

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Origen i recurrència de trastorns genòmics causats per delecions cromosòmiques

Òscar Molina Campoy

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, 2011

Directors:

Dra. Francesca Vidal Domínguez i Dr. Joan Blanco Rodríguez

La **Dra. Francesca Vidal Domínguez**, catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i el **Dr. Joan Blanco Rodríguez**, professor agregat del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN:

Que **Òscar Molina Campoy** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Origen i recurrència de trastorns genòmics causats per delecions cromosòmiques**" per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè així consti signen el present certificat.

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Bellaterra, 28 d'octubre de 2011.

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología, (DGI) SAF2010-22241
- Generalitat de Catalunya, SGR2009-0282
- Universitat Autònoma de Barcelona, Projecte 180034

Òscar Molina Campoy s'ha beneficiat d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF/2007) concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona i d'un ajut d'aquesta mateixa institució per realitzar una estada a l'estranger (ESTPIF2010-42).

Les mostres analitzades s'han obtingut en col·laboració amb les següents entitats:

- Associació Catalana Síndrome de Prader-Willi
- Asociación Madrileña para el Síndrome de Prader-Willi
- Asociación Síndrome de Williams España
- Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí
- Hospital Sant Joan de Déu

*Als meus pares,
per donar-me totes les respostes*

31

38

46

on D

Passatge de la Sonatina N°1 en Re Major de Franz Schubert (Op. 137)

ÍNDEX

1.INTRODUCCIÓ	1
1.1. VARIACIÓ ESTRUCTURAL DEL GENOMA HUMÀ	3
1.2. EFECTES DE LA VARIACIÓ ESTRUCTURAL	5
1.3. ARQUITECTURA GENÒMICA DE LES REGIONS SUSCEPTIBLES A TRASTORNS GENÒMICS RECURRENTS	8
1.4. RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA AL·LÈLICA I NO-AL·LÈLICA	9
1.5. REGIONS CROMOSÒMIQUES SUSCEPTIBLES A TRASTORNS GENÒMICS	13
1.5.1. REGIÓ 15q11-q13	13
1.5.2. SUB-BANDA 7q11.23	15
1.5.3. SUB-BANDA 22q11.2	17
1.6. HAPLOTIPS DE PREDISPOSICIÓ A LA RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA NO AL·LÈLICA	19
1.6.1. INVERSIONS	19
1.6.2. VARIACIÓ ESTRUCTURAL DELS LCR FLANQUEJANTS	21
1.7. DETERMINACIÓ DEL RISC DE TRANSMISSIÓ DE TRASTORNS GENÒMICS	22
1.7.1. ESTUDIS DE RECURRÈNCIA FAMILAR	22
1.7.2. ESTUDIS EN GÀMETES	23
2. OBJECTIUS	25
3. MATERIAL I MÈTODES	29
3.1. FISH EN ESPERMATOZOIDES	31
3.1.1. POBLACIÓ D'ESTUDI	31
3.1.2. PROCESSAMENT I EMMAGATZEMATGE	33
3.1.3. HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (FISH)	33
3.1.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA I CRITERIS DE VALORACIÓ	40
3.1.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA	43
3.2. ANÀLISI DE MICROSATÈL·LITS	45
3.2.1. POBLACIÓ D'ESTUDI	45
3.2.2. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC DE LES MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA	46
3.2.3. AMPLIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES MICROSATÈL·LIT PER PCR	47

3.2.4. ANÀLISI DE LES MOSTRES	50
3.3. FISH SOBRE FIBRES DE CROMATINA (FIBER-FISH)	51
3.3.1. LÍNIES CEL·LULARS LIMFOBLASTOIDES	51
3.3.2. ESTIRAMENT DE LES FIBRES DE DNA SOBRE PORTAOBJECTES	51
3.3.3. HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT	52
3.3.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA I CRITERIS DE VALORACIÓ	54
4. RESULTATS	57
<hr/>	
4.1. VALIDACIÓ DE LA METODOLOGIA	59
4.2. ANÀLISI DE LA FREQUÈNCIA DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES	60
4.2.1. POBLACIÓ CONTROL	60
4.2.2. PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER TRASTORNS GENÒMICS	64
4.2.3. FREQUÈNCIA GENERAL DE NAHR	71
4.2. EFECTE DE L'EDAT	76
4.3. ANÀLISI COMPARATIU DE LES FREQUÈNCIES DE DELECCIONS, DUPLICACIONS I INVERSIONS	76
4.3.1. REGIÓ 15q11-q13	76
4.3.2. REGIÓ 7q11.23	77
4.3.3. REGIÓ 22q11.2	77
4.4. MAPATGE DEL LCR22-2 MITJANÇANT FIBER-FISH	79
4.4.1. POSICIONAMENT DELS CLONS	79
4.4.2. ESTRUCTURA DEL LCR22-2	79
5. PUBLICACIONS	85
<hr/>	
TREBALL 1:	89
<i>Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers</i>	
Molina O, Blanco J, Vidal F	
Molecular Human Reproduction (2010): 16: 320-328	
TREBALL 2:	101

Sperm rates of 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 deletions and duplications: a FISH approach

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J
Human Genetics (2011) 129:35-44

TREBALL 3: **113**

High rates of de novo 15q11-q13 inversions in human spermatozoa

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J
Molecular Cytogenetics (en procés de revisió)

TREBALL 4 : **145**

High-resolution FISH on DNA fibers for low-copy repeats genome architecture studies

Molina O, Blanco J, Anton E, Vidal F, Volpi EV
BMC Genomics (en procés de revisió)

6. DISCUSSIÓ **175**

6.1. CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES **177**

6.1.1. ESTUDIS DE DELECCIONS I DUPLICACIONS 177

6.1.2. ESTUDIS D'INVERSIONS DE LA REGIÓ 15q11-q13 178

6.2. SUSCEPTIBILITAT A LA NAHR **178**

6.2.1. FREQUÈNCIA BASAL DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES 178

6.2.2. FREQUÈNCIA DE NAHR EN INDIVIDUS DE RISC 182

6.3. EFECTE DE L'EDAT EN LES FREQUÈNCIES DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES **186**

6.4. MECANISMES DE NAHR IMPLICATS EN LA FORMACIÓ D'ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN ESPERMATOZOIDES **187**

6.5. APLICACIÓ DE LA METODOLOGIA DE FIBER-FISH PER L'ANÀLISI DE L'ARQUITECTURA GENÒMICA DE LCRs **189**

6.6. CONSEQÜÈNCIES CLÍNiques I CONSELL GENÈTIC **190**

7. CONCLUSIONS **191**

8. BIBLIOGRAFIA **195**

ANNEX: RESULTATS ANÀLISI DE MICROSATÈL·LITS **213**

AGRAÏMENTS **219**

1.INTRODUCCIÓ

1. 1. VARIACIÓ ESTRUCTURAL DEL GENOMA HUMÀ

El DNA és una molècula fràgil susceptible a trencaments de doble cadena (*Double Strand Breaks* – DSB). Tenint en compte la magnitud i les conseqüències dels trencaments, les cèl·lules disposen de mecanismes de reparació per mantenir la integritat del genoma. En aquest sentit, s'han descrit diferents sistemes de reparació que, a més de reparar el dany, sovint generen variació estructural (Figura 1.1):

- Recombinació homòloga (*Homologous Recombination* – HR): utilitza una cadena de DNA complementària com a motlle per reparar el dany i per aquest motiu es considera un sistema de reparació “lliure d’error”. Malgrat això, el genoma presenta un elevat número de seqüències paràlogues que poden generar variacions estructurals per recombinació homòloga no al·lèlica (*Non-Allelic Homologous Recombination* – NAHR).
- Reunió no homòloga d’extremes (*Non-Homologous End Joining* – NHEJ): uneix els extrems trencats sense requeriment d’homologia o utilitzant petites seqüències homòlogues d’entre 5 i 25 parells de base (*Microhomology Mediated End Joining* – MMEJ). En qualsevol cas implica la pèrdua de material genètic.
- Aturada de la forca de replicació i canvi de motlle (*Fork Stalling and Template Switching* – FoSTeS): produïda per una aturada de la replicació i la unió amb una altra forca de replicació propera mitjançant microhomologia a l’extrem 3’ per reiniciar la replicació. Aquest és un mecanisme de reparació lligat a la pèrdua o guany de material.

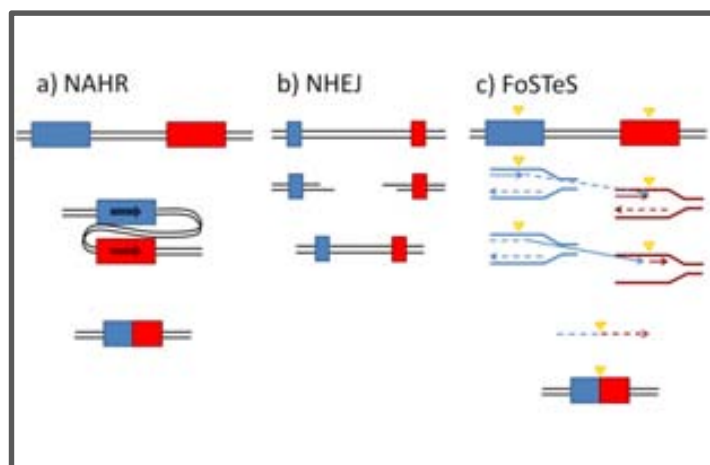


FIGURA 1.1: Mecanismes que poden produir variacions estructurals del genoma humà. **a)** Recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR); **b)** Unió d’extremes no homòlegs (NHEJ); **c)** Aturada de la forca de replicació i canvi de motlle (FoSTes) (adaptat de Zhang et al. 2009).

1. INTRODUCCIÓ

L'activitat d'aquests sistemes de reparació pot generar variacions estructurals ja sigui per la ineficàcia en la detecció del dany, per un funcionament erroni dels sistemes de reparació o bé pel funcionament normal dels mecanismes anomenats "propensos a error". Com a conseqüència, el genoma humà és una estructura dinàmica que presenta un elevat grau de variabilitat entre individus (Feuk et al. 2006).

El constant avenç en les tècniques de citogenètica i genètica molecular ha permès la identificació d'un elevat número de variacions estructurals. Des de variacions que impliquen grans segments cromosòmics fins a petites variacions de menys d'una kilobase (Taula 1.1).

	<i>t</i>	<i>inv</i>	CNV (>50 Kb)	CNV (1-50 Kb)	Variants <1Kb
Rastreig del genoma complet					
Cariotip	Si (>3Mb)	Si (>3Mb)	Si (>3Mb)	No	No
	BACs	No	No	Si (>50 Kb)	No
Array de CGH	Oligonucleòtids	No	No	Si (>35 Kb)	Si (>35 Kb)
	SNPs	No	No	Si	Si (SNPs)
Comparació de seqüències	Si	Si	Si	Si	Si
Seqüenciació d'extrems aparellats	Si	Si (PT)	Si (>8 Kb del)	Si (>8 Kb del; <40 Kb dup)	No
Tècniques dirigides					
Genotipatge de microsatèl·lits	No	No	Si (del)	Si (del)	Si
MAPH	No	No	Si	Si	Si
MLPA	No	No	Si	Si	Si
QMPSF	No	No	Si	Si	Si
RT qPCR	No	No	Si	Si	Si
FISH	Si	Si	Si	Si	No
Southern blot	Si	Si	Si	Si	Si

t (translocacions); *inv* (inversions); *CNV* (Variacions del número de còpies); *SNP* (Polimorfismes d'un sol nucleòtid); *PT* (punt de trencament).

TAULA 1.1: Metodologies utilitzades per la detecció de la variabilitat estructural del genoma humà (adaptat de Feuk et al. 2006).

Les variacions estructurals es classifiquen en dos grans grups: microscòpiques i submicroscòpiques (Feuk et al. 2006; Sharp et al. 2006b). Ambdós grups poden contenir tant variants cromosòmiques (canvis cromosòmics en equilibri que no produeixen efectes fenotípics) com anomalies cromosòmiques (canvis en la quantitat de material genètic amb repercussions en el fenotip) (Gardner i Sutherland 2004).

Les variacions estructurals microscòpiques són aquelles que presenten una mida superior a cinc Mb, possibilitant la seva identificació al microscopi mitjançant tècniques de bandeig cromosòmic. Per altra banda, les variacions estructurals submicroscòpiques presenten una mida entre 1 Kb i 5 Mb (Sharp et al. 2006a). Les variacions submicroscòpiques més ben caracteritzades són les variacions del número de còpies (*Copy Number Variations* – CNV), probablement perquè la majoria de tècniques emprades en l'anàlisi de la variabilitat estructural del genoma es basen en la detecció de guanys i pèrdues (Zhang et al. 2009). En aquest sentit, s'ha suggerit que fins a un 12% del genoma humà estaria subjecte a CNV (Eichler et al. 2007), representant la font principal de variació estructural. A mode d'exemple, si tenim en compte les freqüències de mutació puntual ($1.8-1.25 \times 10^{-8}$ per parell de base i generació) i les comparem amb la freqüència de CNV (estimada entre 1.7×10^{-6} i 1×10^{-4} per locus i generació) s'observa que aquestes últimes són entre 100 i 10000 vegades més freqüents (Zhang et al. 2009). A més, mentre que les taxes de mutació puntual són constants arreu del genoma, les freqüències de CNV varien àmpliament en funció de les regions cromosòmiques, reflectint que les regions presenten diferents susceptibilitats a patir CNV (Bailey et al. 2002; Zhang et al. 2009).

1.2. EFECTES DE LA VARIACIÓ ESTRUCTURAL

Les variacions estructurals poden produir canvis en l'expressió gènica mitjançant diferents mecanismes (Feuk et al. 2006):

- Alteració de l'expressió de gens sensibles a dosi.
- Exposició d'al·lels recessius.
- Generació de productes truncats degut al trencament de gens o mitjançant la fusió entre dos gens com a conseqüència d'una reorganització cromosòmica.
- Efectes de posició que poden afectar la relació dels gens amb els seus elements reguladors.

Els efectes fenotípics dels canvis en l'expressió gènica que es deriven de les variacions estructurals condicionen la freqüència d'aquestes en la població. En general, la freqüència d'un tipus de variant a la població disminueix a mesura que els efectes fenotípics negatius s'intensifiquen (Buchanan i Scherer 2008) (Figura 1.2).

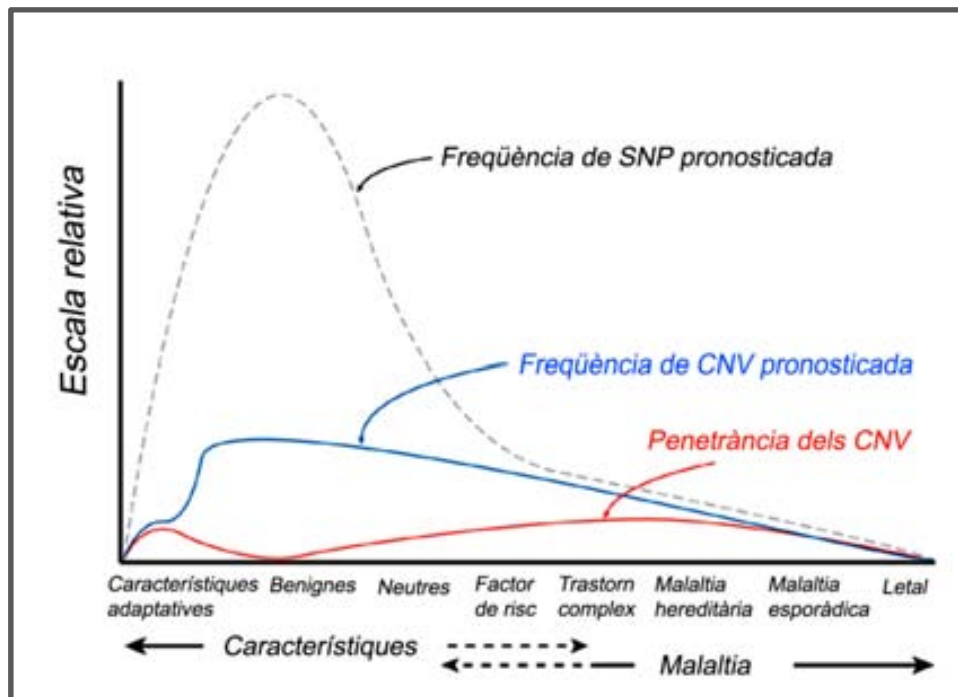


FIGURA 1.2: Característiques i freqüència de les variants del nombre de còpia (CNV) (Adaptat de Buchanan i Scherer, 2008).

Les variacions estructurals han jugat un paper important en els processos d'especiació (Coghlan et al. 2005; Perry et al. 2008). A més, s'han descrit variacions estructurals en algunes poblacions humanes, especialment CNVs, que presenten efectes fenotípics benignes i confereixen algun tipus d'avantatge evolutiva (Aitman et al. 2006; Gonzalez et al. 2005; Stefansson et al. 2005). Es considera que les variacions estructurals amb efectes fenotípics benignes o neutres són les majoritàries en la població (Buchanan i Scherer 2008).

És important tenir en compte que els efectes fenotípics de les variacions estructurals que no donen lloc a malalties es troben influenciats per les condicions ambientals (Perry et al. 2007) i les relacions que es puguin produir entre elles. Per tant, la freqüència de les diferents variacions en la població (Figura 1.2) es veurà afectada en funció d'aquests factors i serà específica per a cada població en particular.

Per altra banda, moltes variacions estructurals presenten efectes fenotípics deleteris. S'ha suggerit que algunes podrien ser factors de risc de certes malalties (Inkster et al. 2010) o produir efectes negatius sobre trastorns complexos, com les alteracions del comportament o la obesitat (Sebat et al. 2007; Sha et al. 2009). A més, algunes també s'han relacionat directament amb malalties humanes anomenades trastorns genòmics, que poden ser heretats o esporàdics (Gu et al. 2008; Lupski 1998).

TRASTORNS GENÒMICS

Els trastorns genòmics són un grup de malalties genètiques causades per reorganitzacions de segments de DNA de més d'una kilobase que resulten de la inestabilitat del genoma en regions que presenten una arquitectura particular (Inoue i Lupski 2002; Lupski 1998). Les reorganitzacions de DNA associades a trastorns genòmics consisteixen majoritàriament en delecions i duplicacions que es produeixen per l'actuació dels mecanismes de reparació de DSBs, principalment per NAHR (apartat 1.1)(Taula 1.2). Es distingeixen dos tipus de trastorns genòmics, els que presenten la mateixa mida, amb els punts de trencament implicats en la reorganització fixes o agrupats en una posició específica, s'anomenen trastorns genòmics recurrents. Per contra, els que presenten mides diferents, amb punts de trencament variables, s'anomenen no recurrents (Gu et al. 2008).

TRASTORN GENÒMIC	INCIDÈNCIA	REGIÓ	TIPUS DE REORGANITZACIÓ	MIDA*
CMT1A	1/2500	17p11.2	duplicació	1.4 Mb
HNPP	1/2500	17p11.2	deleció	1.4 Mb
DiGeorge/Velocardiofacial	1/4000	22q11.2	deleció	3 Mb
Williams-Beuren	1/10000	7q11.23	deleció	1.5 Mb
Prader-Willi	1/15000	15q11-13	deleció	5.4 Mb
Angelman	1/15000	15q11-13	deleció	5.4 Mb
Smith-Magenis	1/20000	17p11.2	deleció	4 Mb
Potocki-Lupski	1/20000	17p11.2	duplicació	4 Mb
Cri-du-Chat	1/35000	5p15	deleció	5-40 Mb
Wolf-Hirschhorn	1/50000	4p16	deleció	2-5 Mb

*Mida majoritària de les reorganitzacions cromosòmiques

TAULA 1.2: Trastorns genòmics recurrents més freqüents.

Les noves tecnologies de citogenètica i genètica molecular, que permeten estudiar la variació estructural submicroscòpica del genoma, han permès identificar un número creixent de trastorns genòmics recurrents a mesura que s'associen alteracions concretes del fenotip a variants estructurals determinades (de Vries et al. 2005; Sharp et al. 2006b). A la taula 1.2 es mostren les característiques d'alguns dels trastorns genòmics recurrents més freqüents.

1.3. ARQUITECTURA GENÒMICA DE LES REGIONS SUSCEPTIBLES A TRASTORNS GENÒMICS RECURRENTS

Les regions implicades en trastorns genòmics recorrents es caracteritzen per la presència de duplicacions segmentals o *low-copy repeats* (LCR) que flanquegen regions de còpia única.

Els LCR es defineixen com un tipus de seqüència formada per repeticions de segments de DNA de mides entre 1 Kb i 500 Kb, posicionats en dues o més localitzacions en el genoma i amb una homologia superior al 90%. Aquests poden contenir seqüències de DNA gèniques, pseudogens o DNA repetitiu, i s'organitzen a mode de repeticions en tàndem o distribuïts en diferents posicions del genoma de forma directa o invertida (Bailey i Eichler 2006). S'ha estimat que el 5% del genoma humà està constituït per LCRs i que aquests s'han originat a partir de duplicacions produïdes durant l'evolució dels primats (Bailey et al. 2002).

La distribució dels LCRs entre els cromosomes no és homogènia (Zhang et al. 2005). El cromosoma 3 presenta la proporció més baixa (1.7%), mentre que els cromosomes 22 i Y presenten la més elevada (11.9% i 50.4% respectivament) (She et al. 2004). En general, els cromosomes que presenten una proporció més elevada són els cromosomes 7, 9, 10, 15, 16, 17, 22, X i Y (Zhang et al. 2005).

Els LCR es poden classificar en funció de la seva organització en simples i complexes. Els LCR simples estan formats per duplicacions d'un sol gen, mentre que els LCR complexes estan constituïts per repeticions de diversos gens i pseudogens organitzats en diferents orientacions (Bailey i Eichler 2006; Gu et al. 2008).

En funció de la distribució dels LCR (còpies paràlogues) en cromosomes homòlegs o no homòlegs, els LCR es classifiquen en intracromosòmics o intercromosòmics, respectivament (Emanuel i Shaikh 2001). A la vegada, en funció de la seva localització en els cromosomes diferenciem LCR pericentromèrics, subtelomèrics o intersticials (Bailey i Eichler 2006):

- **PERICENTROMÈRICS:** LCR localitzats fins a 5 Mb de distància del centròmer. La majoria són intercromosòmics amb una proporció de 6:1 (LCR intercromosòmics:LCR intracromosòmics), tot i que aquesta proporció disminueix a mesura que s'allunyen del centròmer. Presenten una homologia entre el 94% i el 97% entre les diferents còpies paràlogues.

