Levinson, MD; and Barbara Pober, MD; with data analysis by Carolyn B. Mervis, PhD and Byron F. Robinson, MA; presented at the 1994 Williams Syndrome Association Convention; July 31, 1994; San Diego, CA.)

[†] If supravalvar aortic stenosis (SVAS) is present, referral to a geneticist and FISH studies are recommended.

Στους υποψήφιους ασθενείς εξετάζονται έξι συστήματα/συμπτώματα/εργαστηριακά ευρήματα με βαθμολογία, η οποία προστίθεται συνολικά και υποδεικνύει την κλινική πιθανότητα ύπαρξης ή όχι του συνδρόμου. Βαθμολογία ≥3, αποτελεί ένδειξη εργαστηριακής διερεύνησης με μοριακές τεχνικές, για επιβεβαίωση του συνδρόμου Williams.

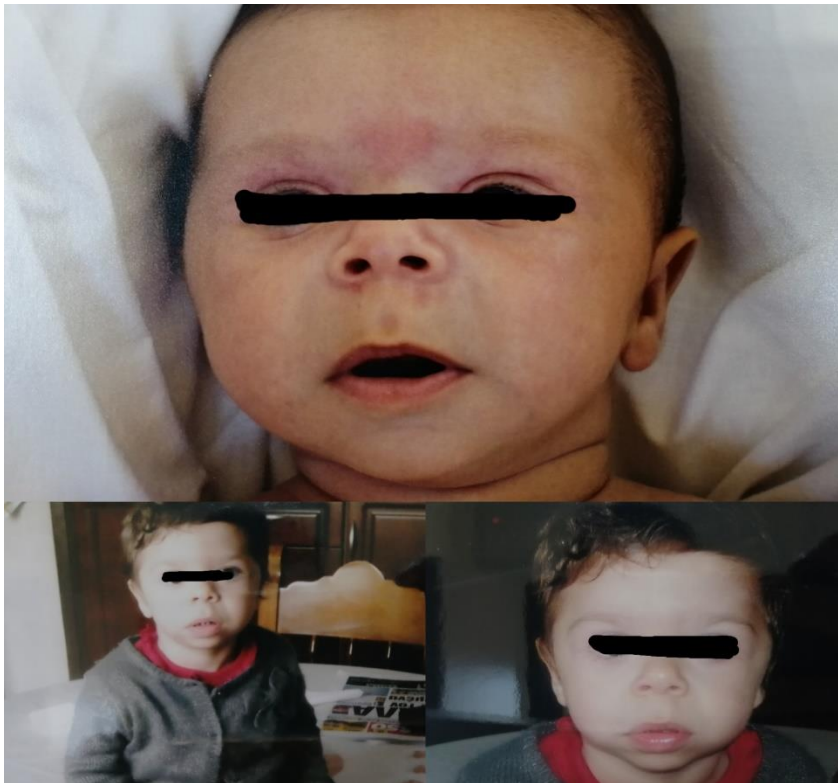
Εικόνα 1.6 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προσώπου ασθενών με σύνδρομο Williams σε διάφορες ηλικίες.

A)



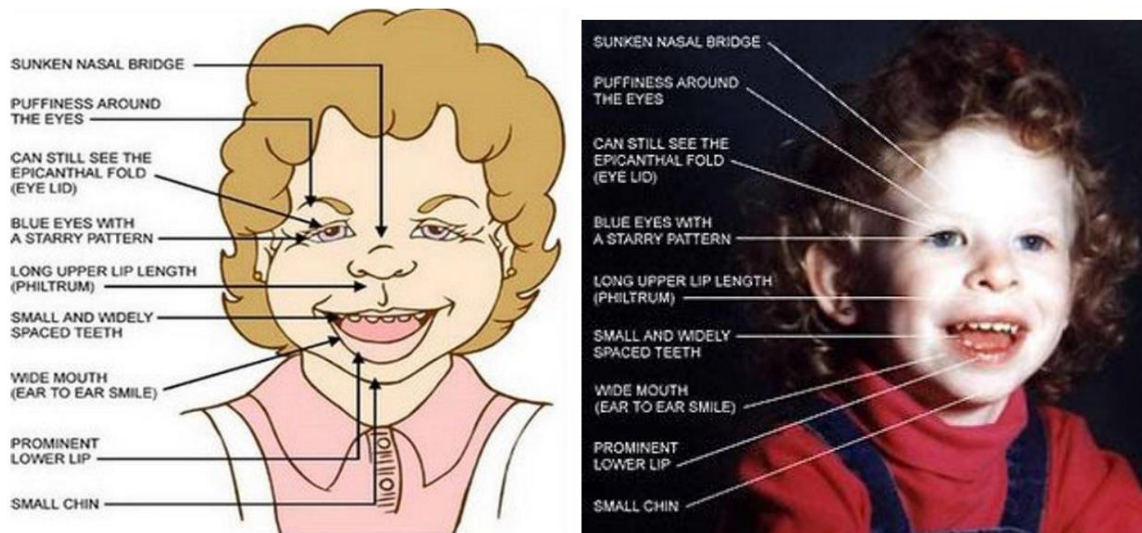
Pober BR Williams-Beuren syndrome. N Engl J Med. 2010;362(3):239-52.

B)



Φωτογραφίες που προέρχονται από το αρχείο του εργαστηρίου Ιατρικής γενετικής του ΕΚΠΑ και απεικονίζουν ασθενή στην ηλικία των 6 και 18 μηνών με σύνδρομο Williams.

Γ)



Colleen A Morris. Introduction: Williams Syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genetics. 2010, May 15; 154C(2): 203-208.

Δ)



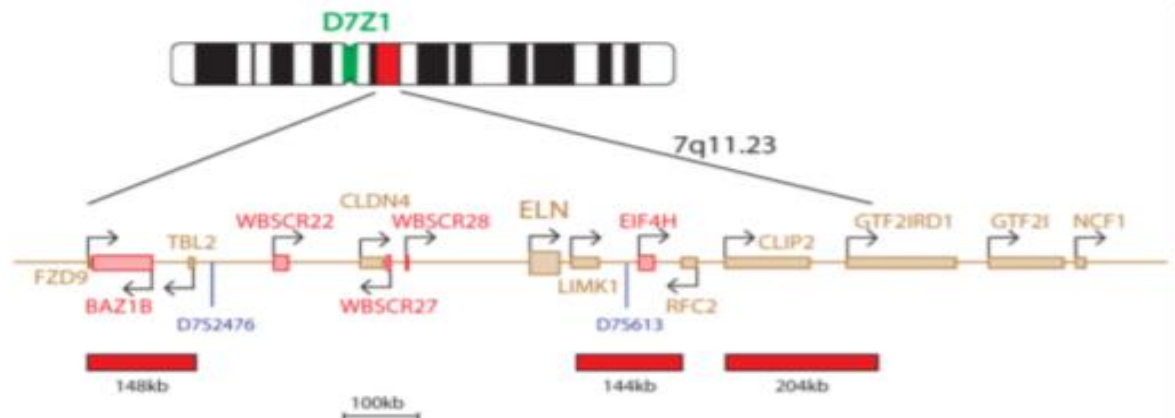
Αστεροειδής ίριδα (αριστερά) και χαρακτηριστικά δόντια ασθενούς με ΣW (δεξιά).

Παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του προσώπου που διαμορφώνουν το δυσμορφικό πρόσωπο του συνδρόμου (Α, Γ, Δ) όπως: καθίζηση ρίζας ρινός, ήπιο περικογχικό οίδημα/περιοφθαλμική διόγκωση των μαλακών μορίων, μπλε χρώμα ματιών με αστεροειδή ίριδα, μεγάλο μέτωπο, μακρύ φίλτρο, τριγωνικό πιγούνι, χαμηλή πρόσφυση ώτων, λεπτό άνω χείλος, προέχον κάτω χείλος και αυξημένο μεσοδόντιο διάστημα με μικρά και αραιά δόντια, πλατύ χαμόγελο (από αυτί σε αυτί).

Εικόνα 1.7 Ανιχνευτής FISH για το σύνδρομο Williams-Beuren από την εταιρεία Cytocell aquarius

Probe Specification

Williams-Beuren, 7q11.23, Red
D7Z1, 7p11.1-q11.1, Green

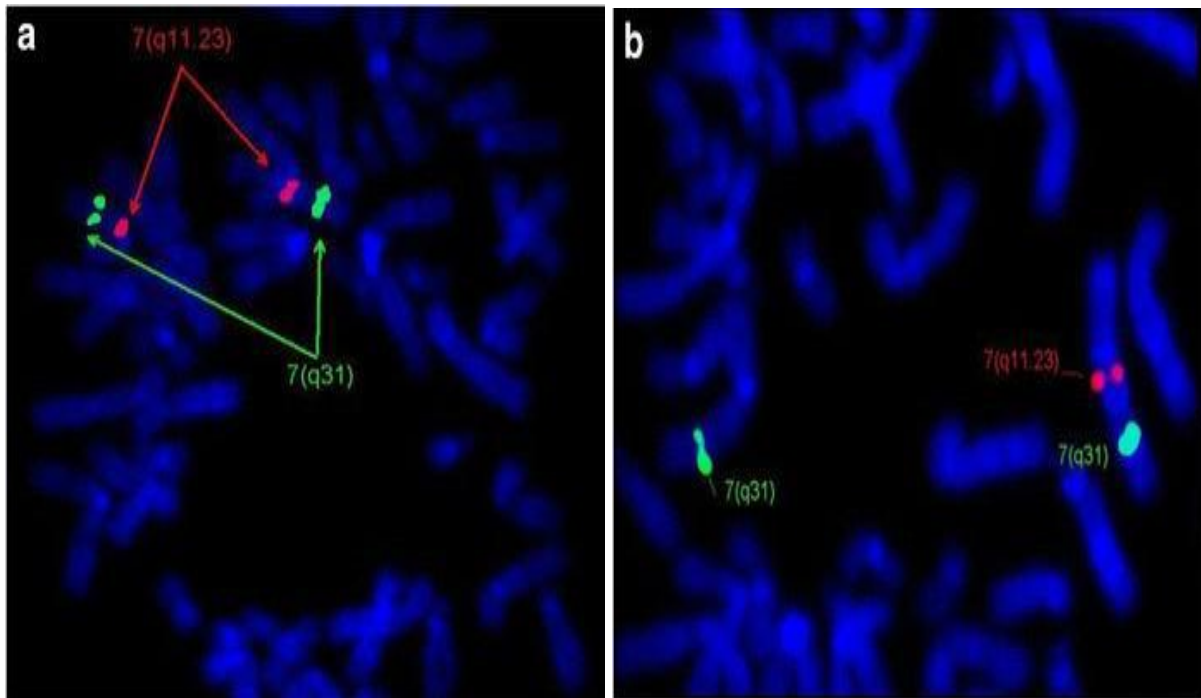


The Williams-Beuren probe, labelled in red, consists of three non-overlapping clones (148kb, 144kb and 204kb), which cover much of the deletion region. The probe mix also contains a control probe for the 7 centromere (D7Z1), labelled in green.