- **SUBTELOMÈRICS:** Igual que les regions pericentromèriques, les regions subtelomèriques estàn enriquides en LCR intercromosòmics, típicament de 50-100 Kb de llargada amb una organització complexa en mosaic.
- **INTERSTICIALS:** LCR distribuïts en les zones d'euromatina localitzades entre les regions pericentromèriques i subtelomèriques. La majoria són LCR intracromosòmics que es troben separats a una distància de 3 Mb de mitjana i són els que presenten la mida i homologia més elevada (més del 98%). Aquestes característiques fan que aquest tipus de LCR siguin els principals implicats en l'etiologia dels trastorns genòmics (She et al. 2004).

Els LCR presenten seqüències de DNA susceptibles a DSB, com són les seqüències palindròmiques riques en AT, les seqüències que presenten una conformació del DNA diferent de la conformació B, els minisatèl·lits o els transposons (Babcock et al. 2003; Bacolla et al. 2008). A més, molts LCR implicats en l'aparició de trastorns genòmics presenten seqüències consens que actuen com a llocs preferents de recombinació meiótica (Myers et al. 2008). Aquestes dades indiquen que els LCR són punts calents de recombinació (Lupski 2004). L'elevada homologia que presenten entre les diferents còpies paràlogues i la sensibilitat als DSBs, fan que aquestes regions siguin especialment susceptibles a l'aparellament erroni i a la recombinació homòloga no al·lèlica.

1.4. RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA AL·LÈLICA I NO-AL·LÈLICA

El mecanisme de reparació per recombinació homòloga s'inicia amb el reconeixement del DSB per part del complex MRN. Aquest complex catalitza el reclutament de factors de senyalització del dany, de control del cicle cel·lular i de reparació del DNA (Uziel et al. 2003). Un cop senyalitzat, el DSB es pot reparar per la via de reparació homòloga o la via no homòloga (principalment NHEJ). El primer pas en la reparació dels DSBs en la via de reparació homòloga és la recessió dels extrems del DSB en sentit 5'→3' originant extrems 3'OH protuberants. A partir d'aquest punt, s'han descrit diferents vies de reparació homòloga (Helleday et al. 2007): 1) Aparellament de cadena senzilla (*Single Strand Annealing – SSA*), 2) Aparellament de cadena associat a síntesi (*Synthesis Dependent Strand Annealing – SDSA*), 3) Reparació per recombinació homòloga (HR) mitjançant el model de la doble unió de *Holliday* i 4) Replicació induïda per l'aturada de la forca de replicació (*Break Induced Replication – BIR*). En aquesta tesi ens centrarem en la HR mitjançant el model de la doble unió de *Holliday* per reparar el DSB, ja que

aquest mecanisme s'ha suggerit com el causant de les reorganitzacions cromosòmiques que produeixen els trastorns genòmics recurrents.

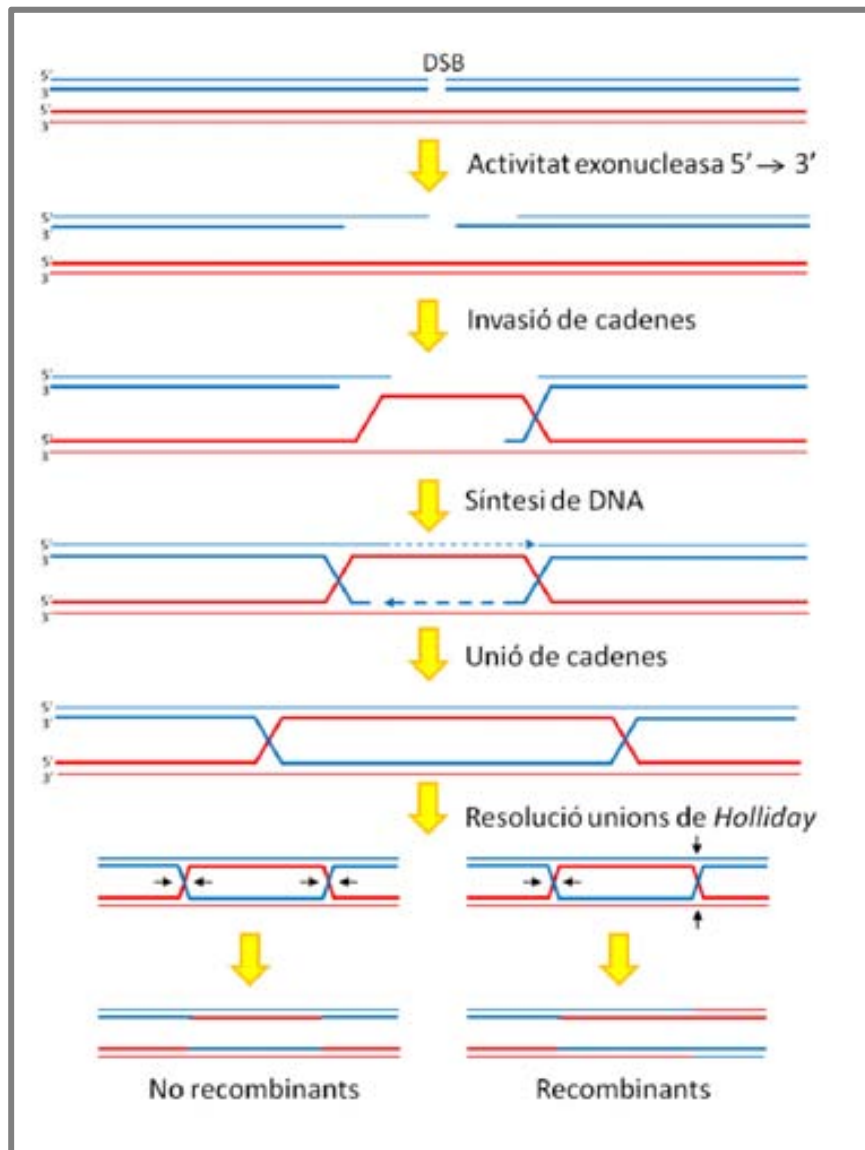


FIGURA 1.3: Esquema de la reparació de DSB per recombinació homòloga (HR) mitjançant el model de *Holliday* (adaptat de Sasaki et al. 2010).

La reparació de DSB per recombinació homòloga es basa en l'intercanvi de cadenes de DNA amb seqüències complementàries intactes (Figura 1.3). En aquest model de reparació, les proteïnes RAD51 i DMC1 reconeixen els extrems 3'OH lliures i envaeixen la cromàtide homòloga o germana (seqüència donadora) tot fent una cerca d'homologia. La invasió de cadena produeix la separació de les cadenes de la seqüència donadora generant una estructura intermediària anomenada llaç de desplaçament (*Displacement loop; D-loop*), i la síntesi de DNA utilitzant la

cadena donadora (complementària) com a motlle. La unió dels dos extrems de la cadena genera una estructura en forma de creu anomenada unió *Holliday*. El pas final consisteix en la resolució de les unions *Holliday*, que pot generar productes recombinants o no-recombinants en funció de les monocadenes de DNA implicades.

La HR requereix seqüències de DNA complementàries amb una llargada mínima entre 300 i 500 parells de bases (*Minimal Efficient Processing Segments – MEPS*) (Inoue i Lupski 2002). En aquest sentit, la presència en els LCR de llargs segments d'homologia que compleixen els requeriments mínims (més de 300 parells de bases), així com la identificació de punts calents de recombinació en la seva seqüència, fan que els LCR siguin especialment susceptibles a la recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR) entre còpies paràlogues. Aquest fenomen genera diferents anomalies o variants cromosòmiques estructurals que estan implicades en la variació estructural del genoma i a més són la causa majoritària dels trastorns genòmics recurrents (Lupski 1998) (Taula 1.2).

Els productes de la NAHR seran diferents en funció de tres variables: 1) l'orientació del LCR, 2) el número de cromàtides implicades i 3) el tipus de cromàtides implicades (cromàtides de cromosomes no homòlegs, cromàtides homòlogues o cromàtides germanes) (Figura 1.4). La NAHR entre LCR localitzats en diferents cromàtides s'anomena NAHR intercromàtide, alhora aquesta pot ser intercromosòmica si es produeix entre cromàtides homòlogues o cromàtides de dos cromosomes no-homòlegs, o intracromosòmica si es produeix entre cromàtides germanes. Per altra banda, si la NAHR es produeix per l'autoaparellament de LCR que es troben en la mateixa cromàtide rep el nom de NAHR intracromàtide.

Si la NAHR entre LCR orientats de forma directa té lloc entre LCRs presents en cromàtides homòlogues o cromàtides germanes es generaran delecions i duplicacions complementàries. Per altra banda, quan la NAHR té lloc entre LCR presents en dues cromàtides de cromosomes no homòlegs el producte resultant seran translocacions. La NAHR també es pot donar entre LCR orientats de forma directa presents en la mateixa cromàtide, aquesta situació generarà com a resultat delecions i anells acèntrics. La NAHR entre LCR orientats de forma indirecta es pot donar entre LCR presents en dues cromàtides homòlogues, generant cromosomes dicèntrics i fragments acèntrics portadors de delecions i duplicacions, o entre LCR presents en cromàtides no-homòlogues, generant translocacions dicèntriques i acèntriques. Si la NAHR es produeix entre LCR orientats de forma indirecta que es troben en la mateixa cromàtide, el producte resultant seran inversions.

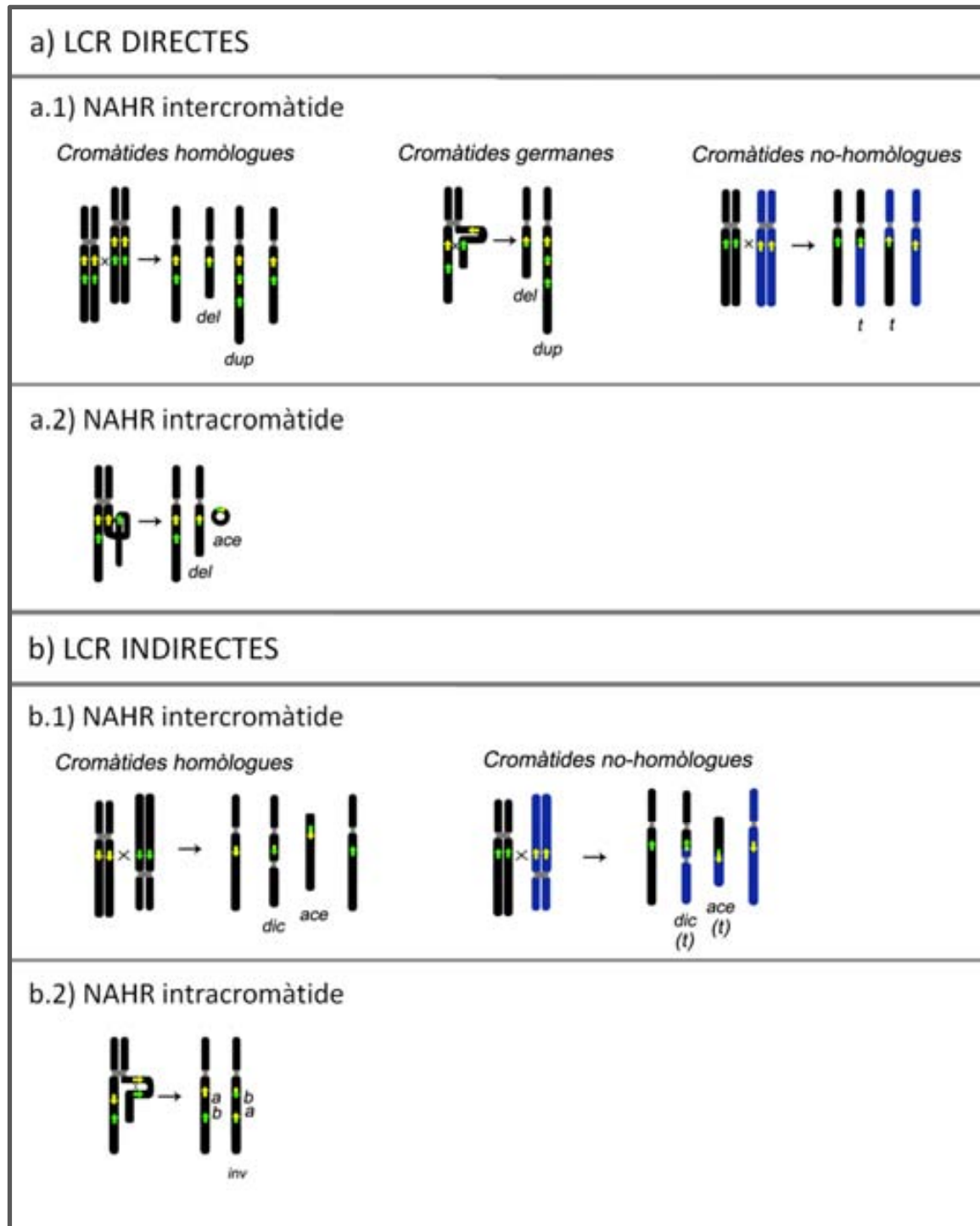


FIGURA 1.4: Productes resultants de la NAHR en funció de l'orientació dels LCR i del nombre i tipus de cromàtides implicades (adaptat de Gu et al. 2008).

La NAHR es pot produir durant la meiosi (Sasaki et al. 2010) o durant la mitosi (Alkalay et al. 2011; Bruder et al. 2008; Flores et al. 2007; Roehl et al. 2010). La NAHR a meiosi genera gàmetes portadors de reorganitzacions cromosòmiques que, en cas de fecundar, originaria individus

portadors d'alteracions (Baumer et al. 1998). La NAHR produïda a mitosi genera individus mosaics per reorganitzacions cromosòmiques (Messiaen et al. 2011; Roehl et al. 2010).

1.5. REGIONS CROMOSÒMIQUES SUSCEPTIBLES A TRASTORNS GENÒMICS

1.5.1. REGIÓ 15q11-q13

La regió 15q11-q13 es troba flanquejada per tres LCR (LCR15-1, LCR15-2, LCR15-3) (Figura 1.5).

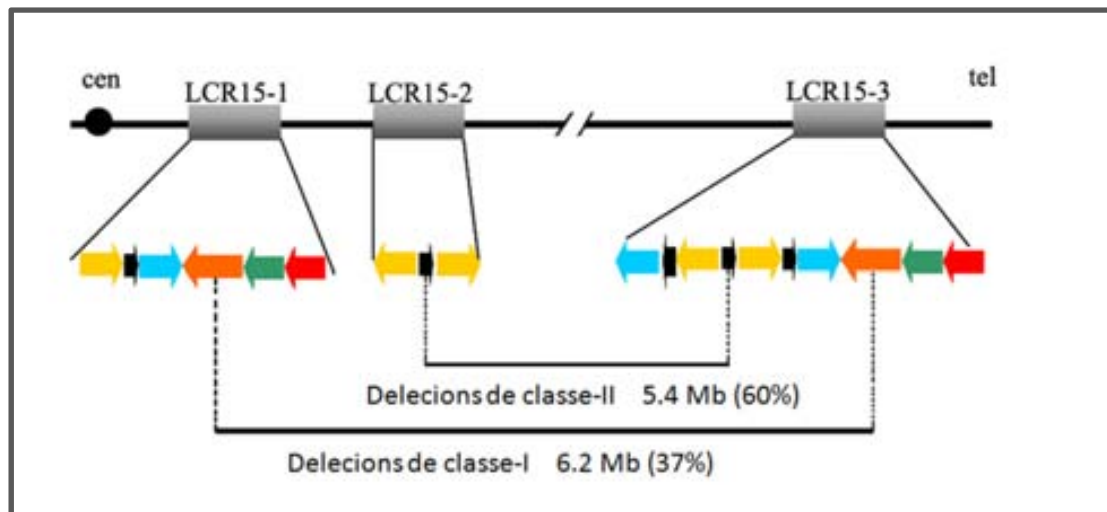


FIGURA 1.5: Representació esquemàtica de la regió 15q11-q13. Les fletxes de colors representen diferents duplicons del gen/pseudogen *HERC2* (adaptat de Makoff i Flomen, 2008).

Els LCR de la regió 15q11-q13 mesuren entre 400-500 Kb i presenten una homologia superior al 99%. Aquests estan formats per duplicacions i altres reorganitzacions del gen *HERC2* (NCBI 8924) així com altres gens i pseudogens com *GABRA5* (NCBI 2558) (Makoff i Flomen 2008). Aquests LCR s'anomenen *END-repeats* (Amos-Landgraf et al. 1999; Ji et al. 2000) i presenten una organització complexa, amb variacions en el número de còpies i orientació dels diversos segments del gen *HERC2* duplicats. Els LCR15 es troben flanquejant una regió que conté gens de còpia única, alguns dels quals es troben regulats per impressió genètica. Els més rellevants per la seva implicació en el fenotip dels trastorns genòmics són *SNRPN* (NCBI: 6638) i *UBE3A* (NCBI: 7337). El gen *SNRPN* (*Small Nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) és d'expressió paterna i està implicat en el processament de pre-RNAs missatgers. El gen *UBE3A* (ligasa unida a

ubiquitina 3A) és d'expressió materna i està implicat en la eliminació de proteïnes durant el desenvolupament del sistema nerviós central.

REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES DE LA REGIÓ 15q11-q13

DELECCIONS

S'han descrit dos tipus de delecions en funció del LCR proximal implicat en el trencament (Figura 1.5). Les delecions de classe I presenten un trencament proximal a LCR15-1 mentre que les delecions de classe II el tenen a LCR15-2. Tant en les delecions de classe I com les de classe II el punt de trencament distal es troba majoritàriament (97%) a LCR15-3. Les delecions de classe I mesuren 6.4 Mb i representen el 37% de les delecions de la regió 15q11-q13 descrites, mentre que les delecions de classe II mesuren 5.4 Mb i són les delecions més freqüents (60%) (Amos-Landgraf et al. 1999; Butler et al. 2008). A més, s'han descrit delecions minoritàries amb punts de trencament localitzats en altres LCR15 (3%) (Calounova et al. 2008; Doornbos et al. 2009).

Les delecions de la regió 15q11-q13 no tenen un origen parental preferent. Tot i això, si que s'han descrit diferències en el mecanisme de formació. Les delecions d'origen matern són majoritàriament produïdes per NAHR intercromosòmica (intercromàtide) mentre que les delecions paternes tendeixen a formar-se per NAHR intracromosòmica (intercromàtide o intracromàtide) (Thomas et al. 2006).

La delecio en heterozigosi de la regió 15q11-q13 és la causa majoritària de l'aparició de la síndrome de Prader-Willi (SPW; OMIM 176270) i Angelman (SA; OMIM 105830). Les delecions paternes originen la SPW mentre que les delecions d'origen matern originen la SA. Ambdues síndromes presenten una incidència aproximada de 1/15000 naixements (Cassidy et al. 2000).

DUPLICACIONS

S'han descrit duplicacions de la regió 15q11-q13 que comparteixen els mateixos punts de trencament que les delecions. Els efectes fenotípics de les duplicacions de la regió 15q11-q13 varien en funció de l'origen parental. Els individus portadors de duplicacions d'origen matern mostren fenotips patològics, mentre que les duplicacions paternes no presenten efectes fenotípics aparents (Repetto et al. 1998; Roberts et al. 2002). Aquesta situació podria explicar l'excés de portadors de duplicacions d'origen matern respecte les paternes. Tot i això, degut al baix número de casos descrits, encara no s'ha establert la incidència poblacional de duplicacions de la regió 15q11-q13.

Pel que fa al mecanisme de NAHR implicat, aquestes només es poden explicar mitjançant la NAHR intercromàtide. S'han descrit aproximadament els mateixos casos de duplicacions produïts per NAHR intercromosòmica i NAHR intracromosòmica (intercromàtide) (Thomas et al. 2006).

INVERSIONS

S'ha descrit la presència d'inversions de la regió 15q11-q13 (Gimelli et al. 2003). Els punts de trencament es troben en segments invertits dels LCR15-2 i LCR15-3 (Makoff i Flomen 2008) i generen la inversió del segment implicat en les delecions de classe II mitjançant NAHR intracromàtide. No s'han descrit efectes fenotípics i la incidència de portadors d'aquesta reorganització en heterozigosi s'ha establert en un 9% en la població general (Gimelli et al. 2003).

ALTRES REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

La regió 15q11-q13 es troba implicada en altres reorganitzacions cromosòmiques com cromosomes marcadors supernumeraris (Dennis et al. 2006), triplicacions (Ungaro et al. 2001), isodicèntrics (Battaglia 2005) o disomies uniparentals parcials (Gregory et al. 1991; Salavoura et al. 2008), entre d'altres.

1.5.2. SUB-BANDA 7q11.23

La regió 7q11.23 es troba flanquejada per tres LCR que mesuren al voltant de 320 Kb. Aquests presenten una elevada homologia (>98%) i flanquegen una regió d'aproximadament 2 Mb que conté gens de còpia única (Figura 1.6). Els diferents LCR es troben organitzats en diferents blocs d'homologia (A, B i C) que contenen diferents gens i pseudogens duplicats com a resultat de reorganitzacions evolutives (Antonell et al. 2005). Els blocs A contenen els gens *STAG3* i *PMS2* (NCBI 10734 i 5395), els blocs B contenen els gens *NCF1*, *GTF2I* i *GTF2IRD2* (NCBI 608512, 2969 i 84163) i els blocs C estan constituïts pels gens *POM121* i *TRIM50* (NCBI 9883 i 135892). Alhora, aquests LCR s'anomenen en funció de la seva posició com centromèric (c), medial (m) i telomèric (t) (Antonell et al. 2005; Bayes et al. 2003). S'ha descrit una homologia variable entre els diferents blocs respecte les seves còpies paràlogues. Els blocs que presenten homologies més elevades són els blocs A (98.2%) i els blocs B (99.6%), per aquest motiu estan implicats en la gran majoria (99%) de reorganitzacions cromosòmiques de la regió 7q11.23 (Merla et al. 2010).

1. INTRODUCCIÓ

Entre d'altres gens de còpia única, el gen de l'elastina (*ELN*; NCBI: 2006) es troba directament relacionat amb el fenotip dels portadors de reorganitzacions de la regió 7q11.23. Aquest gen participa en la formació de les fibres elàstiques del teixit connectiu (Merla et al. 2010).

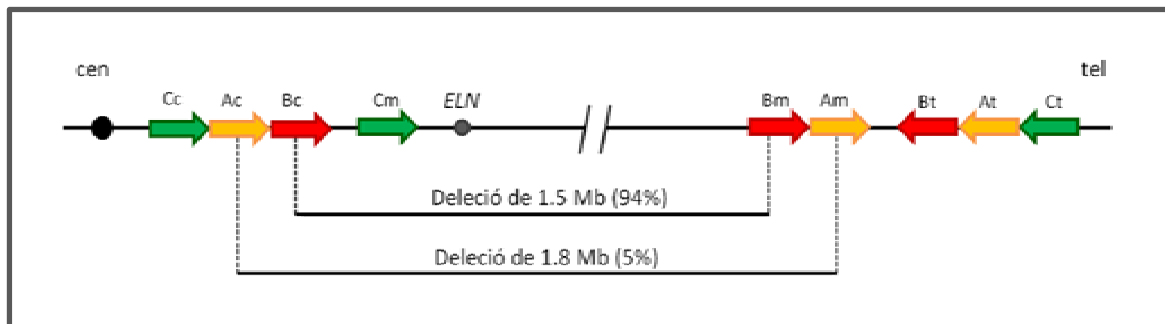


FIGURA 1.6: Representació esquemàtica de la regió 7q11.23. Les fletxes de colors representen els diferents blocs que formen els LCRs flanquejants (adaptat d'Antonell et al. 2005).

REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES DE LA REGIÓ 7q11.23

DELECCIONS

La gran majoria de deleccions de la regió 7q11.23 tenen els punts de trencament als LCR Bc i Bm, generant deleccions de 1.5 Mb (94%). A més s'han identificat deleccions minoritàries de 1.8 Mb (5%) causades per NAHR entre els blocs Ac i Am (Bayes et al. 2003; Schubert 2009) (Figura 1.6). No s'ha trobat un origen parental preferent per les deleccions de la regió 7q11.23 (Bayes et al. 2003; Thomas et al. 2006). Per altra banda, s'ha descrit que el mecanisme de formació preferent és la NAHR intercromosòmica (intercromàtide) (Baumer et al. 1998; Bayes et al. 2003; Thomas et al. 2006; Urban et al. 1996).

Les deleccions de la regió 7q11.23 són la causa majoritària de la síndrome de Williams-Beuren (SWB; OMIM: 194050). La SWB és un trastorn genòmic amb una incidència entre 1/7000 i 1/20000 naixements.

DUPLICACIONS

Les duplicacions de la regió 7q11.23 són el producte complementari de les deleccions causants de la SWB, totes elles impliquen la duplicació d'un segment de 1.4-1.5 Mb produïdes per NAHR intercromàtide (Van der Aa et al. 2009). La incidència poblacional d'aquestes duplicacions s'ha estimat entre 1/13000 i 1/20000 nascuts (Van der Aa et al. 2009).

Les duplicacions de la regió 7q11.23 confereixen un fenotip molt més lleu que les seves delecions complementàries (Depienne et al. 2007; Somerville et al. 2005; Van der Aa et al. 2009). De fet, com les duplicacions d'altres regions, la majoria d'aquestes duplicacions detectades no són *de novo*, si no heretades d'un dels progenitors sense efectes fenotípics aparents (Van der Aa et al. 2009).

INVERSIONS

Les inversions de la regió 7q11.23 varen ser les primeres inversions descrites en regions implicades en trastorns genòmics (Osborne et al. 2001). Aquestes inversions emfasitzaven l'elevada inestabilitat de la regió 7q11.23 i la possibilitat que altres regions amb arquitectura genòmica similar presentessin un comportament semblant.

Els punts de trencament de les inversions de la regió 7q11.23 es troben als LCRs centromèric i telomèric, els quals presenten una orientació indirecte. Aquests punts de trencament són molt variables dins dels LCRs i generen inversions de segments de diferents mides (entre 1.79 i 2.56 Mb) en funció del bloc que s'ha utilitzat com a substrat per la NAHR. De fet, s'han descrit inversions que presenten punts de trencament a qualsevol dels blocs que conformen els LCR (Bayes et al. 2003; Hobart et al. 2010).

La incidència de portadors d'inversions de la regió 7q11.23 en la població general s'ha establert en 5.8% (Hobart et al. 2010) i no s'han descrit efectes fenotípics aparents (Tam et al. 2008).

ALTRES REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

La regió 7q11.23 està implicada en altres anomalies cromosòmiques com triplicacions (Beunders et al. 2010), translocacions recíproques (Duba et al. 2002; Portera et al. 2006) o cromosomes en anell (Lichtenbelt et al. 2005), entre d'altres.

1.5.3. SUB-BANDA 22q11.2

La regió 22q11.2 està flanquejada per tres LCR anomenats LCR22, que presenten una mida d'aproximadament 240 Kb i una homologia superior al 99% (McDermid i Morrow 2002) (Figura 1.7). Els LCR22 són mosaics complexos de gens, pseudogens i altres elements repetitius, formats per recombinacions de seqüències *Alu* durant l'evolució dels primats (Babcock et al. 2003). Aquests LCR es troben repartits per la regió pericentromèrica del cromosoma 22 i els gens distribuïts pels diferents LCR22 són, *USP18* (NCBI 11274), *BCR* (NCBI 613) i diferents gens i

1. INTRODUCCIÓ

pseudogens relacionats amb el gen *GGT* (NCBI 2678) (Babcock et al. 2007). La regió de còpia única flanquejada pels LCR22 conté diferents gens, els més rellevants pel fenotip dels portadors de reorganitzacions d'aquesta regió són: *TBX1* (*T-box1*; NCBI: 21380), que codifica per un factor de transcripció implicat en la regulació de diferents processos del desenvolupament, i *TUPLE1* (també anomenat *HIRA*; NCBI: 7290) que codifica per una xaperona d'histones implicada en la formació d'heterocromatina.

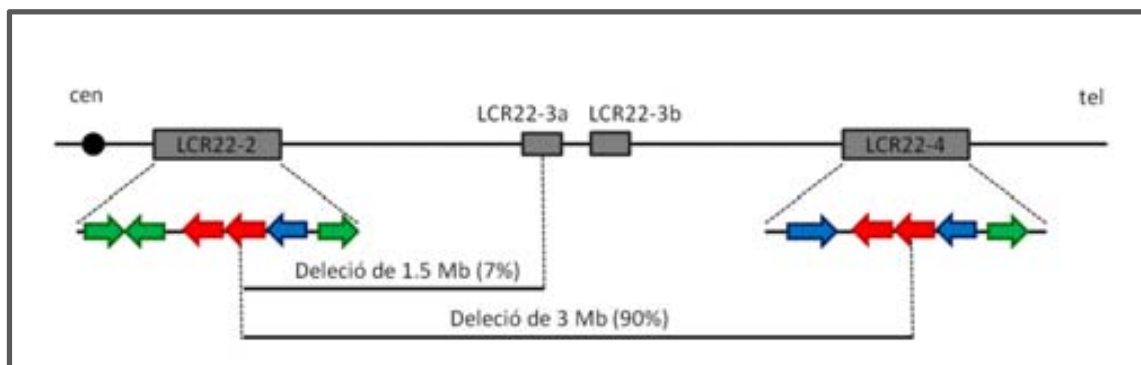


FIGURA 1.7: Representació esquemàtica de la regió 22q11.2. Les fletxes de colors mostren els diferents duplícions dels gens que formen els LCR22s (adaptat de Babcock et al. 2007).

REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES DE LA REGIÓ 22q11.2

DELECCIONS

El 90% de les deleccions de la regió 22q11.2 presenten els punts de trencament a LCR22-2 i LCR22-4. Reorganitzacions entre el LCR22-3a i LCR22-4 originen una deleció de 1.5 Mb implicada en el 7% dels casos descrits (Babcock et al. 2003). També s'han descrit altres deleccions minoritàries (3%) amb punts de trencament en altres LCR22 (Tan et al. 2011).

Tot i que hi ha dades que suggereixen un increment de deleccions de la regió 22q11.2 d'origen matern (Demczuk et al. 1995), la majoria d'autors no troben diferències pel que fa a l'origen parental d'aquestes anomalies (Saitta et al. 2004; Thomas et al. 2006). El mecanisme majoritari de formació de les deleccions de la regió 22q11.2 és la NAHR intercromosòmica (intercromàtide) (Saitta et al. 2004; Thomas et al. 2006).

Les deleccions de la regió 22q11.2 són la causa majoritària de la Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial (SGD; OMIM 188400). Aquest trastorn genòmic és el més comú en humans amb una incidència de 1/4000 nascuts (McDermid i Morrow 2002).

DUPLICACIONS

La majoria de duplicacions de la regió 22q11.2 presenten els punts de trencament al LCR22-2 i LCR22-4, generant duplicacions de 3 Mb. A més, s'han descrit altres duplicacions que impliquen altres LCR d'aquesta regió. En aquest sentit, és probable que aquestes duplicacions siguin el producte complementari de les delecions de la regió 22q11.2 originades per NAHR intercromàtide, majoritàriament per NAHR intercromosòmica (Portnoi 2009).

Les duplicacions de la regió 22q11.2 van ser descrites per primera vegada per Ensenauer et al. (2003). Com les duplicacions d'altres regions cromosòmiques, aquestes causen uns efectes fenotípics més lleus que les delecions de la mateixa regió i moltes vegades són heretades de portadors asimptomàtics (Ensenauer et al. 2003; Portnoi 2009). Degut al baix número de casos de duplicacions *de novo*, encara no s'ha pogut establir una incidència poblacional per a aquesta reorganització (Portnoi 2009).

ALTRES REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

La regió pericentromèrica del cromosoma 22 és molt rica en LCR22 i especialment susceptible a diferents reorganitzacions cromosòmiques produïdes per NAHR. Alguns exemples són la translocació recíproca més freqüent en humans t(11;22) que presenta el punt de trencament al LCR22-3a (Hill et al. 2000; McDermid i Morrow 2002), i la inversió duplicada (invdup22) causant de la Síndrome del ull de gat (McDermid i Morrow 2002), entre d'altres.

1.6. HAPLOTIPS DE PREDISPOSICIÓ A LA RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA NO AL·LÈLICA

Es considera que els fenòmens de NAHR es produeixen de forma esporàdica i que les anomalies cromosòmiques causants de trastorns genòmics presenten un risc de recurrència inferior al 0.5% (Gardner i Sutherland, 2004). No obstant, s'han descrit diferents haplotips que podrien predisposar a les regions flanquejades per LCRs al malaparellament i a la posterior NAHR (Taula 1.3). En aquest sentit, els portadors d'aquests haplotips presentarien un increment del risc de transmissió de reorganitzacions cromosòmiques causants de trastorns genòmics.

1.6.1. INVERSIONS

Tot i que en general les inversions no produeixen efectes fenotípics, aquestes reorganitzacions cromosòmiques s'han identificat amb una incidència més elevada en pares que tenen un fill

1. INTRODUCCIÓ

afecte per algun trastorn genòmic causat per deleció (taula 1.3). Per exemple, la inversió de la regió 7q11.23 s'ha observat amb una freqüència més elevada en progenitors d'individus afectes per la SWB que en la població general (24.9% vs 5.8%; Hobart et al. 2010) i la mateixa situació s'ha observat en mares d'individus afectes per la SA causat per delecions de classe-II, on la freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13 és significativament més elevada (66.7% vs 9%, població problema i control respectivament; Gimelli et al. 2003).

S'ha suggerit que la presència d'una inversió en heterozigosi originaria una regió desaparellada a paquítè que incrementaria la tendència al malaparellament dels LCR flanquejants. La recombinació mitjançant NAHR dels LCR paràlegs generaria gàmetes portadors de reorganitzacions secundàries com delecions i duplicacions (Figura 1.8). Com a conseqüència, els portadors d'aquestes inversions presentarien un risc incrementat de transmetre trastorns genòmics a la descendència (Feuk 2010).

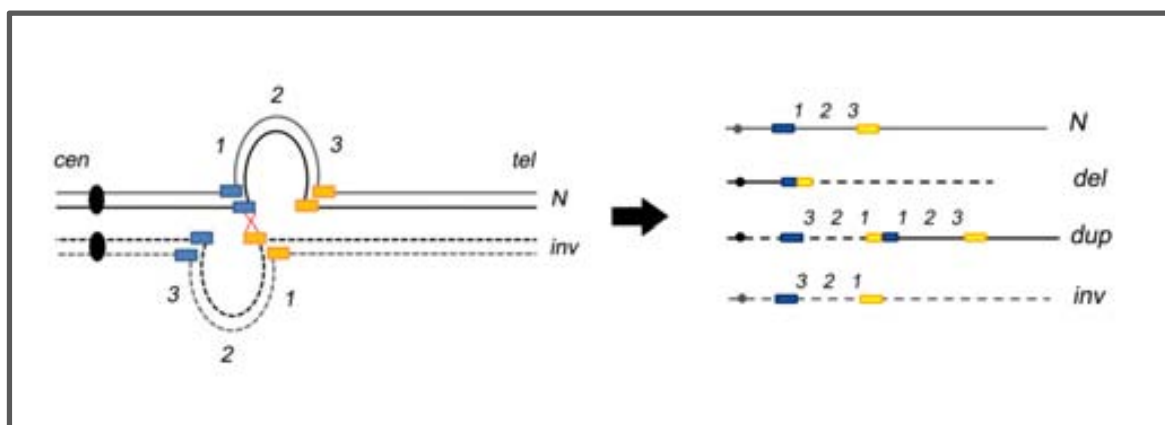


FIGURA 1.8: Representació esquemàtica de la NAHR entre LCR paràlegs en un portador d'una inversió (segment 1, 2 i 3) en heterozigosi (requadre blau-LCR proximal; requadre groc-LCR distal).

Aquestes inversions s'han identificat mitjançant tècniques de FISH sobre cromosomes metafàsics o nuclis interfàsics (Bosch et al. 2009; Gimelli et al. 2003; Osborne et al. 2001) o mitjançant PCR (Bayes et al. 2003; Hobart et al. 2010). Aquestes són tècniques d'anàlisi dirigides a una regió en particular. Per tant, és molt probable que la presència d'inversions en altres regions amb una arquitectura genòmica similar també sigui elevada.

1.6.2. VARIACIÓ ESTRUCTURAL DELS LCR FLANQUEJANTS

Els LCR presenten variacions estructurals i del número de còpies dels blocs que els conformen (Bailey i Eichler 2006). Alguns d'aquests haplotips s'han associat directament a malalties genètiques com per exemple la glomerulonefritis o la malaltia de Crohn (Aitman et al. 2006; Fellermann et al. 2006; Gonzalez et al. 2005). D'altra banda, s'ha observat que alguns haplotips predisposen a reorganitzacions secundàries de les regions que flanquegen. Aquesta situació és especialment important en aquelles regions del genoma implicades en malalties humanes.

Recentment s'han trobat haplotips de predisposició que impliquen variacions en el número de còpies i en l'organització dels LCR que flanquegen regions implicades en trastorns genòmics (Taula 1.3). A mode d'exemple, Cusco et al. (2008) varen descriure diferents variacions del número de còpies en els LCR que flanquegen la regió 7q11.23. En concret, van descriure tres CNV diferents: 1) delecions i duplicacions de la totalitat del LCR7 centromèric (aproximadament 300 Kb), 2) delecions i duplicacions dels blocs A i B en el LCR7 telomèric (aproximadament 250 Kb) i 3) delecions i duplicacions del bloc B (aproximadament 70 Kb). S'ha suggerit que aquests haplotips incrementarien seqüències d'homologia amb les seves còpies paràlogues i afavoririen el malaparellament de les regions associades mitjançant NAHR.

TRASTORN GENÒMIC	HAPLOTIP DE PREDISPOSICIÓ	REFERÈNCIA
Deleció de la regió 3q29	inv3q29	(Antonacci et al. 2009)
Síndrome de Sotos	inv5q35	(Visser et al. 2005)
Síndrome de Williams	inv7q11.23	(Osborne et al. 2001)
Deleció de la regió 8q23	inv8q23	(Sugawara et al. 2003)
Síndrome d'Angelman	inv15q11q13	(Gimelli et al. 2003)
Síndrome deleció 15q3.3	inv15q3.3	(Sharp et al. 2008)
Síndrome deleció 17q21.31	inv17q21.31	(Rao et al. 2010)
Síndrome de Williams	CNV LCR7	(Cusco et al. 2008)
Síndrome deleció 16p12.1	CNV LCR BP1 i BP3	(Antonacci et al. 2010)
Isocromosoma 17p	CNV LCR REPA i REPB	(Carvalho i Lupski 2008)

TAULA 1.3: Haplotips de predisposició per diferents trastorns genòmics.

Com en el cas dels haplotips d'inversió, l'anàlisi de la variació estructural dels LCR s'ha abordat mitjançant tècniques d'anàlisi dirigides, com són la PCR (Cusco et al. 2008) o la FISH interfàsica (Carvalho i Lupski 2008; Antonacci et al. 2010).

Les tècniques de FISH sobre fibres estirades de cromatina (*Fiber-FISH*) ofereixen una alternativa per analitzar LCRs. Aquesta metodologia permet fer anàlisis directes de FISH amb una elevada resolució, fins a 1 Kb (Heng i Tsui 1998). S'han descrit diverses metodologies que permeten estirar fibres de cromatina per estudis de FISH que requereixen una elevada resolució i que es diferencien en el mètode d'extracció del DNA dels nuclis (Fidlerova et al. 1994; Heiskanen et al. 1996; Michalet et al. 1997; Parra i Windle 1993). La tècnica de *Fiber-FISH* s'ha utilitzat satisfactòriament en estudis de mapatge d'elevada resolució (Leipoldt et al. 2007; Protopopov et al. 2003; Raap et al. 1996), per la confirmació del número de còpies de determinats gens (Erdel et al. 1999; lafrate et al. 2004; Perry et al. 2007; Perry et al. 2008; Sallinen et al. 2004) i per determinar el número de repeticions del LCR simples (Barbouti et al. 2004).

L'aplicació d'aquesta metodologia per analitzar l'organització dels LCR complexes que flanquegen regions implicades en trastorns genòmics permetria detectar variacions estructurals que podrien representar haplotips de predisposició a la NAHR.

1.7. DETERMINACIÓ DEL RISC DE TRANSMISSIÓ DE TRASTORNS GENÒMICS

Al llarg de l'apartat 1.6 hem posat de manifest que determinats individus presenten haplotips de predisposició a la NAHR i que aquest fet es podria reflectir en un increment del risc de transmetre determinats trastorns genòmics a la descendència. En aquest sentit, la determinació del risc de transmissió de trastorns genòmics s'ha realitzat mitjançant estudis poblacionals de recurrència familiar i mitjançant l'anàlisi de la incidència d'anomalies cromosòmiques en gàmetes.

1.7.1. ESTUDIS DE RECURRÈNCIA FAMILAR

S'han descrit casos esporàdics de recurrència familiar de delecions de la regió 15q11-q13 (Fernandez-Novoa et al. 2001; Kokkonen i Leisti 2000), de delecions de la regió 7q11.23 (Kara-Mostefa et al. 1999; Scherer et al. 2005) i de delecions de la regió 22q11.2 (Hatchwell et al. 1998; Leana-Cox et al. 1996; Sandrin-Garcia et al. 2002). En tots els casos es va suggerir un

mosaïcisme germinal com a causa probable de la recurrència, tot i que en cap cas es van mostrar evidències experimentals. No existeixen estudis poblacionals de recurrència en famílies afectes per trastorns genòmics. Així doncs, s'estableix per consens un risc de recurrència inferior al 0.5% en els casos en que ambdós progenitors mostren un cariotip normal (Gardner i Sutherland, 2004). La dificultat de realitzar estudis de recurrència en aquestes poblacions rau en tres causes (Rothlisberger i Kotzot 2007): Moltes reorganitzacions cromosòmiques són poc freqüents o úniques, no tots els casos de recurrència tenen perquè estar descrits en la bibliografia i les famílies amb un fill afecte poden replantejar-se l'opció de tenir més fills.

1.7.2. ESTUDIS EN GÀMETES

Donades les limitacions dels estudis familiars per valorar el risc de transmetre trastorns genòmics a la descendència, una alternativa són els estudis en gàmetes i especialment en espermatozoides. Aquests permeten analitzar un elevat número de cèl·lules i establir les freqüències de les reorganitzacions cromosòmiques produïdes per NAHR de forma individual.

Alguns autors han valorat les freqüències de delecions i duplicacions de regions implicades en alguns trastorns genòmics en espermatozoides mitjançant tècniques de PCR (Lam i Jeffreys 2007; Turner et al. 2008). Lam i Jeffreys van mesurar les freqüències de delecions i duplicacions dels gens $\alpha 1$ -globina i $\alpha 2$ -globina en espermatozoides de dos individus control mitjançant l'amplificació específica per PCR dels fragments reorganitzats. Els resultats van indicar una variabilitat interindividual en les freqüències de NAHR i unes freqüències similars de delecions i duplicacions en un dels individus, mentre que en l'altre van observar una freqüència de duplicacions significativament més elevada (Lam i Jeffreys 2006, 2007). Per altra banda, el treball de Turner et al., (2008) es basa en l'anàlisi dels punts de trencament de les delecions i duplicacions de diferents reorganitzacions. Es van analitzar les freqüències de delecions i duplicacions en espermatozoides de cinc individus control mitjançant l'amplificació quantitativa per PCR a temps real (RT-PCR) de 4 *hotspots* de recombinació implicats en trastorns genòmics humans: LCR7 de la regió 7q11.23, CMT1A-REP i LCR17p ambdós de la regió 17p11.2 i AZFa-HERV de la regió Yq11.2. Aquests autors van observar que les delecions es produïen més freqüentment que les duplicacions. Tot i això, el fet d'analitzar únicament els *hotspots* de recombinació (en lloc de les regions reorganitzades) representa una limitació important d'aquest últim estudi ja que, com s'ha explicat anteriorment (apartat 1.3), els LCR presenten diferents *hotspots* i per tant la posició dels punts de trencament de les diferents reorganitzacions cromosòmiques poden variar.