<https://www.oqt.com/products/product-search/cytocell-williams-beuren/>

Απεικονίζεται σχηματικά το χρωμόσωμα 7 με τον ανιχνευτή FISH για το σύνδρομο Williams-Beuren από την εταιρεία Cytocell aquarius χρωματισμένο κόκκινο και σε μεγέθυνση οι τρεις κόκκινες ξεχωριστές περιοχές κλώνοι της αλληλουχίας «στόχος» (μεγέθους 148Kb, 144kb και 204kb) που χρησιμοποιούνται και καλύπτουν μεγάλο μέρος της κρίσιμης περιοχής του ελλείμματος 7q11.23 του συνδρόμου Williams. Το μείγμα του ανιχνευτή περιέχει ακόμη έναν ανιχνευτή ελέγχου χρωματισμένο πράσινο για την περιοχή του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 7 (D7Z1).

Εικόνα 1.8 Απεικόνιση FISH από το μικροσκόπιο.



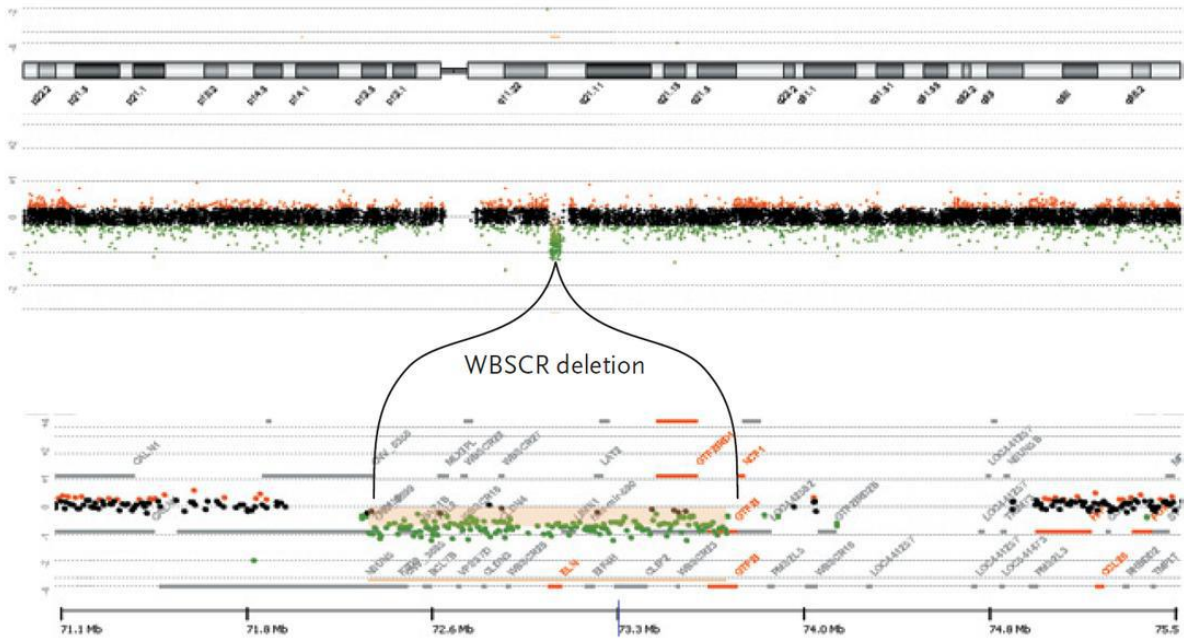
J. R. Hussein. Molecular Cytogenetics (2016) 9:65.

Στην εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα της μεθόδου FISH με χρήση ειδικών ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των χρωμοσωμάτων: τον ELN ανιχνευτή ειδικό για την περιοχή 7q11.23 που σχετίζεται με το ΣW (κόκκινο χρώμα) και τον LSI D7s ανιχνευτή ειδικό για την περιοχή που εδράζεται στο 7q31 (πράσινο χρώμα) που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικός ανιχνευτής ελέγχου προς επιβεβαίωση ότι ο υβριδισμός γίνεται στο χρωμόσωμα 7.

a. η FISH εικόνα δείχνει ότι δεν υπάρχει έλλειμμα στο χρωμόσωμα 7q11.23. Ο ELN ανιχνευτής αποδίδει δύο κόκκινα σήματα και στα δύο χρωμοσώματα 7q11.23.

b. η FISH εικόνα αναδεικνύει το έλλειμμα στην περιοχή 7q11.23. Ο ELN ανιχνευτής αποδίδει μόνο ένα σήμα σε ένα χρωμόσωμα και κανένα σήμα στο άλλο, αποκαλύπτοντας έλλειμμα του 7q11.23

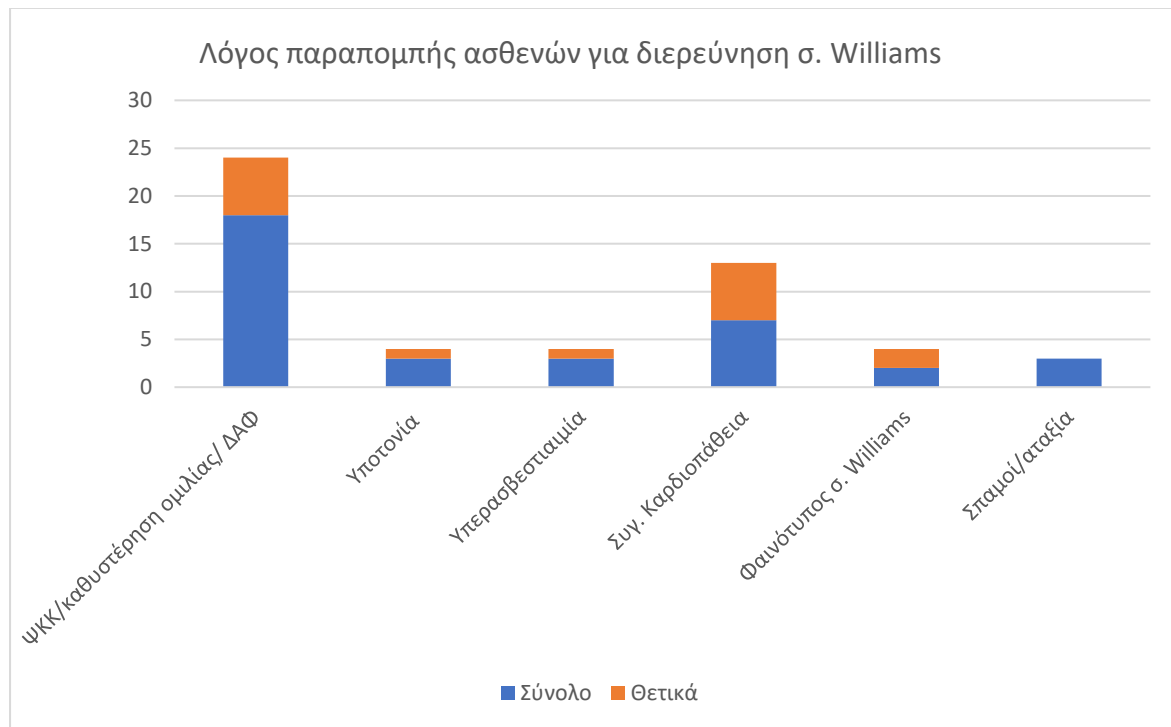
Εικόνα 1.9 Array- CGH για την ανίχνευση του ελλείματος του συνδρόμου Williams.



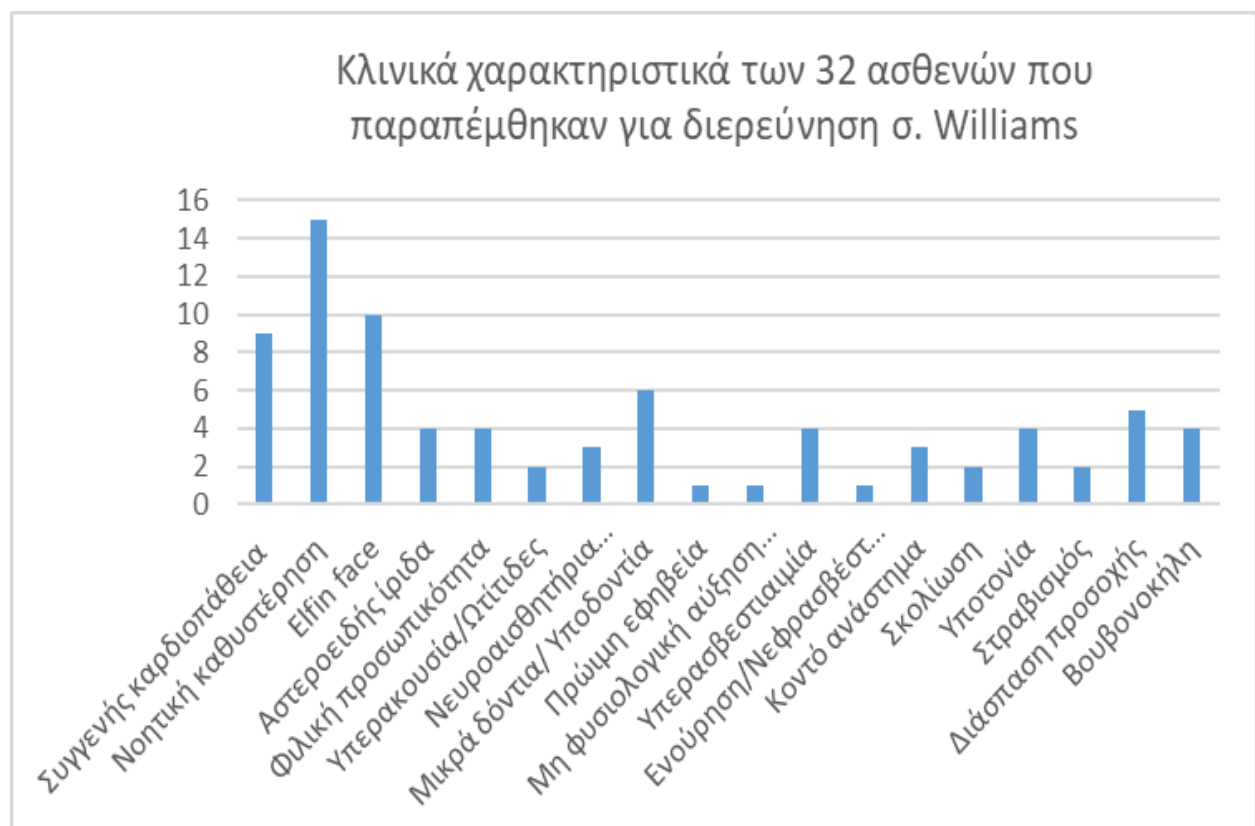
[Pober BR Williams-Beuren syndrome. N Engl J Med. 2010;362\(3\):239-52.](#)

Διάγνωση του ΣW με array- CGH. Παρουσιάζεται το έλλειμμα του ενός αντιγράφου της κρίσιμης χρωμοσωμικής περιοχής του συνδρόμου Williams (WBS)CR μεγέθους 1.5Mb, με πράσινα σήματα υβριδισμού (μεσαίο πλαίσιο), το ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 7 (επάνω πλαίσιο) και σε μεγέθυνση το έλλειμμα (κάτω πλαίσιο).