La tècnica de FISH representa una alternativa per valorar les freqüències de NAHR en espermatozoides. Aquesta metodologia s'ha utilitzat en un ampli ventall d'estudis citogenètics en espermatozoides (Martin 2008), principalment per estudiar la segregació cromosòmica en portadors de reorganitzacions cromosòmiques (Anton et al. 2007) i per la valoració de les freqüències d'anomalies cromosòmiques numèriques en individus infèrtils (Sarrate et al. 2009). L'elevat número de cèl·lules que es poden analitzar mitjançant la FISH en espermatozoides, de forma directa i individualitzada, permet fer valoracions fiables de la freqüència d'anomalies cromosòmiques que es produeixen en baixa freqüència (Downie et al. 1997; Egozcue et al. 1997). Malgrat això, aquesta aproximació experimental presenta algunes limitacions que dificulten l'anàlisi de determinades reorganitzacions cromosòmiques: 1) només s'obté informació de les regions reconegudes per les sondes de DNA, per aquest motiu es considera que la FISH és una anàlisi dirigida, 2) la dificultat de discriminar entre els errors d'hibridació de les sondes de DNA i les pèrdues cromosòmiques i 3) la dificultat d'identificar en el nucli interfàsic reorganitzacions cromosòmiques equilibrades.

Tal i com hem descrit en l'apartat 1.4, els productes de la NAHR poden ser delecions, que representen pèrdues de senyals d'hibridació; duplicacions, que donaran lloc a dos senyals propers en el nucli interfàsic i inversions, que donaran com a resultat canvis en la disposició dels senyals d'hibridació. Tenint en compte les limitacions de la tècnica de FISH, aquestes condicionen la seva aplicació per l'anàlisi de les reorganitzacions cromosòmiques produïdes per la NAHR. En aquest sentit, la FISH en espermatozoides seria una bona alternativa per valorar les freqüències de NAHR en el cas que s'utilitzi un disseny experimental adequat per identificar cada tipus de reorganització cromosòmica i que permeti superar les limitacions metodològiques anteriors.

2. OBJECTIUS

HIPÒTESI INICIAL

Els pares d'individus afectes per trastorns genòmics d'origen patern mostren un increment d'espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques degut a la presència d'haplotips de predisposició a la NAHR. Com a conseqüència aquests individus presenten un risc de recurrència incrementat.

OBJECTIUS:

Primer

Establir la freqüència basal de NAHR de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 a partir de l'anàlisi d'espermatozoides d'una sèrie d'individus control.

Segon

Analitzar l'efecte de la mida, l'homologia i la distància dels LCR7, LCR15 i LCR22, així com l'edat dels individus, sobre les freqüències basals de NAHR.

Tercer

Determinar si els pares amb descendència afecta per trastorns genòmics presenten una susceptibilitat a la NAHR més elevada, a fi d'estimar la seva possible relació amb l'origen parental/genètic de l'alteració cromosòmica en el fill afecte.

Quart

Establir els mecanismes de NAHR implicats en la generació d'anomalies de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2.

Cinquè

Valorar l'adequació dels estudis de FISH en espermatozoides en el context del consell genètic d'individus amb descendència afecta per un transtorn genòmic causat per deleció.

Sisè

Avaluar la potencialitat de la metodologia de *Fiber-FISH* per analitzar l'arquitectura genòmica dels LCR complexos.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. FISH EN ESPERMATOZOIDES

3.1.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

Durant la realització d'aquesta tesi s'han estudiat mostres de semen d'un total de 51 individus: 10 individus control d'edats compreses entre 23 i 50 anys, 16 pares amb descendència afectada per la SPW (Taula 3.1), 15 pares amb descendència afectada per la SWB (Taula 3.2) i 10 pares amb descendència afectada per la SDG (Taula 3.3). Tots els individus participants van ser informats dels protocols d'estudi i van manifestar la voluntat de participar en aquest projecte amb la signatura del consentiment informat corresponent. Els protocols utilitzats van ser aprovats pels comitès d'ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona i dels centres col·laboradors.

CODI	EDAT	Centre/Associació de procedència
PW-1	41	CSUPT/ACSPW
PW-2	35	CSUPT/ACSPW
PW-3	44	CSUPT/ACSPW
PW-4	35	CSUPT/ACSPW
PW-5	30	CSUPT/ACSPW
PW-6	33	AMSPW
PW-7	47	AMSPW
PW-8	50	AMSPW
PW-9	60	AMSPW
PW-10	60	AMSPW
PW-11	42	AMSPW
PW-13	53	AMSPW
PW-14	55	AMSPW
PW-15	47	AMSPW
PW-16	44	AMSPW
PW-17	-	AMSPW

CSUPT (Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí); ACSPW (Associació Catalana Síndrome de Prader-Willi); AMSPW (Asociación Madrileña para el Síndrome de Prader-Willi).

TAULA 3.1: Edat i centre de procedència dels individus que conformen la població de pares amb descendència afectada per la síndrome de Prader-Willi.

Les mostres de semen van ser obtingudes per masturbació en contenidors de polietilè, després d'un període mínim de tres dies d'abstinència. Les mostres d'individus control provenen de

donants de la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les mostres dels pares amb individus afectes van ser recollides en col·laboració amb l' Associació Catalana Síndrome de Prader-Willi, la *Asociación Madrileña para el Síndrome de Prader-Willi*, la *Asociación Síndrome de Williams España*, la Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí de Sabadell i l'Hospital Sant Joan de Déu.

CODI	EDAT	Centre/Associació de procedència
WS-1	61	ASWE
WS-2	54	ASWE
WS-3	35	ASWE
WS-4	55	ASWE
WS-5	33	ASWE
WS-6	42	HSJD
WS-7	35	HSJD
WS-8	42	HSJD
WS-9	36	HSJD
WS-10	46	HSJD
WS-11	36	HSJD
WS-12	39	HSJD
WS-13	37	HSJD
WS-14	36	HSJD
WS-15	31	HSJD

ASWE (Asociación Síndrome de Williams España); HSJD (Hospital Sant Joan de Déu).

TAULA 3.2: Edat i centre de procedència dels individus que conformen la població de pares amb descendència afecta per la síndrome de Williams-Beuren.

CODI	EDAT	Centre/Associació de procedència
DG-1	39	HSJD
DG-2	48	HSJD
DG-3	-	HSJD
DG-4	43	HSJD
DG-5	48	HSJD
DG-6	36	HSJD
DG-7*	30	HSJD
DG-8	39	HSJD
DG-10	33	HSJD
DG-11	37	HSJD

*Individu amb cariotip 46, XY, t(1;5); HSJD (Hospital Sant Joan de Déu).

TAULA 3.3: Edat i centre de procedència dels individus que conformen la població de pares amb descendència afecta per la síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial.

3.1.2. PROCESSAMENT I EMMAGATZEMATGE

El processament de les mostres de semen es va realitzar seguint el procediment estandarditzat al nostre laboratori:

- Centrifugar la mostra a 1000 g durant 5 minuts.
- Separar el plasma seminal de la fracció cel·lular amb una pipeta pasteur.
- Afegir solució hipotònica (KCl 0.075 M) prèviament escalfada a 37°C gota a gota amb agitació.
- Incubar la mostra amb la solució hipotònica a 37 °C durant 30 minuts.
- Centrifugar la mostra a 1000 g durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant per decantació.
- Resuspendre la mostra amb el fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic en una proporció 3:1) gota a gota i en agitació.
- Centrifugar la mostra a 1000 g durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant per decantació.
- Fer un mínim de tres rentats amb fixador de Carnoy, fins que el botó cel·lular estigui suficientment net (color blanc).
- Realitzar les extensions cel·lulars deixant caure una gota de la mostra sobre portaobjectes prèviament desengreixats amb metanol.
- Emmagatzemar les preparacions a -20 °C fins el moment de ser utilitzades.

3.1.3. HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (FISH)

DESCONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DELS ESPERMATOZOIDES

El nucli dels espermatozoides presenta una cromatina molt compactada. Aquest fet fa necessària l'aplicació d'un pas previ de descondensació mitjançant una solució que conté 1,4-Ditiotreitòl (DTT). El DTT trenca els ponts disulfur que estableixen les protamines i descondensa la cromatina. La descondensació espermàtica es va realitzar seguint el següent protocol:

- Descongela les extensions cel·lulars emmagatzemades a -20 °C.
- Submergir dues vegades el portaobjectes durant 3 minuts en dues solucions de 2xSSC (Citrat sòdic salí) a temperatura ambient.
- Deshidratar la mostra mitjançant una bateria d'etanols (70 %, 90 % i 100 %) durant 2 minuts cadascun de forma consecutiva.
- Deixar assecar la preparació a temperatura ambient.

- Incubar la preparació a 37 °C en una solució de descondensació: 5 mM DTT, 1% Tritó X-100 i 50 mM Tris (2-Amino-2-hidroxi-metil-1,3-propanodiol) a pH=7.4±0.2. El temps d'incubació en la solució de descondensació és variable en funció de les característiques de les sondes que es volen hibridar i de la susceptibilitat de les mostres a aquest tractament. En els estudis realitzats el temps d'incubació va oscil·lar entre 8 i 15 minuts. En els estudis on es van utilitzar sondes derivades del marcatge de BACs es va utilitzar una solució de descondensació 25 mM de DTT i les preparacions es van incubar durant 45 minuts.
- Submergir dues vegades el portaobjectes durant 3 minuts en dues solucions de 2xSSC a temperatura ambient.
- Deshidratar la mostra mitjançant una bateria d'etanols (70 %, 90 % i 100 %) durant 2 minuts cadascun a temperatura ambient.
- Deixar assecar les preparacions.

SONDES DE DNA UTILITZADES

Es van utilitzar combinacions de sondes de DNA marcades amb diferents fluorocroms que van permetre identificar les diferents reorganitzacions cromosòmiques analitzades. Els fluorocroms són molècules que absorbeixen energia a una longitud d'ona determinada (espectre d'excitació) i l'emeten a una longitud d'ona superior (espectre d'emissió). La combinació de sondes marcades amb fluorocroms d'espectres d'excitació i emissió diferents permet identificar diferents regions cromosòmiques mitjançant diferents colors.

En la taula 3.4 es mostren els espectres d'excitació i emissió, i els colors en que es detecten cadascun dels fluorocroms utilitzats al llarg d'aquesta tesi.

Fluorocrom	Espectre d'excitació (nm)	Espectre d'emissió (nm)	Color
DAPI	350	456	Blau
<i>Spectrum Orange</i> ^a	559	588	Taronja
<i>Spectrum Green</i> ^a	497	524	Verd
<i>Spectrum Aqua</i> ^a	433	480	Blau
DEAC	426	480	Blau
Cy5	652	672	Vermell llunyà

^a Abbott Molecular (Abbott Park, IL, USA); DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol); DEAC (dietilaminocoumarin); Cy5 (Indodicarbocianina)

TAULA 3.4: Espectres d'emissió i excitació dels fluorocroms i colors en que s'identifiquen al microscopi d'epifluorescència.

Les sondes utilitzades en els estudis de FISH en espermatozoides van ser comercials (Abbott Molecular Inc.; Abbott Park, IL, EEUU) o preparades a partir de BACs (Cromosomes Artificials de Bacteris obtinguts del *Children's Hospital Oakland Research Institute*, Oakland, CA 94609, EEUU).

PREPARACIÓ DE SONDES A PARTIR DE BACs

Els BACs són un tipus de vector de clonació basat en el plasmidi Factor F del bacteri *Escherichia coli*, que contenen una mitjana de 150 Kb de DNA genòmic com a insert. A part d'aquest DNA genòmic, els BACs inclouen un origen de replicació i un gen de resistència a l'antibiòtic Cloramfenicol per seleccionar els bacteris que han incorporat el vector.

La preparació de sondes de DNA a partir de BACs es va realitzar mitjançant el següent procediment:

Cultiu i selecció de clons bacterians:

- Afegir 10 ml de medi LB (Luria Bertani) i cloramfenicol a una concentració final de 12.5 µg/ml en tubs estèrils de 50 ml.
- Submergir una nansa de Kolle en l'aliquota de cultiu que conté la soca bacteriana portadora del BAC i posteriorment transferir-la al medi de cultiu.
- Cultivar durant 16 hores a 37 °C i amb una agitació de 250 rpm (Aquatron, Infors HT, Suïssa).
- Congelar una alíquota de 850 µl del cultiu bacterià amb 150 µl de glicerol a -80 °C fins que es vulgui utilitzar de nou.

Extracció plasmídica (Miniprep)

Es va realitzar l'extracció dels BACs mitjançant el kit QIAprep® Miniprep (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanya) seguint el protocol descrit per la casa comercial:

- Transferir el cultiu a tubs cònics de 10 ml i centrifugar a 4000 g durant 10 minuts.
- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el botó en 400 µl de *buffer P1* (on prèviament se li ha afegit 200 µl de RNasa I a una concentració de 10 mg/ml).
- Transferir solució a un eppendorf de 1.5 ml.
- Afegir 400 µl *buffer P2* i barrejar per inversió els tubs de 4 a 6 vegades.
- Afegir 400 µl de *buffer N3* i barrejar per inversió els tubs de 4 a 6 vegades.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 10 minuts.

- Recuperar el sobrenedant amb una pipeta i transferir-lo a una columna amb una membrana de sílice. Aquestes columnes retenen específicament el DNA plasmídic per adsorció a elevades concentracions de sals i permeten la seva elució a baixes concentracions de sals.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 1 minut.
- Eliminar el líquid que resta en el tub per sota de la columna.
- Afegir 500 µl de *buffer PB* a la columna i tornar a centrifugar a 14000 rpm durant 1 minut.
- Eliminar el líquid que resta en el tub per sota de la columna.
- Afegir 750 µl de *buffer PE* a la columna i tornar a centrifugar a 14000 rpm durant 1 minut.
- Eliminar el líquid que resta en el tub per sota de la columna.
- Centrifugar a 14000 rpm durant un minut i eliminar el líquid residual.
- Transferir la columna on hem afegit les solucions a un eppendorf de 1.5 ml nou.
- Afegir 50 µl de *buffer EB* (buffer d'elució) prèviament escalfat a 65 °C i deixar eluir durant un minut.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 1 minut.
- Quantificar el DNA plasmídic utilitzant l'espectrofotòmetre NanoDROPO[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., NanoDrop products, Wilmington DE 19810, EEUU) a una longitud d'ona entre 260 nm i 280 nm, a partir de 1 µl de mostra.

Marcatge de sondes per Nick Translation

La reacció de *Nick Translation* es basa en la incorporació de nucleòtids marcats amb una molècula fluorescent o un haptè mitjançant dos enzims: la DNAasa I que produeix trencaments de cadena simple en el DNA, i la DNA polimerasa I (Pol I) que s'uneix al lloc de trencament del DNA i repara el dany mitjançant activitat exonucleasa i polimerasa 5'→3'. La cadena complementària és utilitzada com a motlle per a la síntesi. La presència de nucleòtids marcats en la reacció farà que la molècula de DNA incorpori el marcatge específic i pugui ser utilitzada com a sonda per experiments de FISH.

El marcatge de les sondes es va realitzar seguint el següent protocol:

- Preparar una barreja de nucleòtids: 5 µl de dATP, dCTP i dGTP (2.5 mM cadascun), 3.4 µl de dTTP (2.5 mM), 4 µl del dUTP marcat amb l'haptè corresponent (1 mM) i 27.6 µl d'H₂O.
- Barrejar 12 µl del BAC extret prèviament a una concentració entre 50 i 60 ng/µl amb 4 µl de la barreja de nucleòtids i 4 µl de la barreja d'enzims de *Nick translation* (Roche, Manheim, Alemanya).
- Deixar la reacció de *Nick Translation* actuar durant 1 hora i 30 minuts a 15 °C.

- Escalfar la mostra a 72 °C durant 10 minuts i afegir 1 µl de EDTA (àcid dietilaminotetraacètic) 0.5 M per aturar la reacció.
- Comprovar que la llargada dels fragments de DNA resultants de la reacció de *Nick Translation* és l'adequada (entre 400 i 600 pb) mitjançant una electroforesi amb un volum del producte corresponent a 100 ng de DNA (4-5 µl) en un gel d'agarosa al 2 % amb TBE 1x i bromur d'etidi utilitzant un marcador de pes de molecular de 100 parells de bases (Bioron Inc.).
- Afegir 10 µl de DNA Cot1 (1 mg/ml; Invitrogen, Carlsbad, EEUU) i 3 µl de DNA d'esperma de salmó (1µg/ml; GE Healthcare, Amersham Place, Buckinghamshire, HP7 9NA, Regne Unit) al producte de *Nick Translation*. Aquests bloquejaran les regions repetitives de DNA, fent que incrementi l'especificitat de la sonda.
- Precipitar la sonda amb 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M i 3 volums d'etanol al 100 % a -20 °C, agitar per inversió posteriorment.
- Deixar precipitant durant 30 minuts a -80 °C o una nit a -20 °C.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 30 minuts a 4 °C.
- Eliminar el sobrenedant per decantació. D'aquesta forma s'eliminen els nucleòtids sobrants de la reacció de *Nick Translation*.
- Afegir 50 µl d'etanol al 70 % fred (-20 °C) per rentar el botó.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 5 minuts a 4 °C.
- Eliminar sobrenedant i assecar el botó amb paper absorbent.
- Afegir 10 µl de buffer d'hibridació (Formamida 50 %, 1xSSC i dextrà de sulfat 10 %)(Abbott Molecular) per resuspendre la sonda.
- Incubar la sonda a 37 °C amb agitació (Thermomixer compact, Eppendorf Inc., Colorado, EEUU) fins que aquesta estigui totalment resuspesa.
- Emmagatzemar les sondes a -20 °C fins al moment de ser utilitzades.

COMBINACIONS DE SONDES

Per al seguiment de les reorganitzacions cromosòmiques originades a les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2, es van utilitzar combinacions de tres sondes de DNA marcades amb diferents fluorocroms (Taula 3.5).

Anàlisi de delecions i duplicacions:

L'anàlisi de delecions i duplicacions es va realitzar utilitzant sondes comercials (Abbott Molecular). Es van fer servir tres combinacions de sondes que van permetre analitzar la

freqüència de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2. Aquestes combinacions de sondes estaven formades per: 1) Una sonda específica de locus que hibrida a la regió crítica marcada amb *Spectrum Orange*; 2) Una sonda centromèrica o específica de locus que hibrida sobre el mateix cromosoma marcada amb *Spectrum Green*. Aquesta sonda es va utilitzar com a control d'hibridació i 3) Una sonda centromèrica del cromosoma 6 marcada amb *Spectrum Aqua* utilitzada com a control de ploïdia (Figura 3.1) (Taula 3.5).

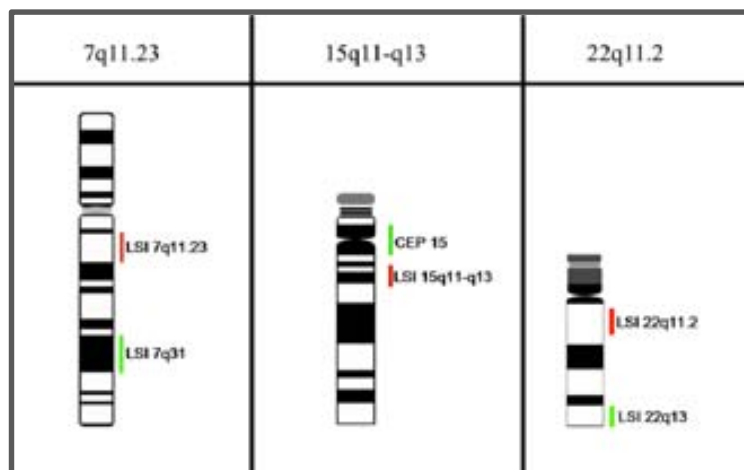


FIGURA 3.1: Combinacions de sondes utilitzades pel seguiment de delecions i duplicacions de les tres regions analitzades. En tots els casos es va afegir un control de ploïdia (centròmer del cromosoma 6).

Anàlisi d'inversions de la regió 15q11-q13

Es van seleccionar tres BACs utilitzant la base de dades *Genome Browser* (GRCh37/hg19): un BAC proximal situat entre el LCR15-1 i LCR15-2 (RP11-1122J3) marcat amb *Spectrum Green* i dos distals separats pel LCR15-3 (RP11-322N14 i RP11-230M20) marcats amb *Spectrum Orange* i DEAC respectivament (Figura 3.2) (Taula 3.5).

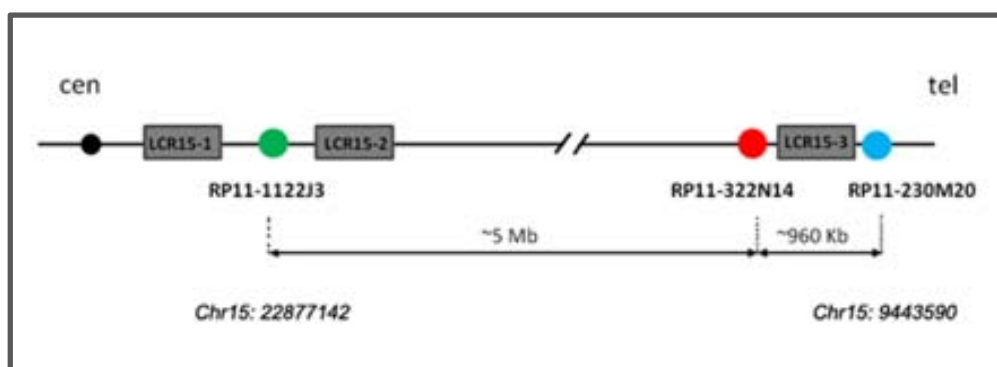


FIGURA 3.2: Combinació de sondes utilitzades pel seguiment de les inversions de la regió 15q11-q13. La figura mostra la posició i distància de cadascuna de les sondes segons la base de dades *Genome Browser* (GRCh37/hg19).

Reorganitzacions cromosòmiques	Regió	Combinació de sondes		
Delecions i Duplicacions	7q11.23	LSI ELN, LIMK, D7S613	LSI D15S11	CEP 6 D6Z1
	15q11-q13	LSI D15S11	CEP 15p11.2	CEP 6 D6Z1
	22q11.2	LSI TUPLE 1	LSI ARSA	CEP 6 D6Z1
Inversions	15q11-q13	RP11-322N14	RP11-1122J3	RP11-230M20

Vermell (*Spectrum Orange*); verd (*Spectrum Green*) i blau (*Spectrum Aqua* o DEAC).

LSI (sonda específica de locus); CEP (sonda centromèrica); RP11 (llibreria genòmica de procedència).

TAULA 3.5: Combinacions de sondes utilitzades pels diferents estudis de FISH en espermatozoides.

HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (FISH)

Per tal de fer accessible el DNA de la mostra a les sondes, aquest ha de ser desnaturalitzat mitjançant una solució que conté formamida. La formamida actua disminuint la temperatura de desnaturalització del DNA. Paral·lelament també és necessari desnaturalitzar les sondes de DNA. El resultat final d'aquest procediment és obtenir DNA de cadena simple apte per hibridar amb les seqüències complementàries.

La FISH es va realitzar seguint el següent protocol:

- Incubar la preparació durant 5 minuts a 73 °C en una solució de desnaturalització (Formamida al 70 % diluïda en 2xSSC, pH=7.5 ±0.5).
- Deshidratar la mostra mitjançant una bateria d'etanols (70 %, 85 % i 100 %) durant 1 minut cadascun a temperatura ambient.
- Deixar assecar la mostra a temperatura ambient.
- Desnaturalitzar les sondes a 73 °C durant 5 minuts. En el cas de les sondes obtingudes a partir de BACs la desnaturalització es va realitzar a 80 °C durant 8 minuts i es van deixar incubant 15 minuts a 37 °C, aquest últim pas (*preannealing*) permet bloquejar les seqüències repetitives de les sondes per incrementar la seva especificitat.
- Afegir les sondes sobre la mostra, col·locar un cobreobjectes i segellar la preparació.
- Deixar incubar a 37 °C durant un mínim de 16 hores.

RENTATS POST-HIBRIDACIÓ I CONTRATINCÍO

Per tal d'eliminar les sondes que no hagin hibridat o que ho hagin fet de forma inespecífica, són necessaris rentats amb solucions de citrat sòdic salí i detergent (NP40; Abbott Molecular). En general, les sondes específiques de locus requereixen rentats més lleus i les sondes que detecten

regions repetitives (sondes centromèriques) requereixen rentats més astringents. Els rentats post-hibridació es van realitzar seguint els següents passos:

- Incubar la preparació a 73°C en una solució 0.4xSSC/0.3%NP40 (pH=7-7.5) (sondes per detectar delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13), 0.7xSSC/0.3%NP40 (pH=7-7.5) (sondes de les regions 7q11.23 i 22q11.2) o 1xSSC/0.3%NP40 (sondes preparades a partir de BACs) durant 2 minuts.
- Incubar la preparació en una solució de 2xSSC/0.1%NP40 durant 1 minut a temperatura ambient.
- Deixar assecar la preparació a temperatura ambient.
- Afegir 5 µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) amb *Antifade* per tenyir la cromatina dels nuclis. L'*antifade* s'utilitza per evitar que la fluorescència emesa pels fluorocroms s'esvaeixi abans de la seva valoració. En els estudis d'inversions de la regió 15q11-q13 no es va realitzar contratinció i es van afegir 4 µl d'*Antifade* (Abbott Molecular).
- Col·locar un cobreobjectes i segellar la preparació.

3.1.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA I CRITERIS DE VALORACIÓ

Les mostres de FISH es van analitzar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 equipat amb filtres específics per FITC, Cy3 i Aqua i un filtre addicional de triple banda pels fluorocroms FITC, Texas Red i DAPI.

Totes les valoracions es van realitzar a 1000 augments mitjançant uns oculars de 10x i un objectiu de 100x (Obertura numèrica=1.35; Oli d'immersió). El microscopi que es va utilitzar porta incorporada una càmera digital Olympus C-5050 Zoom, connectada a un monitor de TV, com a sistema de captació d'imatges.

En l' anàlisi d'inversions, els haplotips identificats van ser confirmats mitjançant un microscopi làser confocal TCS-SP5 AOBS (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemanya). Es va utilitzar un objectiu Plan-Apochromatic 63x (obertura numèrica=1.4; Oli d'immersió) i tres línies làser diferents per recollir l'emissió dels diferents fluorocroms amb tres detectors diferents: els fluorocroms *Spectrum Orange* van ser excitats amb una línia de làser DPSS de 561 nm i observats en un canal vermell amb un rang d'emissió de 569 nm a 671 nm, els fluorocroms *Spectrum Green* van ser excitats amb una línia de làser de diode de 405 nm i observats en un canal verd amb un rang d'emissió de 502 nm a 551 nm i els fluorocroms DEAC es van excitar amb una línia de làser d'Argó de 488 nm i observats en el canal blau a un rang d'emissió de 444 nm a 500 nm.

Per cada imatge es van fer captures 3D mitjançant diferents talls de 0.3 μm de distància entre cadascun d'ells. Les imatges van ser reconstruïdes i analitzades amb el software IMARIS (Bitplane AG, Zürich, Suïssa).

CRITERIS D'ANÀLISI PELS ESTUDIS DE DELECCIONS I DUPLICACIONS

Les combinacions de sondes que es van utilitzar ens van permetre diferenciar espermatozoides normals, portadors de delecions i portadors de duplicacions (Figura 3.3) entre d'altres genotips. Es van valorar un mínim de 10000 espermatozoides per cada anàlisi. Els criteris de valoració s'indiquen a continuació:

1. Només es van avaluar espermatozoides de morfologia normal. Els espermatozoides solapats van ser descartats de l'anàlisi.
2. L'assignació dels genotips es va realitzar seguint les següents directrius:
 - Espermatozoides normals: espermatozoides que presentaven un senyal d'hibridació per cadascuna de les sondes (Figura 3.3a).
 - Delecions: espermatozoides que no presentaven els senyal corresponent a la regió crítica (vermell) i que eren portadors dels controls d'hibridació sobre el mateix cromosoma (verd) i de ploïdia (blau) (Figura 3.3b).
 - Duplicacions: espermatozoides que presentaven dos senyals d'hibridació de la regió específica d'acord amb els criteris estàndard en quan a mida, intensitat i distància (Blanco et al. 1996) i que eren portadors d'un senyal del control d'hibridació i un senyal del control de ploïdia (Figura 3.3c).
3. En casos de disomia i diploïdia, els senyals corresponents a cada sonda havien de presentar la mateixa intensitat i havien d'estar separats per una distància igual o superior al seu diàmetre.

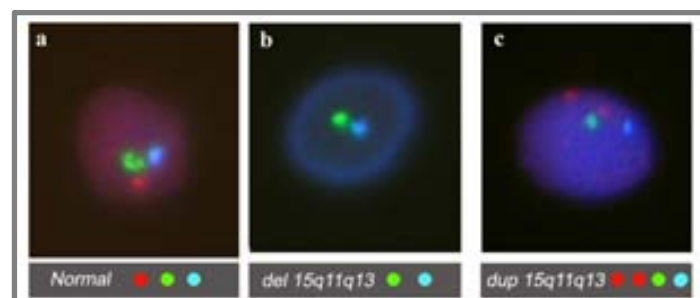


FIGURA 3.3: Classificació dels espermatozoides en funció dels senyals d'hibridació observats

CRITERIS D'ANÀLISI PELS ESTUDIS D'INVERSIONS DE LA REGIÓ 15q11q13

El disseny de sondes utilitzat ens va permetre identificar dos tipus d'inversions: 1) Inversions de tipus 1 que afecta el segment comprès entre el LCR15-1 i el LCR15-3, i 2) Inversions de tipus 2 que afecta el segment comprès entre el LCR15-2 i el LCR15-3 (Figura 3.4).

Es van analitzar un mínim de 1000 espermatozoides per cada mostra. Els nuclis es van considerar informatius quan seguien els següents criteris:

1. Espermatozoides de morfologia normal. Els espermatozoides solapats van ser descartats de l'anàlisi.
2. Espermatozoides que presentaven una distribució dels senyals d'hibridació de 2 senyals associats i 1 senyal separat. Els espermatozoides portadors de 3 senyals d'hibridació solapats o tres senyals independents van ser classificats com a no-informatius.

En funció de la distribució dels senyals en els nuclis informatius es van assignar els següents genotips:

- Normals: Espermatozoides que presentaven els senyals distals associats (vermell i blau) i el senyal proximal (verd) separat (Figura 3.4a).
- Inversions tipus 1: Espermatozoides que presentaven el senyal proximal (verd) associat al senyal més distal (blau) i el senyal vermell separat (Figura 3.4b).
- Inversions tipus 2: Espermatozoides que presentaven el senyal proximal (verd) associat al senyal vermell i el senyal més distal (blau) separat (Figura 3.4c).

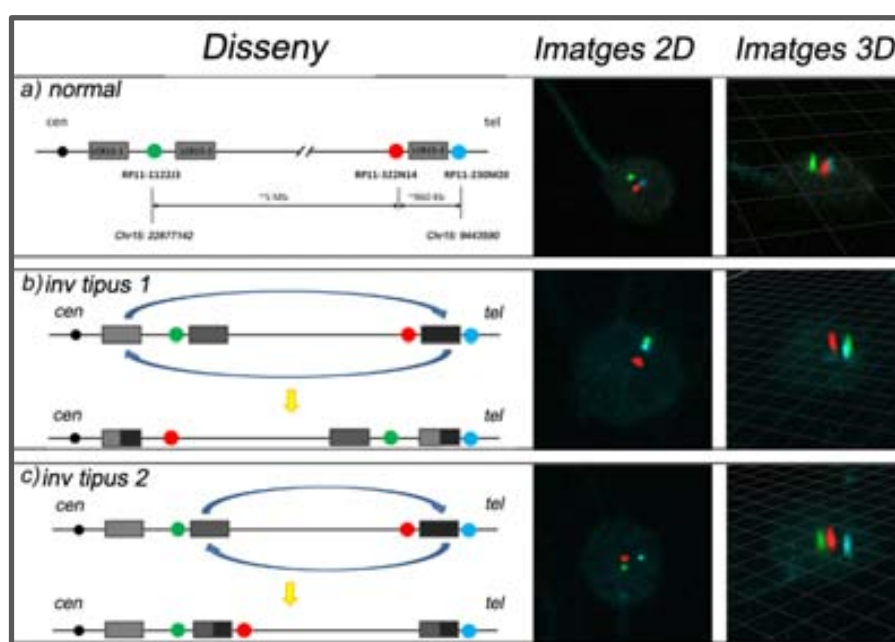


FIGURA 3.4: Classificació dels espermatozoides en funció dels senyals d'hibridació observats.

3.1.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant el software SPSS (versió 15.0.1.1, Chicago, IL) amb la supervisió del Servei d'estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona.

ANÀLISIS REALITZADES

Es varen analitzar les freqüències de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2, i les freqüències d'inversions de la regió 15q11-q13 en la població control.

En la població de pares amb descendència afecta per la SPW es varen analitzar les freqüències de delecions i duplicacions de les regions 15q11-q13, 7q11.23 i 22q11.2, i les freqüències d'inversions de la regió 15q11-q13.

Pel que fa a la població de pares amb descendència afecta per la SWB i la SDG, es va analitzar la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 i 22q11.2 respectivament. En els casos que van mostrar increments significatius d'anomalies, també es van analitzar les freqüències de delecions i duplicacions de les regions 15q11-13 i 22q11.2 en el cas dels pares amb descendència afecta per la SWB, i 15q11-q13 i 7q11.23 en el cas dels pares amb descendència afecta per la SDG.

MIDA MOSTRAL

Es va determinar la mida mostral mitjançant la fórmula descrita a la figura 3.5. La mida de la mostra determinarà el grau de precisió que es vol aconseguir. Es van utilitzar rangs de precisió entre el 1% i el 2% en funció del tipus d'estudi realitzat.

$n = \frac{K^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{e^2}$	n = Mida de la mostra
	K = Coeficient obtingut a partir del nivell de confiança establert (per a un nivell de confiança del 95% el valor de K=1.96)
	p₀ = Proporció esperada d'observacions que presentaran la característica estudiada (en una situació de màxima incertesa p=0.5)
	q₀ = 1-p ₀
	e = precisió amb la que es vol estimar el paràmetre

FIGURA 3.5: Fórmula del model estadístic de determinació de la mida mostral.

En els estudis de delecions i duplicacions a partir de l'anàlisi de 10000 espermatozoides, s'aconsegueix un grau de precisió del 1%. Donada la complexitat metodològica dels estudis d'inversions de la regió 15q11-q13, es va decidir analitzar 1000 espermatozoides, i per tant assumir una precisió del 2%.

ANÀLISI DE LA FREQUÈNCIA DE DELECIONS I DUPLICACIONS EN LA POBLACIÓ CONTROL

Es van comparar les mitjanes poblacionals de delecions i duplicacions en la població control entre les tres regions estudiades aplicant el test de Friedman, les diferències es van considerar significatives si $P < 0.05$.

Es va realitzar un anàlisi de conglomerats jeràrquics amb l'objectiu d'agrupar individus que presentin característiques similars pel que fa a les freqüències de delecions i duplicacions de les tres regions estudiades. Es va considerar el mètode de Ward per calcular les distàncies. Les agrupacions dels individus es van representar mitjançant un dendrograma, és a dir un diagrama en forma d'arbre que permet visualitzar les relacions de proximitat per les característiques estudiades en els diferents individus.

SUSCEPTIBILITAT A GENERAR DELECIONS, DUPLICACIONS I INVERSIONS EN PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA

Es van comparar els resultats obtinguts en els individus amb descendència afectada amb les freqüències observades per cada regió en la població control. Aquestes comparacions es van fer de forma poblacional i individual.

- Les comparacions poblacionals es van realitzar aplicant el test de Mann-Whitney, les diferències es van considerar significatives quan $P < 0.05$.
- En les anàlisis poblacionals per detectar si existeixen diferències entre les freqüències de delecions i duplicacions entre les tres regions analitzades es va aplicar el test de Friedman, les diferències es van considerar significatives quan $P < 0.05$.
- Les comparacions individuals es van realitzar mitjançant el test *Khi*-quadrat (χ^2). Degut a que les freqüències de delecions i duplicacions observades van ser molt baixes, es va establir un nivell de significança de $P < 0.01$ amb l'objectiu de disminuir els falsos positius.

EFECTE DE L'EDAT

En totes les reorganitzacions cromosòmiques analitzades es va utilitzar el coeficient de correlació de Pearson per valorar si hi havia alguna relació entre aquestes anomalies cromosòmiques i l'edat. Les correlacions es van considerar significatives quan $P < 0.05$.

MECANISMES DE FORMACIÓ DE DELECIONS I DUPLICACIONS

Per determinar la participació de la NAHR intercromàtide i/o intracromàtide en la generació de delecions i duplicacions es van comparar les freqüències observades per aquestes dues reorganitzacions:

- Es va comparar la freqüència mitjana poblacional de delecions i duplicacions mitjançant el test de Wilcoxon. Les diferències es van considerar significatives quan $P < 0.05$.
- Es va comparar la freqüència de delecions i la de duplicacions en cadascun dels individus mitjançant el test de McNeamar. Les diferències es van considerar significatives quan $P < 0.01$.

3.2. ANÀLISI DE MICROSATÈL·LITS

Amb l'objectiu de relacionar l'origen parental o genètic de les anomalies causants dels trastorns genètics en la descendència amb els resultats de FISH en espermatozoides, es van realitzar anàlisis de seqüències microsatèl·lit de les regions 7q11.23 i 22q11.2.

Les dades de l'origen genètic de la síndrome de Prader-Willi (deleció, disomia uniparental materna, defectes del centre d'impressió genètica) van ser facilitades per el centre de diagnòstic UDIAT de la Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí de Sabadell. Per determinar l'origen parental de les delecions de les regions 7q11.23 i 22q11.2 vam aplicar la següent metodologia:

3.2.1. POBLACIÓ D'ESTUDI

Es van analitzar les famílies dels individus afectes per les síndromes de SDG i SWB. En concret, es van recollir 3 ml de sang perifèrica (SP) en tubs amb EDTA (àcid dietilaminotetraacètic) del pare, la mare i el fill afecte amb la col·laboració del servei de Genètica del Hospital Sant Joan de Déu i la *Asociación Española para el Síndrome de Williams*. Globalment, es van recollir 48 mostres de SP corresponents a 16 famílies (8 famílies amb descendència afectada per la SWB i 8 famílies amb descendència afectada per la SDG).

3.2.2. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC DE LES MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA

Es va realitzar una extracció de DNA genòmic a partir de les mostres de 3 ml de SP utilitzant el Kit de purificació Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen) seguint el següent protocol:

- Afegir 9 ml de solució de lisi I (RBC Lysis Solution) i barrejar per inversió amb els 3 ml de SP.
- Incubar la mostra a temperatura ambient durant 5 minuts. Durant aquest temps barrejar la mostra per inversió com a mínim una vegada.
- Centrifugar la mostra a 2000 g durant 5 minuts.
- Eliminar el sobrenedant per decantació i resuspendre el botó cel·lular.
- Afegir 3 ml de la solució de lisi II (*Cell Lysis Solution*) i barrejar amb una pipeta pasteur fins aconseguir una solució homogènia.
- Afegir 15 µl de RNasa A a una concentració de 4 mg/ml.
- Barrejar la mostra per inversió.
- Incubar la mostra a 37 °C durant 15 minuts.
- Afegir 1 ml de solució de precipitació de proteïnes i barrejar la mostra amb un agitador durant 20 segons.
- Centrifugar la mostra a 2000 g durant 5 minuts.
- Recollir el sobrenedant amb una pipeta pasteur en un tub de 15 ml on prèviament se li han afegit 3 ml d'isopropanol al 100 %.
- Barrejar la mostra invertint el tub tantes vegades com sigui necessari, fins que s'observi una "medusa" blanquinosa.
- Centrifugar la mostra a 2000 g durant 3 minuts i eliminar el sobrenedant per inversió.
- Assecar les parets del tub amb paper absorbent i afegir 3 ml d'etanol al 70 %.
- Centrifugar a 2000 g durant 1 minut.
- Eliminar el sobrenedant per decantació i assecar el botó amb un paper absorbent i aproximadament 15 minuts a temperatura ambient.
- Hidratar el botó de DNA afegint 250 µl de solució d'hidratació.
- Incubar la mostra a 65 °C durant una hora a temperatura ambient durant 16 hores per hidratar completament el DNA.
- Transferir el DNA a tubs eppendorff de 1.5 ml.
- Quantificar mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDROP® 2000 (Thermo Fisher Scientific) a una longitud d'ona de 260 a 280 nm a partir de 1 µl de mostra.
- Emmagatzemar les mostres a -20 °C fins al moment de ser utilitzades.

3.2.3. AMPLIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES MICROSATÈL·LIT PER PCR

Es van seleccionar seqüències microsatèl·lit de les regions crítiques d'ambdós síndromes i marcadors externs a aquestes regions a partir de la base de dades NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Els diferents marcadors microsatèl·lit van ser amplificats mitjançant PCR a partir de les mostres de DNA genòmic extret dels dos progenitors i el fill afecte.

Els encebadors utilitzats van ser sintetitzats per la casa comercial Roche Applied Science. En tots els casos es va utilitzar una modificació en l'encebador adelantat que consisteix en un marcatge a l'extrem 5' amb un fluorocrom per a la seva posterior detecció. Es van utilitzar dos marcatges diferents (6-FAM i HEX) que emeten fluorescència a dos longituds d'ona diferents permetent l'anàlisi simultània de més d'un marcador.

Es van utilitzar entre 40 i 90 ng de DNA genòmic per a l'amplificació dels diferents fragments polimòrfics. Els reactius i concentracions utilitzades per cada amplificació es detallen a la taula 3.6. Les condicions de PCR van ser les mateixes en tots els marcadors analitzats (Taula 3.7) amb diferències en la temperatura d'hibridació dels cicles d'amplificació, aquestes eren específiques per cada marcador i van oscil·lar entre 50 °C i 63 °C (Taula 3.8 i 3.9).

Reactius	Concentració	Volum(µl)/reacció
10xbuffer II (Applied Biosystems)	-	2.5
MgCl₂ (Applied Biosystems)	25 mM	2
dNTPs (Applied Biosystems)	2.5 mM cadascun	2
Encebador adelantat (Roche)	12.5 pmol/µl	2
Encebador retrassat (Roche)	12.5 pmol/µl	2
AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems)	250 U	0.25
H₂O lliure de nucleases	-	c.s.p. 25µl
Volum final		25 µl

TAULA 3.6: Reactius i quantitats utilitzats en cada reacció de PCR.

Els productes amplificats de les reaccions de PCR van ser comprovats mitjançant una electroforesi amb un gel d'agarosa al 2 % amb TBE 1X i bromur d'etidi. Es va utilitzar un marcador de pes molecular de 100 parells de bases (Bioron Inc) i es va confirmar l'amplificació específica d'acord amb la mida de la seqüència especificada per la base de dades NCBI.

Cicles	Temps	Temperatura	Número de cicles
Desnaturalització	10 minuts	94°C	1
Amplificació:			
Desnaturalització	30 segons	94°C	35 cicles
Hibridació	30 segons	X°C *	
Elongació	35 segons	72°C	
Elongació final	12 minuts	72°C	1

*Tª específica per cada microsatèl·lit

TAULA 3.7: Condicions d'amplificació utilitzades.

Microsatèl·lits	Encebadors	Marcatge	Mida	Tª hibridació
D7S2437	A: GATGGAATACCTGCTTCATGTAG R: CTGGGCAACATAATGAGACC	6-FAM	201-239	58°C
D7S485	A: TCTGTCATGTGAGGATGCAG R: CTACAGGATTCTATTCAGGATACG	6-FAM	244-256	56°C
D7S691	A: GGGTGATTAATGCTTGCTTA R: GCTTGATTTTCCAACAGG	HEX	128-146	50°C
D7S516	A: GACCTCTCAAACTTGTTG R: CTA CTGCCTCCATTACGTTG	6-FAM	254-266	56°C
D7S634	A: AATCCTCCAAATGAAACAGA R: CTCAGTACACGTTGCTGGTA	6-FAM	136-148	52°C
D7S613	A: CAGCCTGGGTAACAAAAGC R: CCTCCCTCCCTAATCCATG	HEX	85	56°C
D7S1870	A: GTAGTAAAGCACATCACC R: CAAATCCCCACTTTTCTC	HEX	88	57°C
D7S2518*	A: TTTGATAAAAACAAGCAAAAG R: CAAA CTAGCATCTGGGA	HEX	139-159	49°C
D7S3196*	A: AGGCTGTCTCTAAATAAATTCGGTCAA R: TGCCTCCCAAGTCCGTAAA	HEX	225	58°C

*Microsatèl·lits utilitzats en cas que la resta de marcadors interns a la regió 7q11.23 no fossin informatius.