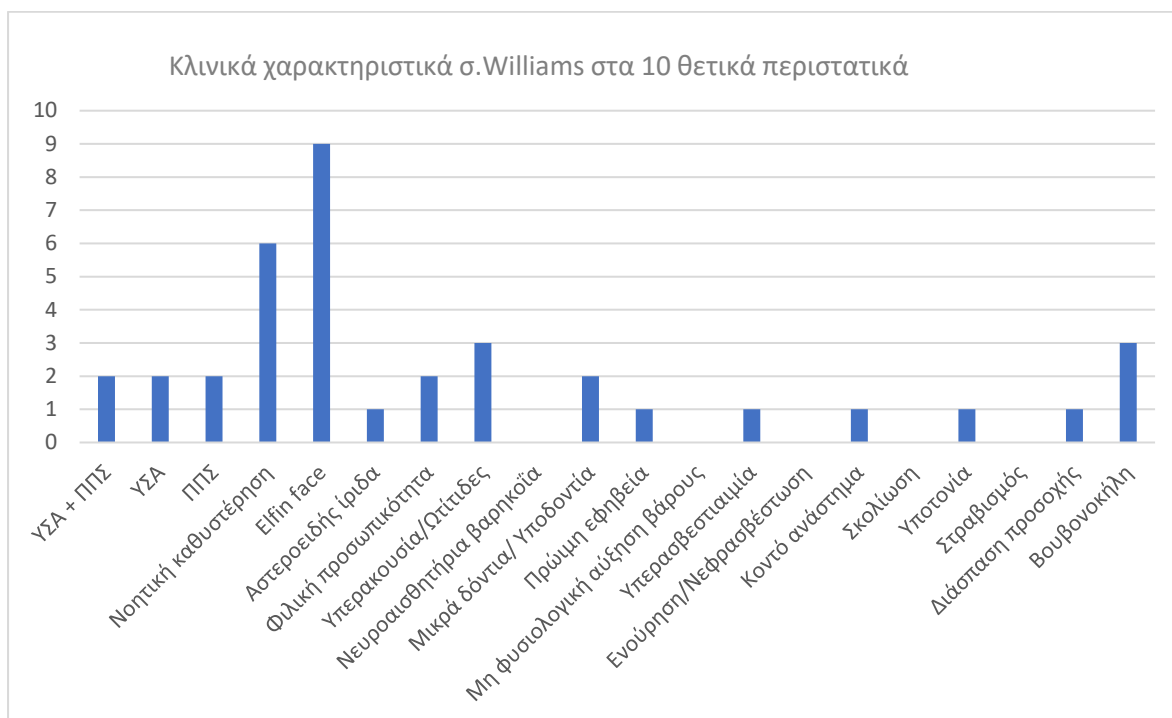
Εικόνα 1.10 Αίτια παραπομπής ασθενών για εργαστηριακή διερεύνηση συνδρόμου Williams. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το σύνολο αυτών και με πορτοκαλί εκείνοι με θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 1.11 Κλινικά χαρακτηριστικά των 32 ασθενών που εκτιμήθηκαν για πιθανό σύνδρομο Williams.



Εικόνα 1.12 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με σύνδρομο Williams.



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενετική του συνδρόμου Williams:

Το σύνδρομο Williams (ΣW ή Williams syndrome, WS; OMIM 194050), γνωστό και ως σύνδρομο Williams-Beuren (Williams-Beuren syndrome, WBS) είναι ένα συγγενές, πολυσυστηματικό και καλά αναγνωρισμένο νευροαναπτυξιακό νόσημα που εκδηλώνεται με ανωμαλίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αλλά και στον συνδετικό ιστό.

Το σύνδρομο Williams εμφανίζεται σποραδικά με συχνότητα περίπου 1 σε 7.500-20.000 γεννήσεις, προσβάλλοντας ισότιμα αγόρια και κορίτσια και κίνδυνο επανεμφάνισης σε επόμενη εγκυμοσύνη <5%. Στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε *de novo* μικροέλλειμμα στο χρωμόσωμα 7 μεγέθους 1.5-1.8 ζεύγη μεγαβάσεων (mega base pairs, Mbp) στη γενωμική θέση 7q11.23 (Εικόνα 1.1) και συμβαίνει λόγω της μοναδικής γενετικής αρχιτεκτονικής σε αυτήν την περιοχή, όπως περιγράφεται παρακάτω. Η περιοχή του ελλείματος περιλαμβάνει 26-28 γονίδια, μεταξύ των οποίων το γονίδιο *ELN* που κωδικοποιεί την ελαστίνη (*ELN* gene- OMIM 130160; Adams, 2012) και επιπλέον τα ακόλουθα 26 γονίδια: *NSUN5*, *CLDN4*, *METTL27*, *TMEM270*, *LIMK1*, *EIF4H*, *LAT2*, *RFC2*, *CLIP2*, *GTF2IRD1*, *GTF2I*, *NCF1*, *GTF2IRD2*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*, *VPS37D*, *DNAJC30*, *BUD23*, *STX1A*, *ABHD11*, *CLDN3* (Πίνακας 1.1, DeSilva, 2002; Pober, 2010).

Σε αυτή τη χρωμοσωμική περιοχή του ελλείματος, μέρος της αποτελεί μια μικρότερη περιοχή γονιδίου μονού αντιγράφου μεγέθους 1.2 Mb που πλαισιώνεται από αθροίσματα κάποιων ομόλογων μεταγραφικά ενεργών γονιδίων και περιβάλλεται από τρία τμήματα ψευδογονιδίων, τα οποία οργανώνονται σε μπλοκ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών επαναλήψεων μικρού αριθμού αντιγράφων (low copy repeat blocks- LCR blocks A,B and C με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους- Li, 2015) γνωστά και ως διπλότυπα (duplicons), τα οποία μπορεί να είναι κεντρομερικά, ενδιάμεσα και τελομερικά LCRs (Εικόνα 1.1, εικόνα 1.2). Τα ελλείματα που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο προκύπτουν σαν συνέπεια της λανθασμένης στοίχισης αυτών των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της μείωσης, του ακόλουθου άνισου επιχιασμού εξαιτίας της σημαντικής ομοιότητας των αλληλουχιών LCRs (>97%) και της γειτνίασης μεταξύ τους.

Αυτά τα LCRs μπλοκ διατάσσονται ως συμπλέγματα στο κεντρομερικό (A-B-C cen, cen=centromeric), ενδιάμεσο (A-B-C mid, mid=medial) και τελομερικό (A-B-C tel, tel=telomeric) τμήμα της κρίσιμης περιοχής του ΣW (Εικόνα 1.3). Το ΣW είναι το αποτέλεσμα λάθους στη σύζευξη των θραυσμάτων κυρίως μεταξύ των κεντρομερικών και ενδιάμεσων LCR blocks ομάδας B (Bcen and Bmid; Peoples, 2000) κατά τη μείωση. Σε ποσοστό 5% έως 10% των περιπτώσεων, τα σημεία θραύσης συναντώνται μεταξύ των κεντρομερικών και μέσων LCR blocks ομάδας A (Acen and Amid) με αποτέλεσμα την εμφάνιση ελλειμάτων μεγέθους περίπου 1.84 Mb (Bayés, 2003). Λόγω της υψηλής ομοιότητας αυτών των τμημάτων, ο μηχανισμός μη αλληλικού ομόλογου ανασυνδυασμού (nonallelic

homologous recombination-NAHR) με λάθος ευθυγράμμιση κατά τη διάρκεια της μείωσης των γαμετών είναι πιθανός και μπορεί να οδηγήσει σε μικροέλλειμα ή μικροδιπλασιασμό μέσα σε αυτή τη γενωμική περιοχή, με αποτέλεσμα άτυπη εκδήλωση/ φαινότυπο του συνδρόμου (Schubert, 2009). Περιοχές με μεγάλη ομοιότητα αλληλουχίας αποτελούν προϋπόθεση για να διευκολυνθεί ο μηχανισμός NAHR καθώς φαίνεται ότι για να είναι αποτελεσματικός, είναι απαραίτητο να υπάρχει συγκεκριμένο μήκος αμιγώς αντιστοιχισμένων αλληλουχιών. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι ο επιπολασμός των μικροδιπλασιασμών είναι πολύ μικρότερος από των μικροελλειμάτων (Dutra, 2012).

Τα πιο κοινά ελλείματα έχουν διαπιστωθεί στο 90%- 95% ασθενών με ΣW και αποτελούν γενωμική περιοχή μεγέθους περίπου 1.55Mb (Εικόνα 1.4). Τα άτυπα ελλείματα είναι σπάνια και ποικίλουν σε μέγεθος μεταξύ 200 kb μέχρι 2.5 Mb, συνήθως όμως είναι πάνω από 1.84 Mb ή μικρότερα από 1.55Mb (Ramirez, 2017) και ίσως σε αυτό το γεγονός να οφείλεται η ουσιαστική φαινοτυπική μεταβλητότητα που παρατηρείται μεταξύ των ασθενών με ΣW (Gagliardi, 2003).

Το ΣW ανήκει στην κατηγορία συνδρόμων ελλειμμάτων (contiguous gene deletion syndromes) όπου το σύνολο των γονιδίων στη γενωμική περιοχή προσδιορίζουν τον κλινικό φαινότυπο. Σε πληροφοριακές μελέτες σύνδεσης μελών από εκτεταμένες οικογένειες ασθενών αποκαλύφθηκε ότι στα δύο τρίτα περίπου των περιπτώσεων τα ελλείματα προέρχονται από διαχρωμοσωμικά γεγονότα ανασχηματισμού και στο υπόλοιπο ένα τρίτο των ασθενών που μελετήθηκαν από ενδοχρωμοσωμικά γεγονότα (Pober, 2010). Με βάση τις κλινικές διαφορές που συναντώνται μεταξύ ελλειμμάτων μητρικής ή πατρικής προέλευσης και της βαρύτερης κλινικής εικόνας με μεγαλύτερου βαθμού καθυστέρηση ανάπτυξης που συναντάται όταν το έλλειμα εντοπίζεται στο μητρικής προέλευσης χρωμόσωμα, φαίνεται ότι κάποια από τα γονίδια του συμπλέγματος Williams ελέγχονται με επιγενετικούς μηχανισμούς αποτύπωσης (Tassabehji, 2003; Amenta, 2005, Jurado, 1996).