TAULA 3.8: Microsatèl·lits utilitzats per la determinació de l'origen parental de la SWB.

Es van analitzar 9 seqüències microsatèl·lit per a la determinació del origen parental en els casos de la síndrome de Williams-Beuren, de les quals 4 es troben a la regió crítica de la síndrome (Figura 3.6 i Taula 3.8).

Microsatèl·lits	Encebadors	Marcatge	Mida (pb)	T ^a hibridació
D22S1638	A: GACAACAGCAAATTGCACATT R: TCACGCCACTACCCTCCAG	HEX	93	55°C
D22S1648	A: CAGATGCTTCAGGAGAAGTG R: AGTTGTCAGATGCCTAAGAGA	HEX	152	50°C
D22S264	A: ATTAACATCAAAGGAGCCC R: CACCCACCAGAGGTATTCC	HEX	190-198	56°C
D22S311	A: GCTAGTGTGAGATAACGAAGCC R: TTTTGTATTTTGTAGTAGACGG	6-FAM	262	63°C
D22S303	A: AGGACCTCAGACTGGTCAGTC R: CTCCATGAGAAGGTACTCTCC	6-FAM	220-233	56°C

TAULA 3.9: Microsatèl·lits utilitzats per la determinació de l'origen parental de la SDG.

Per la determinació de l'origen parental en els casos de síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial es van utilitzar un total de 5 seqüències microsatèl·lit, quatre de les quals es troben situades a la regió crítica de la síndrome i dues són externes a aquesta regió (Figura 3.6 i Taula 3.9). Els marcadors específics de la regió crítica ens van permetre diferenciar entre les delecions de la regió 22q11.2 de 3 Mb (majoritàries) i les de 1.5 Mb.

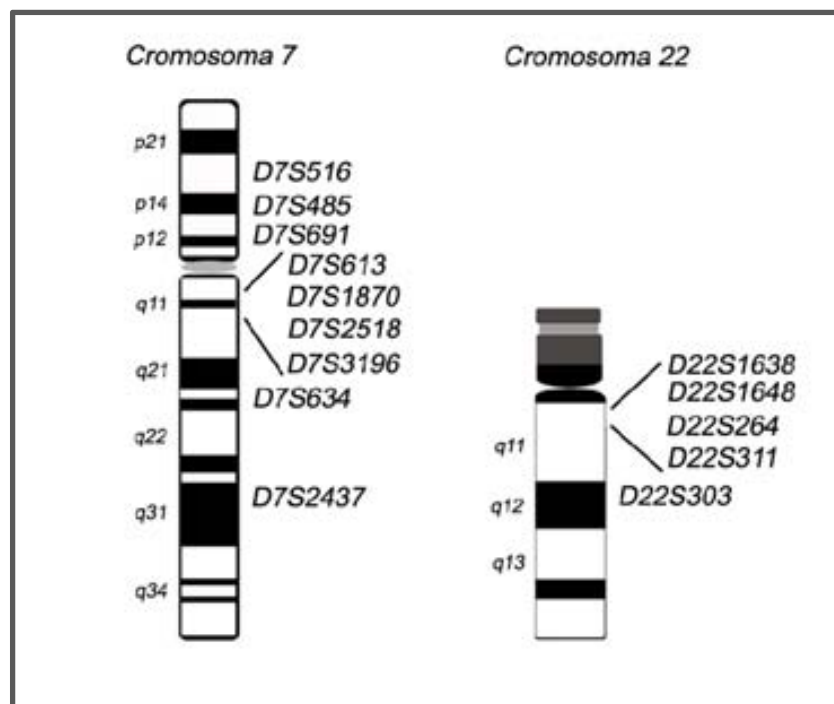


FIGURA 3.6: Idiogrames dels cromosomes 7 i 22 on es mostra la posició dels microsatèl·lits utilitzats per la determinació de l'origen parental.

3.2.4. ANÀLISI DE LES MOSTRES

Els productes d'amplificació es van analitzar amb el suport especialitzat del Servei de Genòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona, mitjançant un seqüenciador automàtic ABI 3130XL. L'anàlisi dels fragments consta de l'electroforesi capil·lar dels productes d'amplificació i l'anàlisi de la seva mida mitjançant el software GeneMapper® 3.7 (Applied Biosystems). Aquest software permet la visualització dels perfils de grandària dels fragments amplificats per PCR de cada microsatèl·lit i la seva comparació en les tres mostres d'interès (pare, mare i fill) (Figura 3.7).

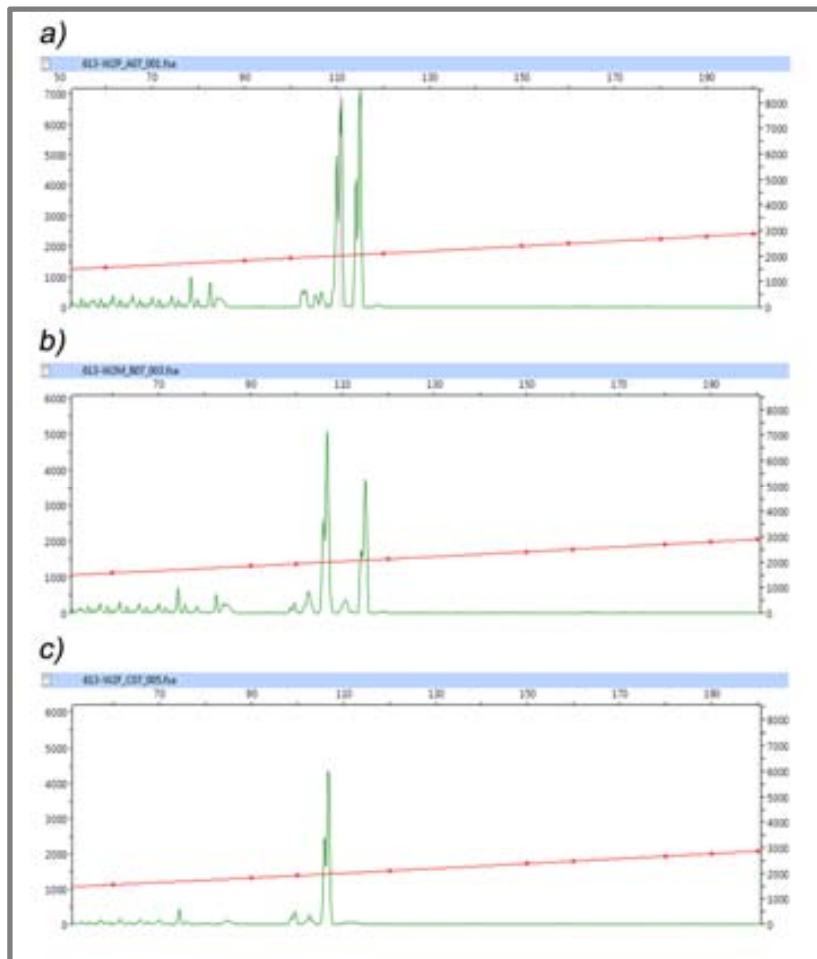


FIGURA 3.7: Representació dels perfils del microsatèl·lit D7S613 en un cas de SWB d'origen patern. a) Perfil observat en la mostra del pare, b) Perfil observat en la mostra de la mare i c) Perfil observat en la mostra del fill. Aquest últim presenta un únic pic corresponent a l'al·lel matern.

3.3. FISH SOBRE FIBRES DE CROMATINA (*Fiber-FISH*)

Amb l'objectiu d'estudiar l'arquitectura genòmica dels LCR es va optimitzar la tècnica de FISH sobre fibres estirades de cromatina.

3.3.1. LÍNIES CEL·LULARS LIMFOBLASTOIDES

Es varen utilitzar dues línies cel·lulars limfoblastoides humanes amb cariotip normal: 1) GM0171 (*Human Genetics Collection; Health Protection Agency (HPA)*, Regne Unit) i 2) DO208915 (*European Collection of Cell Lines; HPA*, Regne Unit).

Es van establir cultius cel·lulars a partir de 1×10^6 cèl·lules en medi RPMI (Sigma-Aldrich, Regne Unit) suplementat amb sèrum fetal boví al 10 % (Sigma-Aldrich) i 1 % de L-Glutamina. El cultiu es va dur a terme a 37 °C durant 72 hores.

Es varen realitzar dos tipus de preparacions a partir dels cultius cel·lulars:

- Cromosomes metafàsics: Es van obtenir mitjançant l'aplicació de protocols estàndard.
- Fibres de DNA.

3.3.2. ESTIRAMENT DE LES FIBRES DE DNA SOBRE PORTAOBJECTES

L'extracció de les fibres de cromatina es va realitzar sobre portaobjectes utilitzant una solució de lisi constituïda per NaOH 0.07 M en etanol. Aquesta solució de lisi, juntament amb la posició vertical dels portaobjectes durant el processament de les mostres, van permetre l'estirament de les fibres de DNA sobre les preparacions. El protocol utilitzat consta dels següents passos (Jefferson i Volpi 2010):

- Transferir 5 ml de cultiu cel·lular a un tub de centrifuga de 10 ml.
- Centrifugar a 800 g durant 5 minuts.
- Eliminar el sobrenedant per decantació.
- Rentar el botó cel·lular amb 5 ml de 1xPBS.
- Centrifugar a 800 g durant 5 minuts.
- Repetir el rentat amb 5 ml de 1xPBS i agafar una alíquota per fer un recompte del número de cèl·lules en una Cambra de Newbauer.
- Centrifugar a 800 g durant 5 minuts.
- Eliminar el sobrenedant.

- Resuspendre el botó amb 1xPBS per aconseguir una concentració de 2×10^6 cèl·lules/ml.
- Estendre entre 10 i 15 μl de la suspensió cel·lular sobre un portaobjectes i deixar assecar la preparació a 37 °C.
- Col·locar la preparació en la cubeta de tinció *Shandon Sequenza*[®] (Thermo Scientific Inc) utilitzant els adaptadors *Coverplates*[™] de plàstic (Thermo Scientific Inc) que permeten afegir les diferents solucions i que aquestes afectin de forma homogènia a tota la preparació.
- Rentar les preparacions amb 200 μl de 1xPBS i deixar que la solució passi per tot el portaobjectes.
- Afegir 200 μl de solució de lisi i deixar que la solució penetri la cubeta de l'adaptador de plàstic.
- Fixar la mostra afegint 200 μl de metanol dues vegades.
- Recuperar el portaobjectes i deixar que s'assequi a temperatura ambient.
- Comprovar que l'estirament de les fibres de DNA sigui correcte mitjançant un microscopi invertit de contrast de fases (Figura 3.8).
- Emmagatzemar les preparacions a -20 °C fins al moment de ser utilitzades.

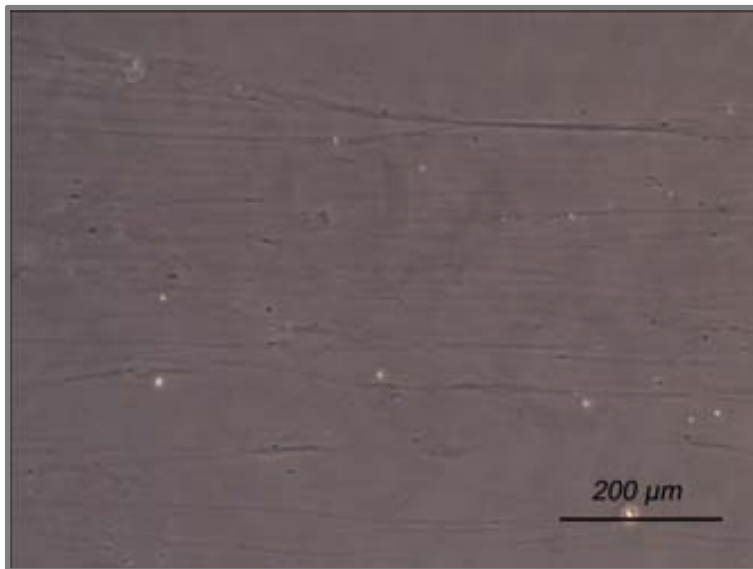


FIGURA 3.8: Fibres de cromatina al microscopi de contrast de fases (100x).

3.3.3. HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT

La FISH sobre fibres de cromatina es va realitzar seguint el protocol descrit en l'apartat 3.1.3 amb algunes modificacions.

SONDES DE DNA UTILITZADES

Es van preparar sondes per FISH a partir de dos tipus de vectors de clonació diferents: fòsmids i BACs. Igual que els BACs, els fòsmids són vectors de clonació basats en el plasmidi F de *Escherichia coli*, la principal diferència entre aquests és la mida de l'insert que contenen, que en el cas dels fòsmids és aproximadament 40 Kb.

Per aquesta optimització es va treballar concretament amb el LCR22-2, un dels LCR implicats en la majoria de delecions de la regió 22q11.2 (apartat 1.5.3). A partir de la base de dades *Genome Browser* (GRCh37/hg19) es van seleccionar 4 fòsmids que cobreixen els gens i pseudogens descrits en el LCR22-2: WI2-938L9, WI2-451K3, WI2-1268B22 i WI2-1822L21 i un BAC de còpia única que es troba situat al costat proximal del LCR22-2 (RP11-66F9) (Figura 3.9).

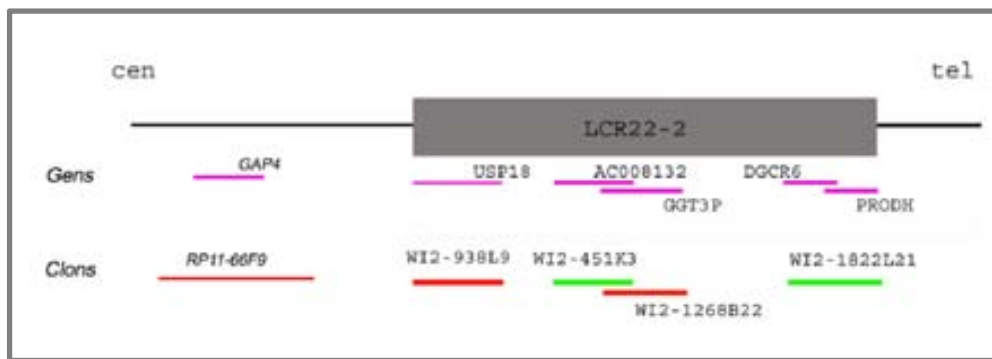


FIGURA 3.9: Sondes utilitzades per estudiar l'arquitectura genòmica del LCR22-2 mitjançant *Fiber-FISH* (GRCh37/hg19).

La preparació de les sondes es van realitzar seguint els protocols descrits a l'apartat 3.1.3. El marcatge de les sondes es va realitzar amb nucleòtids marcats de forma indirecta amb digoxigenina-dUTP (Roche) o biotina-dUTP (Roche). En les hibridacions on es van utilitzar tres sondes, es va incorporar un tercer fluorocrom, concretament Alexa594 (Invitrogen).

CONDICIONS DE FISH I RENTATS POST-HIBRIDACIÓ PER FIBER-FISH

Per realitzar les hibridacions sobre fibres estirades de cromatina es van utilitzar 400 ng de DNA totals per hibridació i sonda.

La diferència més significativa d'aquest tipus d'hibridació és la necessitat d'utilitzar rentats post-hibridació molt menys astringents. A més, el fet d'utilitzar sondes de DNA marcades de forma indirecta va fer necessari l'aplicació d'un pas addicional per la detecció de les sondes amb un anticòs o molècula que reconegui específicament l'haptè i que a la vegada estigui conjugat amb

un fluorocrom. Les sondes marcades amb digoxigenina van ser detectades amb un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb FITC (Roche) i les sondes marcades amb biotina van ser detectades amb avidina conjugada amb el fluorocrom Cy3 (Sigma). En les *Fiber-FISH* de tres colors les sondes marcades de forma directa amb Alexa594 no van necessitar detecció, mentre que les sondes marcades amb digoxigenina i biotina van ser detectades amb anti-digoxigenina conjugada amb FITC i Avidina conjugada amb Cy5 (CyDye, Amersham Pharmacia Biotech) respectivament.

Els rentats post-hibridació i la detecció de les sondes en els estudis de *Fiber-FISH* s'especifiquen a continuació:

- Retirar el cobreobjectes de la preparació i incubar la mostra durant 5 minuts en una solució de Formamida al 50 % en 1xSSC a 42 °C.
- Incubar la preparació durant 5 minuts en 2xSSC a 42 °C.
- Afegir 200 µl d'una solució de bloqueig (0.1 g MARVEL en 10 ml de 1xPBS/0.05 %Tween 20) sobre la mostra.
- Cobrir la mostra amb la solució de bloqueig amb un cobreobjectes de plàstic i incubar la preparació a 37 °C durant 1 hora.
- Rentar la mostra en 1xPBS durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Aplicar 200 µl de solució de detecció (0.01 g MARVEL en 10 ml de 1xPBS/0.05 %Tween 20) que conté anticòs anti-digoxigenina (1 µg/ml) o Avidina (10 µg/ml) per detectar les sondes marcades amb digoxigenina o biotina respectivament, i cobrir la mostra amb un cobreobjectes de plàstic.
- Incubar a 37 °C durant 30 minuts.
- Rentar els portaobjectes amb tres solucions de 1xPBS un minut cadascuna a temperatura ambient.
- Realitzar la contratinció de la cromatina dels nuclis amb DAPI (apartat 3.1.3) i segellar la preparació.
- Emmagatzemar les mostres a -20 °C fins al moment de ser utilitzades.

3.3.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA I CRITERIS DE VALORACIÓ

Les mostres de *Fiber-FISH* es van analitzar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX-51 equipat amb filtres específics per DAPI, FITC, Cy3 i Cy5, i un filtre addicional dual per FITC/Texas Red. Les imatges es van capturar i analitzar mitjançant el software CytoVysion (Applied Imaging, San Jose, CA).

Tenint en compte la distribució dels senyals d'hibridació en les preparacions de *Fiber-FISH* i el tipus de seqüència que es volia analitzar (seqüència de DNA repetitiva) va fer necessari l'elaboració i aplicació dels següents criteris de valoració:

- Les fibres es van considerar informatives quan es van observar al menys dos senyals de diferent color sobreposats o pròxims situats de forma consecutiva.
- Dos o més senyals del mateix color es van considerar com senyals independents quan aquests es trobaven separats per una distància superior a la observada en cadascun de les comptes de collaret que formen el senyal de *Fiber-FISH*.
- Els senyals es van considerar informatius independentment de la seva mida.

4. RESULTATS

4.1. VALIDACIÓ DE LA METODOLOGIA

En els estudis de delecions i duplicacions es van utilitzar sondes comercials (Abbott Molecular Inc.) amb una eficiència d'hibridació superior al 99%.

Les sondes emprades en els estudis d'inversions van ser obtingudes a partir de BACs amplificats i marcats al nostre laboratori. Prèviament a la seva aplicació en espermatozoides, van ser hibridades en cromosomes metafàsics per confirmar el seu posicionament. Totes les sondes van mostrar senyals específics localitzats a la regió pericentromèrica del cromosoma 15 (Figura 4.1). L'eficiència d'hibridació d'aquestes sondes es va calcular mitjançant l'anàlisi de 1000 espermatozoides mostrant valors superiors al 98 %.

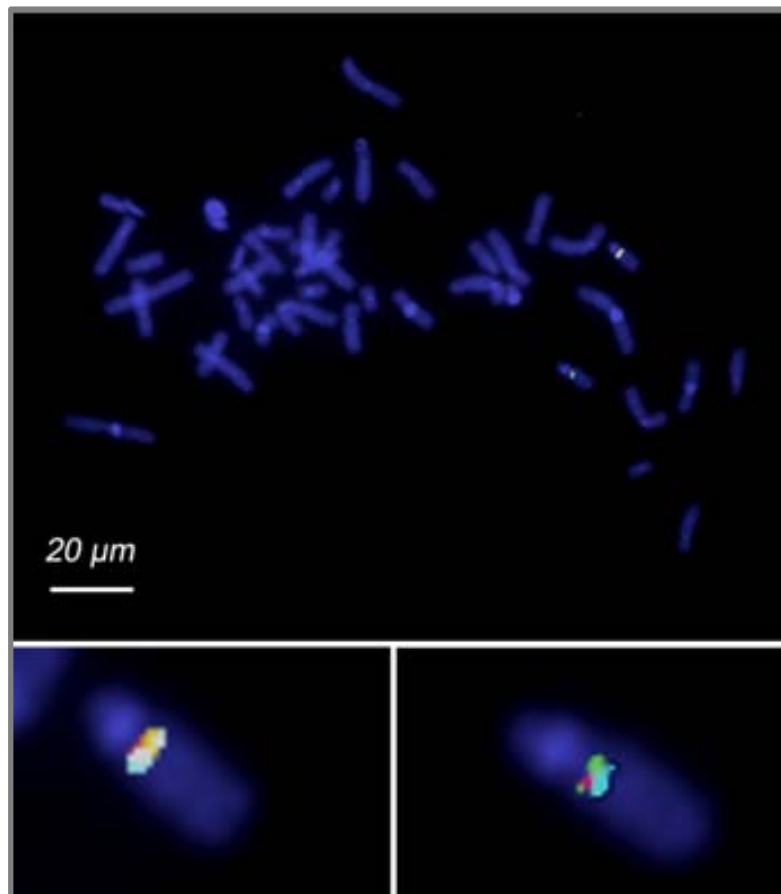


FIGURA 4.1: FISH sobre cromosomes metafàsics utilitzant les sondes pels estudis d'inversions de la regió 15q11-q13: RP11-1122J3 (verd), RP11-320N14 (vermell) i RP11-230M20 (blau). A la part inferior es mostren imatges ampliades dels dos cromosomes homòlegs amb els tres senyals d'hibridació.