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε ποσοστό 6% του γενικού πληθυσμού και 25% των γονέων ατόμων με ΣW έχουν διαπιστωθεί μικροαναστροφές μεγέθους 1.5-1.9 Mb, που αποτελούν πολυμορφική παραλλαγή της κρίσιμης γενωμικής περιοχής του συνδρόμου και πιθανώς προδιαθέτουν την απόκτηση απογόνων με ΣW (Hobart, 2010; Osborne, 2001). Οι ασθενείς με το έλλειμα έχουν 50% πιθανότητα να το μεταβιβάσουν στους απογόνους τους καθώς ακολουθείται ο αυτοσωμικός επικρατής τρόπος κληρονόμησης (Morris, 2020). Ο μωσαϊκισμός έχει επίσης παρατηρηθεί, είναι σπάνιος και πιθανώς είναι αποτέλεσμα του μιτωτικού ανασυνδυασμού που συμβαίνει περίπου 10^4 λιγότερες φορές της συχνότητας του μειωτικού ανασυνδυασμού, ο οποίος προκαλεί το τυπικό έλλειμα του συνδρόμου Williams (Tassabehji, 2003).

1.2 Ιστορική αναδρομή του συνδρόμου Williams:

Πειράματα με χρήση εμβρύων κουνελιών που παρουσίασαν κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες και υπερβαλβιδική στένωση αορτής (ΥΣΑ) όταν εκτέθηκαν σε υψηλή δόση βιταμίνης D οδήγησαν αρχικά στην υπόθεση ότι το σύνδρομο είναι αποτέλεσμα τερατογένεσης από υπερβιταμίνωση D (Friedman, 1966). Η πρώτη περιγραφή του συνδρόμου Williams πιθανώς έγινε από τον συγγραφέα Charles Dickens το 1841, όπου στο μυθιστόρημά του Barnaby Rudge ο πρωταγωνιστής πιθανώς είναι βασισμένος σε ένα άτομο που ο ίδιος γνώριζε με το σύνδρομο. Στο μυθιστόρημά του περιγράφει πολλά από τα τυπικά φυσικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου όπως το ιδιόμορφο προσωπείο δίκην ξωτικού (elfin face), καθώς και τα ψυχοκοινωνικά γνωρίσματα ατόμου με εξωστρεφή προσωπικότητα που εκδηλώνει υπερβολική εμπιστοσύνη στους ξένους (Ebloni, 2016).

Το σύνδρομο αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ξεχωριστή κλινική οντότητα από τον γιατρό John Cyprian Phipps Williams στη Νέα Ζηλανδία, το 1961. Στη σχετική δημοσίευση στο περιοδικό Circulation (Williams, 1961), περιγράφει τα χαρακτηριστικά του προσώπου τεσσάρων παιδιών ως εξής: Τα πρόσωπα είναι γεμάτα, τα μέτωπα πλατιά, τα μάτια ξεχωρίζουν καλά, τα μάγουλα είναι βαριά, τα στόματα πλατιά και σε μερικά παιδιά τα χείλη είναι γεμάτα, τα πηγούνια όμως είναι μυτερά. Το 1962, άλλη δημοσίευση στο ίδιο περιοδικό από τον Γερμανό παιδοκαρδιολόγο Alois J. Beuren, αναφέρεται σε τέσσερα παιδιά με ΥΣΑ (Beuren, 1962). Η περιγραφή του Beuren περιελάμβανε την παρουσία στένωσης της πνευμονικής αρτηρίας και επιπλέον οδοντικές ανωμαλίες. Το σύνδρομο της αρτηριοπάθειας από έλλειψη ελαστίνης, της ΥΣΑ, της νοητικής καθυστέρησης και της ασυνήθιστης εμφάνισης του προσώπου είναι επομένως γνωστό ως σύνδρομο Williams - Beuren ή πιο συχνά σύνδρομο Williams (Mark, 2019).

1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣW που οφείλονται στην έλλειψη των γονιδίων *ELN*, *LIMK1*, *CLIP2*:

Το ελάχιστο κρίσιμο μέγεθος ελλείματος που σχετίζεται με τον τυπικό φαινότυπο στα άτομα με ΣW υπολογίζεται ότι καλύπτει την περιοχή μεταξύ του γονιδίου της ελαστίνης και του κοινού τελομερικού σημείου θραύσης. Το γονίδιο *ELN*, το οποίο κωδικοποιεί τη δομική πρωτεΐνη ελαστίνη, βρίσκεται κοντά στο μέσο της κοινώς ορισμένης κρίσιμης περιοχής του ελλείματος του συνδρόμου (Lowery, 1995). Αυτό το γενετικό έλλειμμα περιλαμβάνει ένα από τα δύο αλληλόμορφα του *ELN* και προκαλεί ανεπαρκή παραγωγή της ελαστίνης που αποτελεί σημαντικό συστατικό των ελαστικών ινών που βρίσκονται στον συνδετικό ιστό πολλών οργάνων, με αποτέλεσμα τις αγγειακές ανωμαλίες και τα τυπικά καρδιολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στο σύνδρομο Williams (Keating, 1995; Ewart, 1993). Όταν το έλλειμμα περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο *ELN*, ή εάν το γονίδιο *ELN* περιέχει μια μετάλλαξη ή παθολόγο παραλλαγή, το αποτέλεσμα είναι η αυτοσωμική επικρατής κληρονομική διαταραχή της ΥΣΑ. Αυτά τα άτομα δεν έχουν ΣW. Παραδόξως, έχει διαπιστωθεί ότι ποσοστό έως 35% των ασθενών με σημειακές μεταλλάξεις του *ELN* χωρίς έλλειμμα, εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΣW (Metcalf, 2000).

Το έλλειμμα του *ELN* εξηγεί και άλλα χαρακτηριστικά του ΣW, όπως κάποια από τα χαρακτηριστικά του προσώπου, τη βραχνή φωνή, τη βουβωνοκλήλη, τα εκκολπώματα κύστης και εντέρου και τα ορθοπεδικά προβλήματα. Έχει προταθεί ότι οι παραλλαγές αλληλουχίας στο μη διαγραμμένο *ELN* αλληλόμορφο μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη μεταβλητή εκφραστικότητα του καρδιαγγειακού φαινοτύπου ανάλογα με την ποσότητα της διαθέσιμης τροποελαστίνης (Delio, 2013).

Η παθογένεση των άλλων χαρακτηριστικών, όπως η νοητική υστέρηση, πιθανότατα οφείλεται στη διαγραφή γειτονικών γονιδίων στην κρίσιμη χρωμοσωμική περιοχή. Το γονίδιο *LIMK1* έχει συσχετιστεί με το χαρακτηριστικό γνωστικό προφίλ του ΣW, όπως τα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά συμπεριφοράς και ανάπτυξης των ασθενών με το σύνδρομο (φιλική προσωπικότητα, υπερευαίσθησία στον ήχο, άγχος, αναπτυξιακή καθυστέρηση, προβλήματα οπτικοακουστικά και καθυστερημένη απόκτηση ομιλίας ακολουθούμενη από υπερβολική ομιλία), λόγω πιθανώς μειωμένης νευρωνικής μετανάστευσης στην πρόσθια περιοχή του νησιωτικού φλοιού ως αποτέλεσμα απλοανεπάρκειας των γονιδίων *LIMK1* και *CLIP2*.

1.4 Φαινότυπος- γονότυπος:

Το σύνδρομο Williams είναι μια πολυσυστηματική διαταραχή με τον φαινότυπο των πασχόντων να έχει ευρέως αποτυπωθεί από την επιστημονική κοινότητα. Η κλινική διάγνωση του ΣW καθορίζεται σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικανικής Ακαδημίας Παιδιατρικής (American Academy of Paediatrics, AAP) (Επιτροπή Γενετικής 2001, Εικόνα 1.5) και πρέπει να συνοδεύεται από γενετική εργαστηριακή διερεύνηση. Τα παιδιά με ΣW συνήθως διαγιγνώσκονται από τους παιδιάτρους κατά τη βρεφική ηλικία ή την πρώιμη παιδική ηλικία, αναγνωρίζοντας τον χαρακτηριστικό συνδυασμό των ευρημάτων (Stromme, 2002). Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι επειδή τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γίνονται πιο εμφανή με την πρόοδο της ηλικίας, η πιθανότητα κλινικής διάγνωσης ασθενών με το σύνδρομο είναι μεγαλύτερη σε μεγαλύτερα ηλικιακά άτομα (Borg, 1995).

Στον πίνακα 1.2, παρουσιάζονται τα κύρια κοινά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣW ανά σύστημα οργάνων (Prober, 2010). Οι ασθενείς κυρίως εμφανίζουν το δυσμορφικό προσωπείο (100%, εικόνα 1.6), καρδιαγγειακές παθήσεις (80%- συνηθέστερα ΥΣΑ και περιφερική πνευμονική στένωση- ΠΠΣ), διανοητική αναπηρία/ νοητική καθυστέρηση (75%), χαρακτηριστικό γνωστικό προφίλ / υπερβολική φιλικότητα (90%), και ιδιοπαθή βρεφική υπερασβεστιαμία (15% έως 45% - Williams, 1961; Morris, 1999). Η συχνότητα εμφάνισης των χαρακτηριστικών του συνδρόμου ποικίλει και εξαρτάται από τον υπό μελέτη πληθυσμό, όπως για παράδειγμα, η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών ανωμαλιών έχει παρατηρηθεί ότι είναι μικρότερη στον ελληνικό πληθυσμό συγκριτικά με τη διεθνή βιβλιογραφία (Amenta, 2005). Αυτές είναι και η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών που σχετίζεται με το σύνδρομο (Collins, 2010; Mark, 2019).

Το σύνδρομο εμφανίζει μεταβλητή εκφραστικότητα που μπορεί πιθανώς να ερμηνεύσει τις σημαντικές διαφορές των ποσοστών εμφάνισης κάθε συμπτώματος στις διάφορες μελέτες. (Dutra, 2012). Οι ασθενείς με τα μεγαλύτερα ελλείμματα (μεγέθους >2-4 Mb) που περιέχουν την WBSCR περιοχή εμφανίζουν βαρύτερο κλινικό φαινότυπο με μικρότερη γνωστική ικανότητα συγκριτικά με τα άτομα με τυπικά ελλείμματα (μεγέθους: 1,5-1,8 Mb). Τα μικρότερα ελλείμματα (<1,5-1,8 Mb) στην κρίσιμη περιοχή σχετίζονται με ένα μεταβλητό φαινότυπο, ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθος του ελλείματος και τα γονίδια που περιέχει, χωρίς όμως να έχει καταστεί δυνατή η σαφής συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου (Metcalf, 2000). Άλλοι παράγοντες που μπορεί να ερμηνεύσουν τη μεταβλητότητα των φαινοτύπων είναι ο αριθμός των γονιδίων στη περιοχή του ελλείματος, ο βιολογικός τους ρόλος καθώς και η δραστηριότητα των ημίζυγων αλληλίων στο χρωμόσωμα χωρίς το έλλειμμα.

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου και τη βαρύτητα του φαινοτύπου με την υποκείμενη γενετική παραλλαγή χωρίς μεγάλη επιτυχία (Dutra, 2012). Οι ασθενείς με κλασικό έλλειμμα παρουσιάζουν τυπικό φαινότυπο ΣW, ενώ εκείνοι με υψηλή κλινική βαθμολογία με βάσει τα διαγνωστικά κριτήρια, αλλά χωρίς το αναμενόμενο

έλλειμμα, ενδέχεται να έχουν σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου *ELN*. Επιπλέον, οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου σε ασθενείς με 7q11.23 μικροδιπλασιασμούς είναι πιο ήπιες, μεταβλητές και περισσότερο ασαφείς, με αποτέλεσμα να γίνεται εσφαλμένη διάγνωση της διαταραχής ή ακόμη και να μένει αδιάγνωστη (Li, 2015). Οι μικροδιπλασιασμοί της κρίσιμης περιοχής του ΣW διαπιστώνονται σε ποσοστό 50% των ασθενών με λιγότερο διακριτικά και κάπως αντίθετα κλινικά χαρακτηριστικά, όπως ελλείμματα κοινωνικής αλληλεπίδρασης με έναν αυτιστικό φαινότυπο, καθιστώντας δύσκολη την ολοκλήρωση ενός φυσικού χάρτη της περιοχής λόγω των μεγάλων περιοχών διπλασιασμού που συνοδεύουν το έλλειμμα.

Άλλα σύνδρομα μικροελλειμμάτων (όπως τα 22q11.2 και 10p15.3) έχουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά που μπορούν εύκολα να συγχέονται με το ΣW, υποδηλώνοντας ότι η κλινική εξέταση οφείλει να συνδυάζεται με μοριακό κυτταρογενετικό έλεγχο ώστε να επιτευχθεί η ακριβής διάγνωση. Αν και τα άτομα με ΣW παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικό φαινοτυπικό προφίλ, η διάγνωση του ΣW επιβεβαιώνεται με ανίχνευση του ελλείματος με τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής, όπως κυρίως η χρήση της τεχνικής FISH.

1.5 Εργαστηριακή επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης του ΣW με χρήση FISH- Η χρυσή τεχνική:

Ο κλασικός καρυότυπος που στηρίζεται στην εξέταση των ταινιών των χρωμοσωμάτων, δεν επιτρέπει την ανίχνευση ανακατατάξεων μικρότερων από 5 Mb ή ανωμαλιών που αφορούν περιοχές του γονιδιώματος χωρίς διακριτές ταινίες. Λόγω του μικρού μεγέθους του ελλείματος σε ασθενείς με ΣW, η ανίχνευσή του γίνεται εργαστηριακά με την παρατήρηση του ετερόζυγου υπομικροσκοπικού μικροελλείματος στην προσεγγιστική θέση του chr7:72,744,454-74,142,513 στο γονιδίωμα αναφοράς (NCBI Build GRCh37/hg19) με την τεχνική του φθορίζοντα in-situ υβριδισμού (fluorescence in-situ hybridization- FISH). Αν και αρκετά γονίδια ενδιαφέροντος βρίσκονται στην περιοχή αυτή δεν έχει ταυτοποιηθεί έως σήμερα κανένα μεμονωμένο γονίδιο του οποίου οι παθολόγες παραλλαγές να αποτελούν τη γενετική αιτιολογία του συνδρόμου.

Η τεχνική FISH (εικόνα 1.7- 1.8) που περιλαμβάνει ειδικούς ανιχνευτές αυτής της χρωμοσωμικής περιοχής καθιερώνει τη διάγνωση του συνδρόμου Williams δείχνοντας την παρουσία ενός μόνο αλληλομόρφου γονιδίου ελαστίνης. Αν και η FISH παραμένει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή μέθοδος, χωρίς όμως να δύναται να εκτιμήσει το μέγεθος του μικροελλείματος, υπάρχουν ακόμη διαθέσιμες πολλές άλλες εργαστηριακές τεχνικές για τη εξέταση του συνδρόμου Williams (Mark, 2019), που περιγράφονται και συγκρίνονται παρακάτω.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της διπλωματικής μου εργασίας είναι η αναδρομική μελέτη των παιδιατρικών ασθενών του ελληνικού πληθυσμού που παραπέμφθηκαν με κλινική εικόνα πιθανού ΣW και εκτιμήθηκαν από τους κλινικούς γενετιστές του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) για εργαστηριακή επιβεβαίωση της διάγνωσης του συνδρόμου, μεταξύ των ετών 2009-2016 καθώς και η σύγκριση των διαθέσιμων εργαστηριακών τεχνικών για τη διάγνωση του συνδρόμου μέσα από μελέτες υγιών ατόμων, συγγενών αλλά κυρίως ασθενών με σύνδρομο Williams.

Πραγματοποιήθηκε:

1. Ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με το σύνδρομο και την πιθανή συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου.
2. Καταγραφή των αποτελεσμάτων της εργαστηριακής διερεύνησης στους ανωτέρω ασθενείς.
3. Καταγραφή των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με έλλειμα.
4. Σύγκριση των ευρημάτων με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η συλλογή των κλινικών στοιχείων των ασθενών της μελέτης έγινε από τα αρχεία του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών σύμφωνα με κριτήριο την αιτία παραπομπής τους για κλινική αξιολόγηση και εργαστηριακή διερεύνηση του συνδρόμου. Αναζητήθηκαν οι ιατρικοί φάκελοί τους ώστε να επιβεβαιωθεί η κλινική διάγνωση ως αποτέλεσμα συνεκτίμησης από τους κλινικούς γενετιστές αλλά και της εργαστηριακής διερεύνησης. Ο εργαστηριακός έλεγχος έγινε με τη τεχνική FISH. Σε όλες τις περιπτώσεις μελετήθηκε και ο καρυότυπος λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ώστε να αποκλειστεί η παρουσία εμφανούς αριθμητικής ή δομικής ανωμαλίας.

Αναλυτικότερα, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

1. Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος σε καλλιεργητικό υλικό RPMI μετρίως ενισχυμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (fetal bovine serum 10%), φυτοαιματογλυτινίνη και πενικιλίνη/στρεπταμυκίνη (1%).
2. Επώση για 72 ώρες στους 37°.
3. Προσθήκη κολχικίνης (80 μl) στην καλλιέργεια για τη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης στο στάδιο της μετάφασης. Επώση στους 37° για 3 ώρες.
4. Προσθήκη υπότονου διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCL 0,0075M) για 18 λεπτά στους 37°
5. Μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων με 3 επανειλημμένες πλύσεις με διάλυμα μεθανόλης:οξέος (3:1) για 3 φορές.
6. Το ίζημα κάθε καλλιέργειας επιστρώθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Ακολούθησε επώση για 1 ώρα σε διάλυμα RNAάσης/SSC 10 mg Naάση σε 100 mg SSC), επώση για 10 λεπτά σε διάλυμα πεψίνης/ PBS (5-10mg) και πλύσεις για την απομάκρυνση των ενζύμων.

Για την τεχνική FISH χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής Williams-Beuren από την εταιρεία Cytocell aquarius (Εικόνα 1.7) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για την ανίχνευση της ημιζυγωτίας του γονιδίου της ελαστίνης. Η τεχνική περιλαμβάνει:

1. Την ταυτόχρονη αποδιάταξη των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και του ανιχνευτή με θέρμανση σε φούρνο υβριδισμού 75° για 2 λεπτά.
2. Τον υβριδισμό στους 37° σε περιβάλλον υγρασίας για 17 ώρες.
3. Δύο πλύσεις σε 2x SSC.
4. Την ανίχνευση των θέσεων υβριδισμού με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Η συλλογή της βιβλιογραφίας για την υποστήριξη του θέματός μου έγινε με χρήση μηχανών αναζήτησης όπως το PubMed και το Google Scholar, καθώς και χρήση ιστοσελίδων επιστημονικού περιεχομένου όπως <https://www.aap.org>, <https://genetics-gsa.org>, <https://williams-syndrome.org.uk>, <https://rarediseases.org>, <https://www.omim.org/>, Πέργαμος- η ηλεκτρονική

βιβλιοθήκη του Πανεπιστημίου Αθηνών αλλά και πληροφορίες από τις παρουσιάσεις του διδακτικού προσωπικού του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποίησα ήταν στην αγγλική γλώσσα και αφορούσαν σε: Williams syndrome and/or Williams-Beuren syndrome and/or MPLA and/or FISH and/or population study and/or microdeletion syndrome and/or genetic laboratory techniques. Πολλά από τα άρθρα ενδιαφέροντος προήλθαν από σχετική βιβλιογραφία άλλων άρθρων που βρήκα μέσω της ανωτέρω αναζήτησης. Η επιλογή της βιβλιογραφίας έγινε με βάση τις λέξεις κλειδιά και κυρίως με κριτήριο το περιεχόμενο της κάθε μελέτης. Η αξιολόγηση του περιεχομένου των άρθρων που επέλεξα έγινε αρχικά από τον τίτλο και την περίληψή τους. Η τελική επιλογή έγινε μετά από ενδελεχή μελέτη με βάση τα συμπεράσματα, τη συνάφεια με το αρχικό ερώτημα, τις βιβλιογραφικές παραπομπές τους και την σχετική εμπειρία των συγγραφέων στο θέμα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην επταετία μεταξύ 2009-2016 παραπέμφθηκαν για διερεύνηση στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής ΕΚΠΑ, 121 παιδιά ηλικίας από 3 μηνών έως 16 ετών με πιθανό κλινικό φαινότυπο συνδρόμου Williams. Η παραπομπή έγινε στο Ιατρείο της Κλινικής Γενετικής από Καρδιολόγο, Νευρολόγο/Αναπτυξιολόγο ή από Νοσοκομειακή Παιδιατρική κλινική. Αποκλείστηκαν από την μελέτη 89 ασθενείς λόγω έλλειψης ιατρικών σημειώσεων (παραπομπές από παιδιατρικές κλινικές κεντρικών και επαρχιακών νοσοκομείων της χώρας) και τελικά συμπεριλήφθηκαν 32, 13 αγόρια και 19 κορίτσια.