4.2. ANÀLISI DE LA FREQUÈNCIA DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES

4.2.1. POBLACIÓ CONTROL

FREQUÈNCIES DE DELECIONS I DUPLICACIONS

Es van analitzar un total de 303456 espermatozoides (**Treball 2**): 101042 espermatozoides per la regió 7q11.23 (Taula 4.1), 101572 espermatozoides per la regió 15q11-q13 (Taula 4.2) i 100842 espermatozoides per la regió 22q11.2 (Taula 4.3).

CASOS	EDAT	7q11.23					total
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^a	
C-1	26	9982 (99.25%)	32 (0.32%)	14 (0.14%)	46 (0.46%)	29 (0.29%)	10057
C-2	24	9930 (97.95%)	34 (0.34%)	20 (0.20%)	54 (0.54%)	154 (1.54%)	10138
C-3	25	10009 (98.90%)	31 (0.31%)	18 (0.18%)	49 (0.49%)	62 (0.62%)	10120
C-4	23	9906 (98.60%)	29 (0.29%)	25 (0.25%)	54 (0.54%)	87 (0.87%)	10047
C-5	36	10029 (99.00%)	25 (0.25%)	11 (0.11%)	36 (0.36%)	65 (0.65%)	10130
C-6	28	10000 (99.16%)	11 (0.11%)	23 (0.23%)	34 (0.34%)	51 (0.51%)	10085
C-7	50	10000 (99.03%)	16 (0.16%)	21 (0.21%)	37 (0.37%)	61 (0.61%)	10098
C-8	50	9967 (99.05%)	10 (0.10%)	7 (0.07%)	17 (0.17%)	79 (0.79%)	10063
C-9	42	9986 (99.87%)	5 (0.05%)	11 (0.11%)	16 (0.16%)	70 (0.70%)	10072
C-10	26	10157 (99,26%)	17 (0.17%)	16 (0.16%)	33 (0.33%)	42 (0.42%)	10232
% ± SEM		98.8 ± 0.23	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.70 ± 0.11	

^a disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI.

TAULA 4.1: Resultats de les anàlisis de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 en espermatozoides d'individus control.

CASOS	EDAT	15q11-q13					total
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^a	
C-1	26	10120 (99.07%)	31 (0.31%)	23 (0.23%)	54 (0.54%)	41 (0.40%)	10215
C-2	24	10105 (98.95%)	31 (0.30%)	30 (0.29%)	61 (0.59%)	47 (0.46%)	10213
C-3	25	10084 (99.22%)	8 (0.08%)	22 (0.22%)	30 (0.30%)	49 (0.48%)	10163
C-4	23	10155 (98.93%)	23 (0.22%)	38 (0.37%)	61 (0.59%)	49 (0.48%)	10265
C-5	36	10028 (99.31%)	25 (0.25%)	18 (0.18%)	43 (0.43%)	27 (0.27%)	10098
C-6	28	10016 (99.33%)	11 (0.11%)	12 (0.12%)	23 (0.23%)	45 (0.45%)	10084
C-7	50	10062 (99.25%)	24 (0.23%)	20 (0.19%)	44 (0.42%)	32 (0.32%)	10138
C-8	50	10038 (99.46%)	12 (0.12%)	16 (0.16%)	28 (0.28%)	27 (0.27%)	10093
C-9	42	10030 (99.36%)	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	35 (0.35%)	10095
C-10	26	10022 (98.82%)	39 (0.38%)	54 (0.53%)	93 (0.91%)	93 (0.91%)	10208
% ± SEM		99.17 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.47 ± 0.07	0.38 ± 0.07	

^a disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI.

TAULA 4.2: Resultats de les anàlisis de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 en espermatozoides d'individus control.

CASOS	EDAT	22q11.2					total
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^a	
C-1	26	10000 (99.17%)	6 (0.06%)	8 (0.08%)	14 (0.14%)	70 (0.70%)	10084
C-2	24	10000 (98.96%)	15 (0.15%)	6 (0.06%)	21 (0.21%)	84 (0.84%)	10105
C-3	25	9985 (99.33%)	6 (0.06%)	10 (0.10%)	16 (0.16%)	51 (0.51%)	10052
C-4	23	10011 (99.07%)	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	64 (0.64%)	10105
C-5	36	9948 (99.15%)	23 (0.23%)	20 (0.20%)	43 (0.43%)	42 (0.42%)	10033
C-6	28	9979 (99.16%)	16 (0.16%)	8 (0.08%)	24 (0.24%)	61 (0.61%)	10064
C-7	50	10000 (98.44%)	32 (0.32%)	34 (0.34%)	66 (0.66%)	92 (0.92%)	10158
C-8	50	9987 (98.8%)	29 (0.29%)	15 (0.15%)	44 (0.44%)	77 (0.77%)	10108
C-9	42	10000 (99.26%)	15 (0.15%)	8 (0.08%)	23 (0.23%)	52 (0.52%)	10075
C-10	26	10000 (99.42%)	9 (0.09%)	2 (0.02%)	11 (0.11%)	47 (0.47%)	10058
% ± SEM		99.08 ± 0,09	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.64 ± 0.05	

^a disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI.

TAULA 4.3: Resultats de les anàlisis de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides d'individus control.

Les freqüències mitjanes de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 (\pm SEM) van ser de $0.21\% \pm 0.03$ (rang: 0.05%-0.34%) i $0.17\% \pm 0.02$ (rang: 0.07%-0.25%), respectivament (Taula 4.1). En la regió 15q11-q13, la mitjana de delecions i de duplicacions (\pm SEM) va ser $0.22\% \pm 0.03$ (rang: 0.08%-0.38%) i $0.25\% \pm 0.04$ (rang: 0.12%-0.53%), respectivament (Taula 4.2). Pel que fa a la regió 22q11.2, les freqüències mitjanes de delecions i duplicacions (\pm SEM) observades varen ser $0.17\% \pm 0.02$ (rang: 0.06%-0.32%) i $0.12\% \pm 0.03$ (0.02%-0.34%), respectivament (Taula 4.3).

No es varen observar diferències poblacionals en la freqüència de delecions i duplicacions (del+dup) entre les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 (freqüència \pm SEM, $0.37\% \pm 0.04$; $0.47\% \pm 0.07$ i $0.27\% \pm 0.05$, respectivament) ($P=0.122$)(Figura 4.2).

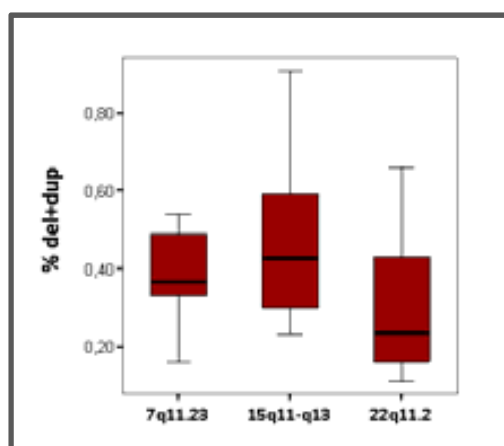


FIGURA 4.2: Diagrama on es mostren les freqüències de del+dup observades en les regions analitzades.

4. RESULTATS

Les freqüències de del+dup van ser analitzades de forma individual mitjançant una anàlisi de conglomerats jeràrquics (Figura 4.3a). Aquesta anàlisi agrupa els individus en un dendrograma en funció de les similituds que presenten les freqüències de del+dup de les tres regions analitzades. Els individus apareixen a diferents distàncies d'associació, desde 0 (màxima similitud) fins a 25 (correspondència mínima).

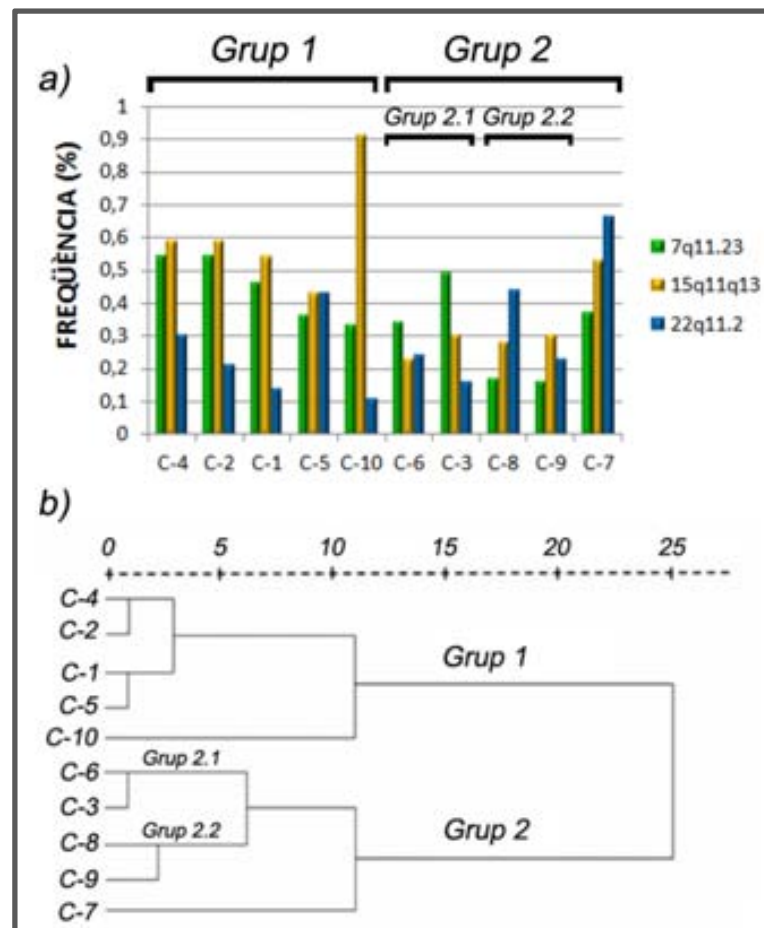


FIGURA 4.3: a) Freqüències de delecions i duplicacions (del+dup) en cada individu analitzat, b) Anàlisi de conglomerats jeràrquics dels patrons de NAHR dels individus analitzats.

El dendrograma resultant va mostrar dos grups clarament diferenciats (Figura 4.3b):

- Grup 1 (distància d'associació <12). Format per individus que presentaven freqüències de del+dup de les regions 7q11.23 i 15q11-q13 més elevades. Aquest grup va incloure els individus C-4, C-2, C-1, C-5 (distància d'associació <3) i C-10. L'individu C-10 es distancia de la resta per mostrar una freqüència de del+dup de la regió 15q11-q13 considerablement més elevada.

- Grup 2 (distància d'associació <12). Aquest grup va resultar més heterogeni i es van diferenciar dos subgrups diferents (distància d'associació <7). Els individus C-6 i C-3 (grup 2.1) van ser agrupats a una distància de 1 per presentar freqüències de del+dup de les regions 15q11-q13 i 22q11.2 més baixes que les de la regió 7q11.23. Els individus C-8 i C-9 (grup 2.2) es van agrupar a una distància de 2 ja que presentaven freqüències de del+dup de les regions 15q11-q13 i 7q11.23 més baixes que per la regió 22q11.2. Finalment, l'individu C-7 va ser separat de la resta d'individus del Grup 2, a una distància d'associació de 10, per presentar freqüències de del+dup més elevades per totes les regions.

FREQÜÈNCIA D'INVERSIONS DE LA REGIÓ 15q11-q13

Es van analitzar un total de 14479 nuclis d'espermatozoides en la població control, dels quals 10292 nuclis van ser informatius representant el 71.45% del total de nuclis analitzats (**Treball 3**; Taula 4.4). El disseny experimental va permetre identificar clarament espermatozoides normals i portadors d'inversions de tipus-1 i tipus-2 (Figura 4.4). La freqüència mitjana d'inversions de tipus-1 (\pm SEM) va ser $3.59\% \pm 0.46$ (rang: 1.29%-5.32%), mentre que la de tipus-2 (\pm SEM) va ser $9.51\% \pm 0.87$ (rang: 6.47%-14.06%).

La freqüència d'inversions de tipus-2 va resultar significativament més elevada que la freqüència d'inversions de tipus-1 ($P=0.005$) i no es va observar una correlació significativa entre ambdós tipus d'inversions ($P=0.328$).

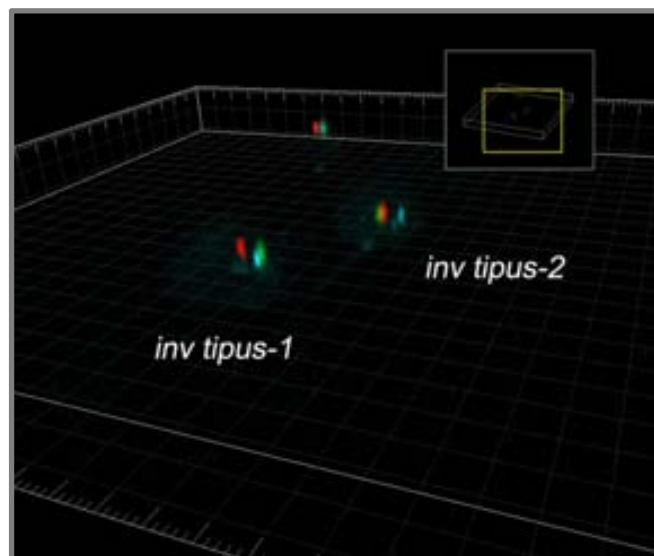


FIGURA 4.4: Reconstrucció tridimensional de les captures de microscòpia làser confocal mitjançant el software Imaris. La imatge mostra exemples d'inversions de la regió 15q11-q13.

CASOS	EDAT	Total	Informatius (%)	Haplotips ^a (%)		
				<i>normal</i>	<i>inv tipus-1</i>	<i>inv tipus-2</i>
C-1	26	1416	1015 (71.68)	873 (86.01)	54 (5.32)	88 (8.67)
C-2	24	1479	1061 (71.74)	932 (87.84)	41 (3.86)	88 (8.29)
C-3	25	1494	1018 (68.13)	842 (82.71)	45 (4.42)	131 (12.87)
C-4	23	1435	1063 (74.08)	937 (88.15)	56 (5.27)	70 (6.59)
C-5	36	1343	1012 (75.35)	862 (85.18)	45 (4.45)	105 (10.38)
C-6	28	1488	1024 (68.82)	834 (81.44)	46 (4.49)	144 (14.06)
C-7	50	1663	1051 (63.20)	960 (91.34)	23 (2.19)	68 (6.47)
C-8	50	1461	1005 (68.79)	852 (84.78)	28 (2.79)	125 (12.44)
C-9	42	1210	1003 (82.89)	912 (90.93)	13 (1.29)	78 (7.78)
C-10	26	1490	1040 (69.80)	943 (90.67)	19 (1.83)	78 (7.50)
%±SEM			71.45%±1.66	86.91%± 1.10	3.59% ± 0.46	9.51% ± 0.87

^a número i percentatge en nuclis informatius

TAULA 4.4: Resultats dels estudis d'inversions de la regió 15q11-q13 en espermatozoides d'individus control.

4.2.2. PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER TRASTORNS GENÒMICS

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13

Es van analitzar un total de 163587 nuclis d'espermatozoides en la població formada per 16 pares amb descendència afectada per la SPW (**Treball 1**). L'origen genètic de la SPW en la descendència va poder ser establert en 14 dels 16 individus analitzats (dades facilitades per la CSUPT) (Taula 4.5): en 10 casos la SPW es va originar per deleció paterna (PW-2, PW-3, PW-4, PW-5, PW-6, PW-8, PW-9, PW-13, PW-15 i PW-16) i en 4 individus l'origen es va atribuir a disomia uniparental materna (DUP; PW-1, PW-10, PW-11 i PW-14). En els casos on l'etiologia va ser DUP, només es va poder concretar si la DUP era total o parcial en 1 cas (PW-14) i aquest va resultar ser DUP parcial.

La freqüència mitjana de delecions (\pm SEM) va ser 0.59% \pm 0.12 (rang: 0.18%-2.34%) i la freqüència mitjana de duplicacions (\pm SEM) va ser 0.31% \pm 0.03 (rang: 0.12%-0.56%) (Taula 4.5).

Es va observar un increment significatiu de del+dup de la regió 15q11-q13 en la població de pares amb descendència afectada per la SPW respecte a la població control (mitjana de del+dup de la regió 15q11-q13 \pm SEM; 0.90% \pm 0.14 vs 0.47% \pm 0.07; P=0.002). Les comparacions individuals van mostrar increments significatius de del+dup en 10 dels 16 casos analitzats (PW-1, PW-2, PW-5, PW-6, PW-7, PW-10, PW-13, PW-15, PW-16 i PW-17; P<0.01; Figura 4.5). No es va observar una

relació directa entre increments de del+dup i l'etiologia de la SPW en la descendència (Taula 4.5): sis dels individus que varen mostrar increments significatius de del+dup en espermatozoides eren pares amb un fill afecte per la SPW causada per deleció (PW-2, PW-5, PW-6, PW-13, PW-15 i PW-16), dos individus eren pares amb un fill afecte per la SPW causada per disomia uniparental materna (PW-1 i PW-10) i en dos casos l'origen genètic de la SPW en la descendència no es va avaluar (PW-7 i PW-17).

CASOS	EDAT	15q11-q13						Etiologia
		normals	deleccions	duplicacions	del+dup	altres ^b	total	
PW-1	41	10027 (98.17%)	54 (0.53%) ^a	32 (0.32%)	86 (0.85%)*	51 (0.50%)	10164	DUP
PW-2	35	9873 (98.42%)	79 (0.79%) ^a	45 (0.45%)	124 (1.24%)*	35 (0.35%)	10032	Deleció
PW-3	44	10554 (98.96%)	32 (0.30%)	27 (0.25%)	59 (0.55%)	52 (0.49%)	10665	Deleció
PW-4	35	10037 (99.47%)	18 (0.18%)	15 (0.15%)	33 (0.33%)	22 (0.22%)	10092	Deleció
PW-5	30	9948 (98.57%)	80 (0.80%) ^a	23 (0.23%)	103 (1.03%)*	32 (0.32%)	10083	Deleció
PW-6	33	10120 (98.77%)	42 (0.41%)	36 (0.35%)	78 (0.76%)*	48 (0.47%)	10246	Deleció
PW-7	47	10061 (99.08%)	43 (0.42%)	28 (0.28%)	71 (0.70%)*	22 (0.22%)	10154	NA
PW-8	50	10164 (99.07%)	32 (0.31%)	27 (0.26%)	59 (0.57%)	36 (0.35%)	10259	Deleció
PW-9	60	10049 (99.16%)	28 (0.28%)	32 (0.32%)	60 (0.60%)	25 (0.25%)	10134	Deleció
PW-10	60	9867 (96.56%)	239 (2.34%) ^a	43 (0.42%)	282 (2.76%)*	70 (0.68%)	10219	DUP
PW-11	42	10549 (99.04%)	37 (0.35%)	30 (0.28%)	67 (0.63%)	35 (0.33%)	10651	DUP
PW-13	53	9986 (98.32%)	81 (0.80%) ^a	26 (0.26%)	107 (1.06%)*	64 (0.63%)	10157	Deleció
PW-14	55	10031 (99.22%)	47 (0.46%) ^a	12 (0.12%)	59 (0.58%)	41 (0.40%)	10131	DUP
PW-15	47	9918 (98.28%)	51 (0.51%)	26 (0.26%)	77 (0.77%)*	97 (0.96%)	10092	Deleció
PW-16	44	10177 (98.85%)	46 (0.45%) ^a	39 (0.39%)	85 (0.84%)*	34 (0.33%)	10296	Deleció
PW-17	-	10020 (98.12%)	59 (0.58%)	57 (0.56%)	116 (1.14%)*	76 (0.74%)	10212	NA
% ± SEM		98.63 ± 0.17	0.59 ± 0.12	0.31 ± 0.03	0.90 ± 0.14	0.45 ± 0.05		

*Incrementos significatius en relació a la població control ($P < 0.01$); ^a Incrementos significatius de deleccions en relació a duplicacions ($P < 0.01$); ^b Disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI; NA, no avaluat

TAULA 4.5: Resultats de les anàlisis de deleccions i duplicacions de la regió 15q11-q13 en espermatozoides d'individus amb descendència afecte per la SPW.

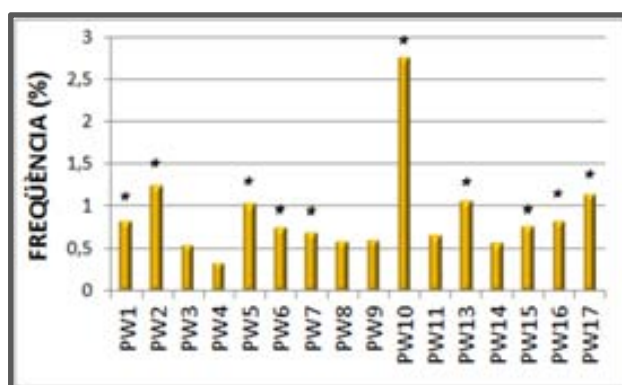


FIGURA 4.5: Freqüències de del+dup observades en els pares amb descendència afecte per la SPW. L'asterisc mostra els individus amb increments significatius de del+dup respecte a la població control.

Freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13

Es van analitzar un total de 22502 nuclis d'espermatozoides en la població de pares amb descendència afectada per la SPW, dels quals 16545 nuclis varen ser informatius representant el 73.78% del total de nuclis analitzats (**Treball 3**; Taula 4.6). La freqüència mitjana d'inversions de tipus-1 (\pm SEM) va ser 3.06% \pm 0.33 (rang: 1.37%-5.73%), mentre que la freqüència mitjana d'inversions de tipus-2 (\pm SEM) va ser 10.07% \pm 0.74 (rang: 5.39%-15.02%).