Σε όλους τους ασθενείς έγινε λεπτομερής καταγραφή του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων, ιατρικών εκτιμήσεων/γνωματεύσεων καθώς και των ευρημάτων από τον κυτταρογενετικό έλεγχο (καρυότυπος) και τη μοριακή κυτταρογενετική μελέτη με FISH. Οι κύριες αιτίες παραπομπής των ασθενών προς διερεύνηση ΣW ήταν κυρίως η ψυχοκινητική καθυστέρηση (ΨΚΚ), η καθυστέρηση ομιλίας, η διαταραχή αυτιστικού φάσματος (ΔΑΦ) καθώς και η συγγενής καρδιοπάθεια. Μαζί με τα σωματομετρικά στοιχεία (βάρος, ύψος και περίμετρος κεφαλής) των ασθενών, τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν σε αυτούς κατά την εκτίμησή τους ήταν κυρίως το δυσμορφικό προσώπιο (10/32) και η νοητική υστέρηση (15/32), με τη συγγενή καρδιοπάθεια (9/32), τις διαταραχές δοντιών/ υποδοντία (6/32) και τη διαταραχή προσοχής (5/32) να ακολουθούν. Σε λιγότερο βαθμό παρατηρήθηκαν άλλα χαρακτηριστικά του συνδρόμου όπως η αστεροειδής ίριδα, η φιλική προσωπικότητα, η υπερασβεστιαμία, η υποτονία, η βουβωνοκήλη καθώς και η νευροαισθητήρια βαρηκοΐα/υπερακουσία, η πρώιμη εφηβεία, το κοντό ανάστημα, η σκολίωση και ο στραβισμός (σηματικά απεικονίζονται στην εικόνα 1.11).

Σε 10/32 ασθενείς (8 κορίτσια, 2 αγόρια) επιβεβαιώθηκε με θετικό αποτέλεσμα στη γενετική ανάλυση η διάγνωση του συνδρόμου Williams με ανίχνευση ημιζυγωτίας (εικόνα 1.8). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.10 και οι 2 ασθενείς (100%) με κλινικό φαινότυπο ΣW καθώς και οι 6 στους 7 ασθενείς (86%) που παραπέμφθηκαν με συγγενή καρδιοπάθεια επιβεβαιώθηκε ότι πάσχουν από ΣW ενώ λιγότερα είναι τα ποσοστά διάγνωσης του συνδρόμου σε ασθενείς με αιτία παραπομπής ΨΚΚ/ΔΑΦ (33%), υποτονία (33%), υπερασβεστιαμία (33%), αταξία/σπασμοί (0%). Στους 10 ασθενείς που η κλινική υποψία συνδρόμου Williams επιβεβαιώθηκε με το γενετικό αποτέλεσμα, τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά αποτελούσαν το χαρακτηριστικό προσώπιο (9/10), η νοητική καθυστέρηση (6/10) και η συγγενής καρδιοπάθεια (6/10- από τα οποία 2 παιδιά με ΥΣΑ, 2 παιδιά με ΠΠΣ, 2 παιδιά με ΥΣΑ+ΠΠΣ). Σε 3/10 παιδιά παρατηρήθηκε υπερακουσία και βουβωνοκήλη, σε 2/10 φιλική προσωπικότητα και μικρά δόντια/υποδοντία και τέλος σε 1/10 παιδί πρώιμη ήβη, αστεροειδής ίριδα, υπερασβεστιαμία, κοντό ανάστημα, υποτονία και διάσπαση προσοχής (Εικόνα 1.12). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε 2 από τους συνολικά 32 ασθενείς που αξιολογήθηκαν με την παραπομπή τους και

ελέγχθηκαν για πιθανό ΣW, η γενετική ανάλυση ήταν αρνητική για ΣW αλλά με χρήση WES (whole exome sequencing) και aCGH διαγνώσθηκαν με σύνδρομο Koolen De Vries και σύνδρομο Usher.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη των ασθενών με σύνδρομο Williams έχει δώσει πληροφορίες σχετικά με την δομή και τη λειτουργία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (γονίδιο ελαστίνης), έχει συμβάλλει στην κατανόηση της δομής και αναδιάταξης του γονιδιώματος, και έχει αρχίσει να διασαφηνίζει τις γενετικές βάσεις της μάθησης, γλώσσας και συμπεριφοράς. Λεπτομερής αξιολόγηση των ασθενών με ΣW οδηγεί σε έγκαιρη διάγνωση, κατάλληλη διαχείριση και γενετική συμβουλευτική (Amenta, 2005; Huang, 2002). Περαιτέρω διευκρίνιση της γενετικής βάσης των σχετιζόμενων με το ΣW γονιδίων θα διευρύνει την κατανόησή μας για την αιτιολογία της νόσου καθώς η απουσία συγγενών καρδιακών παθήσεων δεν αποκλείει τη διάγνωση ΣW και ασθενείς με έλλειμμα του γονιδίου ELN δεν εμφανίζουν καρδιακές ανωμαλίες (τουλάχιστον 15% στη διεθνή βιβλιογραφία, ενώ στη μελέτη μου αγγίζει το 40%). Η σημασία του εργαστηριακού ελέγχου με άλλη μέθοδο ή η επανάληψη του αποτελέσματος πρέπει να τονιστεί όταν αποκλίνουν οι κλινικές και οι εργαστηριακές αναλύσεις.

Οι ασθενείς που διαγνώστηκαν με σύνδρομο Williams στο εργαστήριό μας παρουσιάζουν σπανιότερα καρδιαγγειακές ανωμαλίες σε σχέση με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (60% έναντι 80% αντίστοιχα), γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα παλαιότερων μελετών (Amenta, 2005). Ανάλογα ευρήματα υπάρχουν και για άλλα χαρακτηριστικά του συνδρόμου όπως με το δυσμορφικό προσωπείο (90% έναντι 100%), φιλική προσωπικότητα (20% έναντι 90%), υπερασβεστιαϊμία (10% έναντι 15%-45%) και νοητική καθυστέρηση (60% έναντι 75%). Αυτή η διαφοροποίηση πιθανότατα οφείλεται στον μικρό αριθμό ασθενών της μελέτης.

Επί του παρόντος, το μικροέλλειμμα στην γενωμική περιοχή 7q11.23 μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες μεθόδους, όπως:

1. FISH,
2. ανάλυση χρωμοσωμικών μικροσυστοιχιών (CMA- chromosomal microarray / Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού, Array based comparative genomic hybridization- aCGH, εικόνα 1.9),
3. πολυμορφικοί δείκτες μικροδορυφόρων (polymorphic microsatellite markers- PMM),
4. ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time polymerase chain reaction- QPCR),
5. παράλογος ποσοτικός προσδιορισμός αλληλουχίας DNA (paralogous sequence quantification- PSQ),
6. fragment DNA analysis: υψηλής ανάλυσης πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (high-resolution single nucleotide polymorphism- SNP),
7. πολυμορφισμός με επανάληψη δινουκλεοτιδίων (Dinucleotide repeat polymorphism- DNRP) και
8. μοριακή τεχνική MLPA.

Το ΣW προκαλείται από χρωμοσωμικό μικροέλλειμμα στην περιοχή 7q11.23, η οποία δεν είναι ορατή με συμβατικό καρυότυπο, αλλά παραδοσιακά με ανάλυση FISH γίνεται η διάγνωση σε περίπου 95% των κλινικά τυπικών περιπτώσεων (Lowery, 1995). Το αμερικανικό κολλέγιο ιατρικής γενετικής (American College of Medical Genetics and Genomics- ACMG) συνιστά τη χρήση της τεχνικής FISH ως του πρώτου διαγνωστικού τεστ για το ΣW (Manning, 2010) με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων ανιχνευτών. Τα κύρια μειονεκτήματα της τεχνικής FISH είναι η αποτυχία της να εντοπίσει μικρά ελλείμματα και επαναλήψεις και το γεγονός ότι επηρεάζεται εύκολα από την ποιότητα των μεταφάσεων. Επιπλέον, αυτή η προσέγγιση δεν είναι κατάλληλη για τη μελέτη παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (copy number variants- CNV) λόγω της χαμηλής ανάλυσης και χαμηλής απόδοσης της μεθόδου (Hussein, 2016).

Η χρήση της τεχνικής CMA είναι χρονοβόρα με ακριβό κόστος, αλλά είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό τυπικών/ άτυπων παθογόνων CNVs στο ΣW, για τον προσδιορισμό των απομακρυσμένων σημείων θραύσης της αλληλουχίας DNA αλλά και για τον εντοπισμό άλλων CNVs. Η χρήση της δίνει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του ελλείματος και τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε αυτό και αποτελεί ένα σημαντικό αποτέλεσμα πέραν της κλινικής εξέτασης για την ακριβή διάγνωση του συνδρόμου (Hussein, 2016). Ο εντοπισμός νέων κυτταρογενετικών ανωμαλιών επιτυγχάνεται καθώς η μέθοδος CMA μπορεί να ελέγξει ολόκληρο το γονιδίωμα, αλλά παραμένει μη ειδική στην ανίχνευση κάποιων συνδρόμων μικροελλειμμάτων με μη στοχευμένο γονιδιακό τόπο.

Ως άλλη εναλλακτική λύση της FISH, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση PMM (μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων: Variable number of tandem repeats -VNTR) για την ανίχνευση ασθενών με ΣW. Οι πολυμορφικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται αφορούν μικροδορυφορικές αλληλουχίες δινουκλεοτιδίων αδενίνης-κυτοσίνης (CAs) οι οποίες εντοπίζονται εκατέρωθεν του γονιδίου της ελαστίνης στην κρίσιμη περιοχή του ελλείματος 7q11.23 (πχ. D7S489B, D7S2476, D7S613, D7S2472, D7S1870, D7S489A- εικόνα 1.2). Το μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι πρέπει συμπληρωματικά να είναι διαθέσιμο το DNA των γονέων του ασθενούς καθώς παρέχονται πληροφορίες ως προς την γονεϊκή προέλευση, το μέγεθος και τα όρια του ελλείματος. Η μοριακή ανάλυση με τη μελέτη DNA και τη χρήση αυτών των πολυμορφικών δεικτών είναι χρήσιμη όταν αποτυγχάνει η ανίχνευση του ελλείματος με μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής.

Η μέθοδος MLPA θεωρείται μια ταχύτερη και πιο οικονομική τεχνική με τεχνικά απλή μοριακή προσέγγιση. Η χρήση της έχει αποδειχθεί μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση έναντι της FISH για την ανίχνευση του ΣW (Schouten, 2002; Koolen, 2004; Vorstman, 2006; van Hagen, 2007). Ένα ευρέως διαθέσιμο κιτ που περιέχει ανιχνευτές για οκτώ γονίδια της κρίσιμης περιοχής του ΣW: FKBP6, FZD9, TBL2, STX1A, ELN, LIMK1, RFC2 και CYLN2, χρησιμοποιείται και δίνει ακριβή αποτελέσματα για την χαρτογράφηση του ελλείματος. Σε σύγκριση με τη FISH, η MLPA είναι λιγότερο χρονοβόρα και έχει επίσης τη δυνατότητα να ανιχνεύει μικρότερα, άτυπα ελλείμματα αλλά και επαναλήψεις στην

κρίσιμη περιοχή του ΣW και να πραγματοποιείται ο έλεγχος για μικροελλείμματα/ μικροδιπλασιασμούς σε μία μόνο δοκιμασία, καλύπτοντας έτσι το κενό μεταξύ τεχνικών απλού γενετικού τύπου και τεχνικών συστοιχιών. Η ευαισθησία της και η συχνότητα των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων δεν είναι γνωστές (Eun, 2009) και οι πολυμορφισμοί που πιθανόν να υπάρχουν στους ανιχνευτές MLPA και ίσως να ερμηνευθούν ως ελλείμματα (Wehner, 2005) έχουν ιδιαίτερη σημασία για τα κλινικά εργαστήρια που αντικαθιστούν την FISH με την MLPA και δεν πρέπει να αγνοούνται. Η MLPA τεχνική όσο και η CMA έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στον εντοπισμό των CNVs στην γενωμική περιοχή 7q11.23 του ΣW (Honjo, 2015; Li, 2016; Sharma, 2015).

Η χρήση τεχνικών όπως το PSQ και το QPCR έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία για τη διάγνωση του γνωστού ελλείμματος DNA σε ασθενείς με ΣW (Howald, 2006; Schubert, 2009). Επιπλέον, νέες τεχνικές αναπτύσσονται, όπως η fragment DNA analysis με τη χρήση ηλεκτροφόρησης με την υψηλή ανάλυση SNP ή ανάλυση συστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων και θεωρούνται σημαντικές μέθοδοι για την ανίχνευση υπομικροσκοπικών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, μεγέθους <5 Mb (Pinto, 2011). Η ανάλυση DNRP έχει χρησιμοποιηθεί σε μια προσπάθεια να συσχετιστεί ο φαινότυπος με τον γονότυπο.

Επί του παρόντος, η πλειονότητα των περιπτώσεων ΣW εντοπίζεται μέσω διερεύνησης και ελέγχου που γίνεται για αναπτυξιακή καθυστέρηση, όπως με την πλειοψηφία των ασθενών που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο ιατρικής γενετικής του ΕΚΠΑ. Ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις δεν έχουν το τυπικό έλλειμμα που φαίνεται στο ΣW και έχουν διαφορετικούς φαινοτύπους που μπορεί να στερούνται ορισμένων από τα πιο καθοριστικά κλινικά χαρακτηριστικά του ΣW. Ο όρος ΣW προορίζεται για άτομα που έχουν τα τυπικά ελλείμματα (Morris, 2020).

Η τρέχουσα βάση για τη διάγνωση είναι η ταυτοποίηση του ελλείμματος των γονιδίων της κρίσιμης γενετικής περιοχής του συνδρόμου που περιλαμβάνει το γονίδιο της ελαστίνης. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η προέλευση των ελλειμμάτων ήταν συχνότερα μητρική (59%), σχετιζόμενη με έναν πιο σοβαρό φαινότυπο (Amenta, 2005). Παρόλο που η συμβολή της FISH παραμένει ανεκτίμητη για επιβεβαίωση της διάγνωσης, δεν επιτρέπει την εκτίμηση του μεγέθους του ελλείμματος ή της γονικής προέλευσης. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, οι τεχνικές FISH και MLPA παραμένουν σήμερα οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές εξετάσεις και ταιριάζουν καλύτερα σε έναν πρωτογενή γενετικό έλεγχο για διάγνωση ΣW, λόγω της σχετικής απλότητας και της χρονικής τους αποτελεσματικότητας (Dutra, 2012; Hussein, 2016; Manning, 2010; Sharma, 2015). Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η MLPA μπόρεσε να επιβεβαιώσει τη διάγνωση του ΣW σε ασθενείς με τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά με αρνητικά αποτελέσματα FISH (Honjo, 2015).

Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα μιας μελέτης, εξετάζοντας την αποτελεσματικότητα της ανάλυσης MLPA, έδειξαν πλήρη αντιστοιχία με αυτά της FISH σε 12 ασθενείς με σύνδρομα μικροελλειμμάτων (τρεις με σύνδρομο DiGeorge, τέσσερις με σύνδρομο Williams, τέσσερις με σύνδρομο Prader-Willi και ένας με σύνδρομο Miller-Dieker). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι

ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση της MLPA είναι μια ακριβής, αξιόπιστη και οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση έναντι της FISH κατά τον έλεγχο των συνδρόμων μικροελλειμμάτων (Eun, 2009). Η τεχνική MLPA είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη διάγνωση του ΣW, καθώς έχει επίσης αποδειχθεί χρήσιμη στον προγεννητικό έλεγχο με λήψη αμνιακού υγρού για σύνδρομα μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών και διάγνωση τρισωμιών.

Ωστόσο, σε σύγκριση με τις τεχνικές FISH και MLPA, η CMA είναι κατάλληλη για τον εντοπισμό τυπικών/ άτυπων CNVs και τον προσδιορισμό του τελικού σημείου θραύσης για το κλασσικό ή μη έλλειμμα του ΣW, λόγω της υψηλής ανάλυσης και της υψηλής ακρίβειας ελέγχου σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Αν και δεν είναι ακόμη ανταγωνιστική ως προς το κόστος, προσφέρει πλεονεκτήματα σε περιπτώσεις όπου η κλινική εντύπωση δεν είναι σαφώς ταυτισμένη με το ΣW ή εάν ο ασθενής έχει άτυπο έλλειμμα (Rober, 2010). Οι τεχνικές των μικροδορυφορικών δεικτών και MLPA είναι αποτελεσματικές στην ανίχνευση του ελλείμματος στο ΣW και στην επιβεβαίωση της διάγνωσής του καθώς παρέχουν μια χρήσιμη διαγνωστική στρατηγική κυρίως για αναπτυσσόμενες χώρες λόγω χαμηλότερου κόστους σε σύγκριση με FISH (Dutra, 2012).

Παρά την αξιοσημείωτη διαγνωστική αντιστοιχία των τεχνικών FISH και CMA, καθώς και τη μεγαλύτερη ανάλυση και πληροφορίες που παρέχονται από την δεύτερη, η FISH παραμένει η πιο εφικτή και οικονομική διαγνωστική προσέγγιση. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει γενετική εξέταση που να προβλέπει τη σοβαρότητα του φαινοτύπου του συνδρόμου Williams σε έναν συγκεκριμένο ασθενή.

Η παρατήρηση ασθενών, που παρουσίασαν άτυπους φαινοτύπους και παρόμοια μεγέθη ελλειμμάτων υποδηλώνει ότι οι φαινοτυπικές παραλλαγές του ΣW επηρεάζονται όχι μόνο από το μέγεθος του ελλείμματος και τα γονίδια που περιλαμβάνει, αλλά και από τα σημεία θραύσης και πιθανώς την επίδραση επιγενετικών παραγόντων (Meng, 1998; Ghaffari, 2018). Για να κατανοήσουμε τη συμβολή άλλων παραγόντων στην εμφάνιση του ΣW, απαιτείται περαιτέρω γενετική ανάλυση ή επιγενετικές μελέτες του προφίλ μεθυλίωσης. Ο φαινότυπος του ΣW μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τη θέση των γονιδίων που πλαισιώνουν το έλλειμμα. Η επίδραση αποτύπωσης στο μη διαγεγραμμένο χρωμόσωμα 7 είναι ένας άλλος γενετικός μηχανισμός που μπορεί να επηρεάσει τον φαινότυπο του ΣW και πρέπει να ελεγχθεί σε μελλοντικές μελέτες.

Ο επαναλαμβανόμενος χαρακτήρας ορισμένων αλληλουχιών και η ομαδοποίησή τους εντός ενός σχετικά μικρού χρωμοσωμικού διαστήματος παρέχει έναν υποθετικό μηχανισμό που προδιαθέτει σε άτυπα γεγονότα ανασυνδυασμού ή αντιγραφής, είτε μέσω άνισης διασταύρωσης ή ενδοχρωμοσωμικής αναδιάταξης και μπορεί να οδηγήσουν συχνότερα σε *de novo* ελλείμματα σε αυτές τις περιοχές. Οι στατιστικά σημαντικές μετρήσεις ύψους, βάρους και περιφέρειας κεφαλής των παιδιατρικών ασθενών μεταξύ των μητρικών και πατρικών προερχόμενων ελλειμμάτων θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα είτε: 1) μητρικών ελλειμμάτων που μπορεί να έχουν ελαφρώς μεγαλύτερες διαστάσεις από τα πατρικά, επηρεάζοντας πρόσθετο(α) γονίδιο(α) που εμπλέκονται

στον έλεγχο της ανάπτυξης ή 2) ένα ή περισσότερα γονίδια, που τροποποιούνται από το έλλειμμα και μπορεί να αποτυπωθούν με μειωμένη ή κατηργηθείσα έκφραση του πατρικού αλληλίου, ή έλλειμμα του μητρικού ομολόγου(ων) που θα οδηγούσε σε πλήρη ή σχεδόν πλήρη αποσιώπηση των γονιδίων προκαλώντας καθυστέρηση στην ανάπτυξη, δείχνοντας μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο.

Το SW είναι μια πολυσυστηματική διαταραχή και επομένως απαιτεί διεπιστημονική φροντίδα και ειδική παρακολούθηση για την πρόληψη επιπλοκών. Η αξιολόγηση και η μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών με SW από διάφορες ιατρικές ειδικότητες με πολυεπιστημονική προσέγγιση και συντονισμό από τον ιατρό πρωτοβάθμιας περίθαλψης, έχει μεγάλη σημασία λόγω του σχετικά υψηλού επιπολασμού των πολλαπλών εκδηλώσεων και επιπλοκών στα διάφορα συστήματα. Οι υγιείς γονείς δεν φέρουν το έλλειμμα, το οποίο συμβαίνει αυτόματα κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των γαμετών και έτσι η πιθανότητα να αποκτήσουν ένα δεύτερο παιδί με SW είναι πολύ μικρότερη από 5%. Η διεισδυτικότητα του SW είναι πλήρης, η έκφραση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όμως ποικίλλει.

Συμπερασματικά, τα σύνδρομα μικροελλειμμάτων όπως το SW προσφέρουν σημαντική ευκαιρία για μελέτη συσχετίσεων γονότυπου - φαινότυπου που αποτελούν πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα, ταυτοποίηση των γονιδίων στην περιοχή του ελλείματος που μπορεί να εμπλέκονται σε ειδικά χαρακτηριστικά όπως το άγχος, η γλώσσα και η συμπεριφορά καθώς και ανάπτυξη περισσότερων μεθόδων αξιολόγησης της μορφολογίας και της λειτουργίας του εγκεφάλου.

Σε όλες τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη η έγκαιρη διάγνωση και η αύξηση του ποσοστού ανίχνευσης του συνδρόμου με κατάλληλη γενετική συμβουλευτική και ευαισθητοποίηση τόσο των ιατρών όσο και του κοινού.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams GN, Schmaier AH. (2012) The Williams-Beuren syndrome—a window into genetic variants leading to the development of cardiovascular disease. *PLoS Genet*;8:e1002479.
- Amenta S, Sofocleous C, Kolialexi A, Thomaidis L, Giouroukos S, Karavitakis E et al (2005). Clinical manifestations and molecular investigation of 50 patients with Williams syndrome in the Greek population. *Pediatr Res* 57(6):789–795.
- Azubel RV (2019) Williams–Beuren syndrome in Mexican patients confirmed by FISH and assessed by aCGH. *Journal of Genetics* 98:34.
- Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska- Walasek M, Schinzel AA (1998) High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 7:887–894
- Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA. (2003) Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73:131-151.
- Beuren AJ, Aritz J, Harmjan D. (1962) Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation*;26:1235-1240.
- Buiting K, Gregor V, Brownstein BH, Mohr RM, Voiculescu I, Winterpacht A, Zabel B (1992) A putative gene family in 15q11-q13 and 16p11.2: Possible implications for Prader- Willi and Angelman syndromes. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 5457-5461
- Colleen A Morris. (2010) Introduction: Williams Syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genetics*. May 15; 154C(2): 203-208.
- Collins RT, Kaplan P, Somes GW, Rome JJ.(2010) Long-term outcomes of patients with cardiovascular abnormalities and Williams syndrome. *Am J Cardiol.*;105:874-878.
- Delio M, Pope K, Wang T, Samanich J, Haldeman-Englert C, Kaplan P. et al. (2013) Spectrum of elastin sequence variants and cardiovascular phenotypes in 49 patients with Williams– Beuren syndrome. *Am. J. Med. Gen. A.* 161, 527–533.
- Dutly F, Schinzel A (1996): Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* 5:1893–1898
- Dutra. (2012) Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Research Notes*, 5:13
- Eblovi D, Clardy C.(2016) Charles Dickens and Barnaby Rudge: the first description of Williams syndrome? *Pediatr Ann*;45:e67-e69.
- Eun HC, Bo Ya Na Park, et al (2009). Comparing Two Diagnostic Laboratory Tests for Several Microdeletions Causing Mental Retardation Syndromes: Multiplex Ligation-Dependent Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization. *Korean J Lab Med* ;29:71-6

Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock A, Leppert M, Keating M (1993). Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 5:11–16.

Foti F, Menghini D, Mandolesi L, Federico F, Vicari S, et al. (2013) Learning by Observation: Insights from Williams Syndrome. *PLoS ONE* 8(1): e53782.

Friedman WF, Roberts WC. (1966) Vitamin D and the supraaortic stenosis syndrome: the transplacental effects of vitamin D on the aorta of the rabbit. *Circulation*;34:77-86.

Ghaffari M, Tahmasebi, Birgani M, Kariminejad R, Saberi A.(2018) Genotype phenotype correlation and the size of microdeletion or microduplication of 7q11.23 region in Williams- Beuren syndrome patients. *Ann Hum Genet.* 2018;1–8.

Gagliardi C, Bonaglia MC, Selicorni A, Borgatti R, Giorda R. (2003) Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. *J Med Genet*, 40:526-530.

Halford S, Lindsay E, Nayudu M, Carey AH, Baldini A, Scambler PJ (1993) Low-copy-number repeat sequences flank the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome loci at 22q11. *Hum Mol Genet* 2:191-196

Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, et al. (2010) Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*; 154C(2):220–228.

Honjo, R. S., Dutra, R. L., Furusawa, E. A., Zanardo, E. A., Costa, L. S., Kulikowski, L. D., ... Kim, C. A. (2015). Williams-Beuren Syndrome: A clinical study of 55 Brazilian patients and the diagnostic use of MLPA. *BioMed Research International*, 903175.

Howald C, Merla G, Digilio MC, Amenta S, Lyle R, Deutsch S, Choudhury U, Bottani A, Antonarakis SE, Fryssira H, Dallapiccola B, Raymond A. (2006) Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. *J Med Genet.* Mar;43(3):266-73

Hu S, Yang Y, Liu L, Tan Z, Zhao T. (2017) High-resolution single nucleotide polymorphism arrays identified an atypical microdeletion of the Williams-Beuren syndrome interval in a patient presenting with a different phenotype. *Mol Med Rep.* 2017 May

Huang L, Sadler L, O’Riordan M, Robin NH (2002) Delay in diagnosis of Williams syndrome. *Clin Pediatr (Phila)* 41:257–261

Hussein I., Magbooli A., Huwait E., Chaudhary A., Bader R., Gari M., AlQahtani M. (2016). Genome wide array-CGH and qPCR analysis for the identification of genome defects in Williams' syndrome patients in Saudi Arabia. *Molecular Cytogenetics*, 9, 65.

Jurado L, Peoples R, Kaplan, P., Hamel, B., Francke, U. (1996). Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet*, 59, 781.

Keating MT. (1995) Genetic approaches to cardiovascular disease: supraaortic stenosis, Williams syndrome, and long-QT syndrome. *Circulation*; 92:142–147.

Kontos H, E. Manolakos, P. Malligiannis. (2008) Prenatal diagnosis of a fetus with 7q11.23 deletion detected by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening. *Prenat Diagn* 2008; 28: 556–558

Lashkari A, Smith, Graham. (1999) Williams-Beuren Syndrome: An Update and Review for the Primary Physician. *Clinical Pediatrics*, April.

Li L., Huang L., Luo Y., Huang X., Lin S., Fang Q. (2015). Differing microdeletion sizes and breakpoints in Chromosome 7q11.23 in Williams-Beuren Syndrome detected by chromosomal microarray analysis. *Molecular Syndromology*, 6(6), 268–275.

Lowery MC, Morris CA, Ewart A, et al. (1995) Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am J Hum Genet*; 57:49–53.

Luis A. Perez Jurado, Risa Peoples, Paige Kaplan, Ben C. J. Hamel, Uta Francke. (1996) Molecular Definition of the Chromosome 7 Deletion in Williams Syndrome and Parent-of-Origin Effects on Growth. *Am. J. Hum. Genet.* 59:781-792, 1996.

Manning, M., & Professional, H. L. (2010). Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine*, 12, 742–745.

Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa H, Trask BJ, Morris CA, Keating MT. (1998) Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet* 103:590–599

Metcalf K., Rucka A. K., Smoot L., Hofstadler G., Tuzler G., McKeown P. et al. (2000) Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 955–963.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.

Morris CA. (2010). Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 154C:203–208.

Morris CA, Braddock SR, AAP council on genetics. (2020) Health Care Supervision for Children With Williams Syndrome. *Pediatrics*;145(2):e20193761.

Morris CA, Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, et al. (1999) Williams Syndrome. *GeneReviews* WBSTM; 1993-2013.

OMIM ENTRY - # 194050-WILLIAMS-BEUREN SYNDROME; WBS

Ouchanov L, González PJ, Manghi ER, Bondy P, et al. (2007) An atypical deletion of the Williams Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet* 44: 136–143.

Peoples R, Franke Y, Wang YK, Pérez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Francke U. (2000) A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome–deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet*, 66:47-68

Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, et al. (2011) Comprehensive assessment of arraybased platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol* 29: 512-520.

Pober BR, Mark Johnson, Zsolt Urban. (2008) Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J Clin Invest*; 118(5).

Pober BR (2010). Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*;362(3):239-252.

Ramírez Velazco A. and Domínguez Quezada M. G. (2017) Atypical deletions in Williams–Beuren syndrome. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 55, 615–620.

Savina, N. V., Smal, M. P., Kuzhir, T. D., Egorova, T. M., Khurs, O. M., Polityko, A. D., & Goncharova, R. I. (2011). Chromosomal instability at the 7q11.23 region impacts on DNA-damage response in lymphocytes from Williams-Beuren syndrome patients. *Mutation Research*, 724, 46–51.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):e57.

Schubert, C. (2009). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mole Life Sci*, 66, 1178–1197.

Sharma, P., Gupta, N., Chowdhury, M. R., Phadke, S. R., Sapra, S., Halder, A., Kabra, M. (2015). Williams-Beuren Syndrome: Experience of 43 patients and a report of an atypical case from a tertiary care center in India. *Cytogenetic and Genome Research*, 146(3), 187–194.

Sinnott P, Collier S, Costigan C, Dyer PA, Harris R (1990) Genesis by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2107-2111.

Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. (2002) Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* ;17:269-271.

Tassabehji M. (2003) Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 12:R229–R237

Theodosiou AM, Morrison KE, Nesbit AM, Daniels RJ, Campbell L, Francis MJ, Christodoulou Z, et al (1994) Complex repetitive arrangements of gene sequence in the candidate region of the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Am J Hum Genet* 55:1209-1217

Twite M., Scott Stenquist, Richard J. Ing. (2019) Williams syndrome. *Paediatr Anaesth.* May;29(5):483-490

van Hagen JM, Eussen HJ, van Schooten R, et al. (2007) Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams Syndrome - GeneReviews® - NCBI Bookshelf.

Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test* 11: 321–327.

Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. (1961) Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*; 24:1311-1318.

Yen PH, Li XM, Tsai SP, Johnson C, Mohandas T, Shapiro LJ (1990) Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell* 61:603-610

Yu Xia, Shufang Huang, Yueheng Wu, Yongchao Yang, Shaoxian Chen, Ping Li, Jian Zhuang. (2018) Clinical application of chromosomal microarray analysis for the diagnosis of Williams–Beuren syndrome in Chinese Han patients. *Mol Genet Genomic Med*;1–8.