CASOS	EDAT	Total	Informatius (%)	Haplotips ^a (%)			Etiologia
				Normal	inv tipus-1	inv tipus-2	
PW-1	41	1309	1012 (77.31)	802 (79.35)	58 (5.73)*	152 (15.02)*	DUP
PW-2	35	1278	1013 (79.26)	901 (88.94)	21 (2.07)	91 (8.98)	Deleció
PW-3	44	1274	1017 (79.83)	929 (91.35)	21 (2.06)	67 (6.59)	Deleció
PW-4	35	1373	1065 (77.57)	919 (86.29)	35 (3.29)	111 (10.42)	Deleció
PW-5	30	1604	1045 (65.15)	874 (83.64)	38 (3.63)	133 (12.73)*	Deleció
PW-6	33	1375	1008 (73.31)	903 (89.58)	26 (2.58)	79 (7.84)	Deleció
PW-7	47	1465	1060 (72.35)	952 (89.81)	22 (2.08)	86 (8.11)	NA
PW-8	50	1406	1048 (74.54)	907 (86.54)	24 (2.29)	117 (11.16)	Deleció
PW-9	60	1462	1095 (74.90)	1021 (93.24)	15 (1.37)	59 (5.39)	Deleció
PW-10	60	1321	1014 (76.76)	831 (81.95)	42 (4.14)	141 (13.90)*	DUP
PW-11	42	1313	1010 (76.92)	847 (83.86)	43 (4.26)	120 (11.88)	DUP
PW-13	53	1509	1063 (70.44)	856 (80.53)	54 (5.08)	153 (14.39)*	Deleció
PW-14	55	1500	1015 (67.67)	929 (91.53)	22 (2.17)	64 (6.31)	DUP
PW-15	47	1357	1007 (74.21)	881 (87.49)	44 (4.37)	82 (8.14)	Deleció
PW-16	44	1462	1014 (69.36)	886 (87.38)	17 (1.68)	111 (10.95)	Deleció
PW-17	-	1494	1059 (70.88)	937 (88.48)	23 (2.17)	99 (9.35)	NA
%\pmSEM			73.78% \pm 1.05	86.87% \pm 1.02	3.06% \pm 0.33	10.07% \pm 0.74	

^a número i percentatge en nuclis informatius

*Incrementos significatius en relació a la població control (P<0.05)

NA, no avaluat

TAULA 4.6: Resultats dels estudis d'inversions de la regió 15q11-q13 en els individus amb descendència afectada per la SPW.

La freqüència d'inversions de tipus-2 va resultar significativament més elevada que la freqüència d'inversions de tipus-1 (3.06% vs 10.07%; P=0.0001). Es va trobar una correlació significativa entre la freqüència d'inversions de tipus 1 i d'inversions de tipus-2 (r=0.74; P=0.001) (Figura 4.6a).

No es van observar diferències significatives per la freqüència mitjana d'inversions de tipus-1 (P=0.219) ni de tipus-2 (P=0.598) entre la població control i els pares amb descendència afectada per la SPW. Tot i això, les comparacions individuals van mostrar increments significatius d'inversions en 4 individus: tres presentaven increments d'inversions de tipus-2 (PW-5, PW-10 i

PW-13) i un d'ells va mostrar increments significatius d'ambdós tipus d'inversions (PW-1) ($P < 0.05$) (Taula 4.6) (Figura 4.6b). És important destacar que els quatre individus que presentaven increments significatius d'inversions mostraven increments significatius de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 (Taula 4.5).

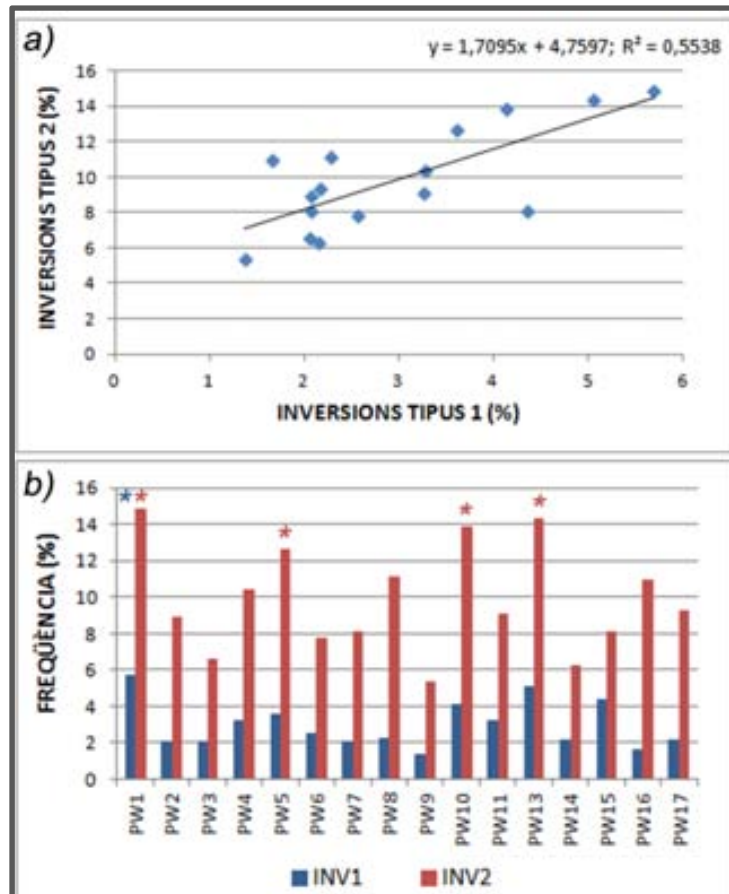


FIGURA 4.6: **a)** Correlació entre la freqüència d'inversions de tipus-1 i inversions de tipus-2 ($r=0.55$; $P=0.004$), **b)** Freqüències d'inversions de tipus-1 i tipus-2 observades en cadascun dels pares amb descendència afectada per la SPW. L'asterisc identifica els individus amb increments significatius d'inversions respecte a la població control.

No es va observar una correlació significativa entre les freqüències de delecions i d'inversions de la regió 15q11-q13 ni en la població control ($P=0.121$) ni en la població de pares amb descendència afectada per la SPW ($r=0.69$; $P=0.062$).

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTADA PER LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

Es van analitzar un total de 150948 nuclis d'espermatozoides en la població de 15 individus amb descendència afectada per la SWB. L'origen parental de la delecio causant de la SWB va poder ser

4. RESULTATS

establert en 9 dels 15 individus (Annex). Quatre dels individus van resultar ser pares amb descendència afectada per la SWB d'origen patern (WS-2, WS-5, WS-8 i WS-13; Taula 4.7).

Es van observar increments significatius de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 en 3 dels 15 individus analitzats ($P < 0.01$; Taula 4.7; Figura 4.7). L'origen parental va poder ser establert només en un cas (WS-11) i va resultar ser matern (Taula 4.7).

CASOS	Edat	7q11.23					total	ORIGEN PARENTAL
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^b		
WS-1	61	9763 (97.37%)	84 (0.84%) ^a	34 (0.34%)	118 (1.18%)*	120 (1.2%)	10001	NA
WS-2	54	10000 (99.49%)	4 (0.04%)	7 (0.07%)	11 (0.11%)	32 (0.32%)	10043	patern
WS-3	35	10000 (99.00%)	17 (0.17%)	17 (0.17%)	34 (0.34%)	45 (0.45%)	10079	matern
WS-4	55	10000 (99.08%)	13 (0.13%)	26 (0.26%)	39 (0.39%)	42 (0.42%)	10081	matern
WS-5	33	9939 (98.6%)	15 (0.15%)	27 (0.27%)	42 (0.42%)	75 (0.75%)	10056	patern
WS-6	42	10000 (99.03%)	17 (0.17%)	10 (0.1%)	27 (0.27%)	55 (0.55%)	10082	NA
WS-7	35	10000 (98.67%)	26 (0.26%)	21 (0.21%)	47 (0.47%)	72 (0.72%)	10119	NA
WS-8	42	9950 (99.02%)	9 (0.09%)	17 (0.17%)	26 (0.26%)	39 (0.39%)	10015	patern
WS-9	36	9950 (99.50%)	13 (0.13%)	7 (0.07%)	20 (0.20%)	30 (0.30%)	10000	matern
WS-10	46	10048 (99.37%)	14 (0.14%)	10 (0.10%)	24 (0.24%)	40 (0.40%)	10112	NA
WS-11	36	9926 (98.99%)	50 (0.50%) ^a	20 (0.20%)	70 (0.70%)*	36 (0.36%)	10032	matern
WS-12	39	9957 (98.62%)	75 (0.74%) ^a	19 (0.19%)	84 (0.83%)*	55 (0.55%)	10106	NA
WS-13	37	9980 (99.08%)	12 (0.12%)	8 (0.08%)	20 (0.20%)	52 (0.52%)	10052	patern
WS-14	36	10026 (99.23%)	6 (0.06%)	7 (0.07%)	13 (0.13%)	84 (0.84%)	10123	matern ^c
WS-15	31	10000 (99.53%)	6 (0.06%)	3 (0.03%)	9 (0.09%)	38 (0.38%)	10047	NA

*Incrementos significatius en relació a la població control ($P < 0.01$); ^a Incrementos significatius de delecions en relació a duplicacions ($P < 0.01$); ^b Disomies, diploidies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI; ^c Dades proporcionades per l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón; NA, no avaluat.

TAULA 4.7: Resultats individuals de l'anàlisi de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SWB i origen parental de la síndrome en la descendència.

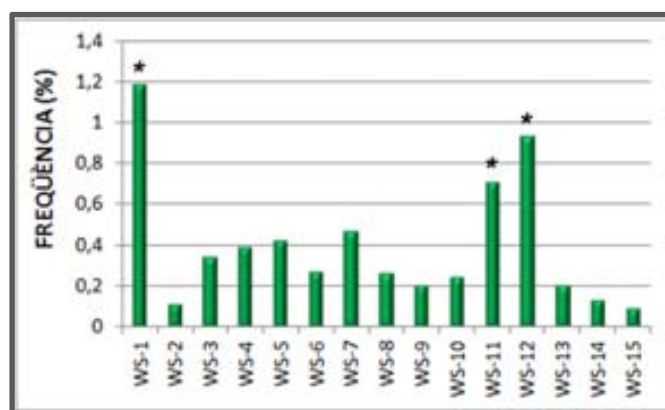


FIGURA 4.7: Freqüències de delecions i duplicacions observades en els pares amb descendència afectada per la SWB. Els asteriscs mostren els increments significatius de del+dup respecte a la població control.

Degut a que el nostre estudi esta adreçat a valorar el risc reproductiu en la línia germinal masculina, per realitzar les comparacions poblacionals només es van tenir en compte aquells casos on es va poder provar l'origen patern de les delecions en la descendència (Taula 4.8). En aquest subgrup, la freqüència mitjana (\pm SEM) de delecions va ser de 0.10% \pm 0.02 (rang: 0.04%-0.15%) i la freqüència mitjana (\pm SEM) de duplicacions va ser de 0.14% \pm 0.04 (rang: 0.07%-0.27%).

CASOS	Edat	7q11.23					total
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^a	
WS-2	54	10000 (99.49%)	4 (0.04%)	7 (0.07%)	11 (0.11%)	32 (0.32%)	10043
WS-5	33	9939 (98.6%)	15 (0.15%)	27 (0.27%)	42 (0.42%)	75 (0.75%)	10056
WS-8	42	9950 (99.02%)	9 (0.09%)	17 (0.17%)	26 (0.26%)	39 (0.39%)	10015
WS-13	37	9980 (99.08%)	12 (0.12%)	8 (0.08%)	20 (0.20%)	52 (0.52%)	10052
% \pm SEM		99.04 \pm 0.14	0.10 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04	0.25 \pm 0.07	0.50 \pm 0.09	

a Disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI

TAULA 4.8: Resultats de l'anàlisi de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SWB d'origen patern.

No es va observar un increment poblacional de del+dup de la regió 7q11.23 en els pares amb descendència afectada per la WBS en relació a la població control ($P=0.188$). Pel que fa a les comparacions individuals, no es varen observar increments significatius de del+dup en cap dels 4 pares amb descendència afectada per la SWB d'origen patern ($P>0.01$).

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTADA PER LA SÍNDROME DE DIGEORGE

Es van analitzar un total de 100813 nuclis d'espermatozoides en la població de 10 individus amb descendència afectada per la SDG. L'origen parental de la delecio causant de la SDG va ser establert en 8 dels 10 casos analitzats (Annex). Cinc dels individus van resultar ser pares amb descendència afectada per la SDG d'origen patern (DG-1, DG-2, DG-3, DG-8 i DG-10; Taula 4.9).

Es van observar increments significatius de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en 2 dels 10 individus analitzats ($P<0.01$; Taula 4.9; Figura 4.8). L'origen parental va poder ser establert en un cas (DG-2) i va resultar ser patern (taula 4.9).

4. RESULTATS

CASOS	Edat	22q11.2					total	ORIGEN PARENTAL
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^b		
DG-1	39	10000 (99.19%)	24 (0.24%)	11 (0.11%)	35 (0.35%)	47 (0.47%)	10082	patern
DG-2	48	10000 (98.40%)	57 (0.57%) ^a	20 (0.20%)	77 (0.77%)*	86 (0.86%)	10163	patern
DG-3	-	9927 (99.09%)	19 (0.19%)	13 (0.13%)	32 (0.32%)	59 (0.59%)	10018	patern
DG-4	43	10000 (99.30%)	15 (0.15%)	7 (0.07%)	22 (0.22%)	49 (0.49%)	10071	NA
DG-5	48	9965 (99.28%)	15 (0.15%)	10 (0.10%)	25 (0.25%)	47 (0.47%)	10037	matern
DG-6	36	10096 (98.87%)	52 (0.52%) ^a	12 (0.12%)	64 (0.64%)*	51 (0.51%)	10211	NA
DG-7	30	10000 (99.24%)	28 (0.28%) ^a	5 (0.05%)	33 (0.33%)	43 (0.43%)	10076	matern
DG-8	39	10000 (99.34%)	18 (0.18%)	7 (0.07%)	25 (0.25%)	41 (0.41%)	10066	patern
DG-10	33	9948 (99.31%)	13 (0.13%)	10 (0.10%)	23 (0.23%)	46 (0.46%)	10017	patern
DG-11	37	9930 (98.59%)	25 (0.25%)	16 (0.16%)	41 (0.41%)	31 (0.31%)	10072	matern

*Incrementos significatius en relació a la població control (P<0.01)

^a Incrementos significatius de delecions respecte a duplicacions (P<0.01)

^b Disomies, diploidies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI

NA, no avaluat

TAULA 4.9: Resultats individuals de l'anàlisi de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SDG i origen parental de la síndrome en la descendència.

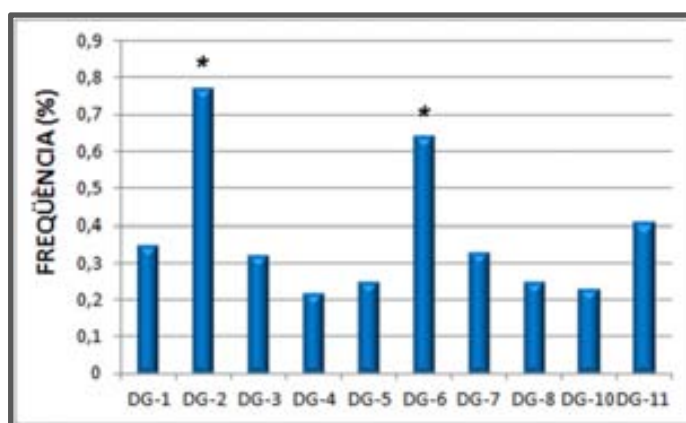


FIGURA 4.8: Freqüències de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 observades en els pares amb descendència afectada per la SDG. Els asteriscs mostren els increments significatius de del+dup respecte a la població control.

Tenint en compte els casos d'origen patern (Taula 4.10), la freqüència mitjana (\pm SEM) de delecions va ser $0.26\% \pm 0.08$ (rang: 0.13%-0.57%) i la freqüència mitjana (\pm SEM) de duplicacions va ser $0.12\% \pm 0.02$ (rang: 0.07%-0.20%).

No es va observar un increment poblacional de del+dup en relació a la població control (P=0.129). Pel que fa a les comparacions individuals, es varen observar increments significatius en un dels cinc pares amb descendència afectada per la SWB d'origen patern (P>0.01).

CASOS	Edat	22q11.2					
		normals	delecions	duplicacions	del+dup	altres ^b	total
DG-1	39	10000 (99.19%)	24 (0.24%)	11 (0.11%)	35 (0.35%)	47 (0.47%)	10082
DG-2	48	10000 (98.40%)	57 (0.57%) ^a	20 (0.20%)	77 (0.77%)*	86 (0.86%)	10163
DG-3		9927 (99.09%)	19 (0.19%)	13 (0.13%)	32 (0.32%)	59 (0.59%)	10018
DG-8	39	10000 (99.34%)	18 (0.18%)	7 (0.07%)	25 (0.25%)	41 (0.41%)	10066
DG-10	33	9948 (99.31%)	13 (0.13%)	10 (0.10%)	23 (0.23%)	46 (0.46%)	10017
% ± SEM		99.07 ± 0.17	0.26 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.38 ± 0.10	0.56 ± 0.08	

*Incrementos significatius en relació a la població control (P<0.01)

^a Incrementos significatius de delecions en relació a duplicacions (P<0.01)

^b Disomies, diploïdies, nul·lisomies, desdoblaments de les sondes LSI

TAULA 4.10: Resultats de l'anàlisi de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SDG d'origen patern.

4.2.3. FREQUÈNCIA GENERAL DE NAHR

Es van realitzar estudis de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 22q11.2 en els individus amb descendència afectada per la SPW, de les regions 15q11-q13 i 22q11.2 en els individus amb descendència afectada per la SWB i de les regions 7q11.23 i 15q11-q13 en els individus amb descendència afectada per la SDG.

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTADA PER LA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Es van analitzar un total de 323571 espermatozoides en la població dels 16 pares amb descendència afectada per la SPW: 161921 espermatozoides per la regió 7q11.23 i 161650 espermatozoides per la regió 22q11.2.

La freqüència mitjana (\pm SEM) de delecions de la regió 7q11.23 va ser 0.34% \pm 0.09 (rang: 0.09%-1.57%) i la freqüència mitjana de duplicacions (\pm SEM) va resultar 0.16% \pm 0.04 (rang: 0.05%-0.60%) (Taula 4.9). Pel que fa a la regió 22q11.2, la freqüència mitjana (\pm SEM) de delecions i duplicacions va ser del 0.28% \pm 0.07 (rang: 0.10%-1.31%) i 0.16% \pm 0.02 (rang: 0.07%-0.45%) respectivament (Taula 4.11).

Es va observar un increment significatiu de del+dup de la regió 22q11.2 respecte a la població control (0.44% \pm 0.09 vs 0.27% \pm 0.07; P=0.014). Per contra, la freqüència mitjana de del+dup de la regió 7q11.23 no va mostrar increments significatius (0.50% \pm 0.12 vs 0.37% \pm 0.02; P=1.000)(Figura 4.9).

CASOS	7q11.23				22q11.2			
	del	dup	del+dup	total	del	dup	del+dup	total
PW-1	63 (0.62%)	39 (0.38%)	102 (1.01%)*	10202	15 (0.15%)	15 (0.15%)	30 (0.30%)	10046
PW-2	38 (0.37%) ^a	17 (0.16%)	55 (0.53%)*	10232	20 (0.20%)	14 (0.14%)	34 (0.34%)	10087
PW-3	23 (0.23%)	24 (0.24%)	47 (0.47%)	10201	10 (0.10%)	12 (0.12%)	22 (0.22%)	10116
PW-4	10 (0.1%)	9 (0.09%)	19 (0.19%)	10055	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	10091
PW-5	47 (0.46%) ^a	11 (0.11%)	58 (0.57%)*	10195	41 (0.41%) ^a	16 (0.16%)	57 (0.57%)*	10156
PW-6	14 (0.14%)	6 (0.06%)	20 (0.20%)	10117	12 (0.12%)	14 (0.14%)	26 (0.26%)	10104
PW-7	12 (0.12%)	16 (0.16%)	28 (0.28%)	10109	20 (0.20%)	10 (0.10%)	30 (0.30%)	10155
PW-8	27 (0.27%)	11 (0.11%)	38 (0.38%)	10102	16 (0.16%)	7 (0.07%)	23 (0.23%)	10073
PW-9	9 (0.09%)	5 (0.05%)	14 (0.14%)	10132	16 (0.16%)	16 (0.16%)	32 (0.32%)	10108
PW-10	157 (1.57%) ^a	60 (0.6%)	217 (2.17%)*	10008	132 (1.31%) ^a	45 (0.45%)	177 (1.76%)*	10040
PW-11	38 (0.38%) ^a	9 (0.09%)	47 (0.47%)	10082	18 (0.18%)	13 (0.13%)	31 (0.31%)	10095
PW-13	23 (0.23%)	9 (0.09%)	32 (0.32%)	10038	22 (0.22%)	12 (0.12%)	34 (0.34%)	10066
PW-14	10 (0.1%)	5 (0.05%)	15 (0.15%)	10095	16 (0.16%)	12 (0.12%)	28 (0.28%)	10096
PW-15	11 (0.11%)	9 (0.09%)	20 (0.20%)	10074	51 (0.51%) ^a	22 (0.22%)	73 (0.73%)*	10156
PW-16	47 (0.46%) ^a	19 (0.19%)	66 (0.66%)*	10153	24 (0.24%)	23 (0.23%)	47 (0.47%)	10114
PW-17	17 (0.17%)	12 (0.12%)	29 (0.29%)	10126	19 (0.19%)	15 (0.15%)	34 (0.34%)	10147
% ± SEM	0.34 ± 0.09	0.16 ± 0.04	0.50±0.12		0.28 ± 0.07	0.16 ± 0.02	0.44±0.09	

*Incrementos significatius en relació a la població control (P<0.01)

^a Incrementos significatius de delecions en relació a duplicacions (P<0.01)

TAULA 4.11: Resultats de les anàlisis de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 22q11.2 en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SPW.

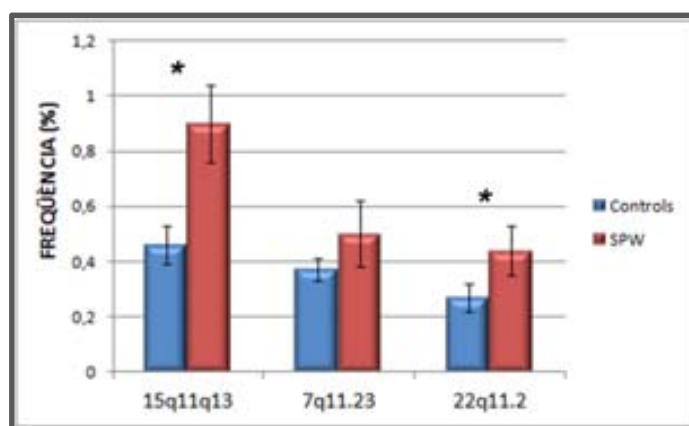


FIGURA 4.9: Freqüències mitjanes de delecions i duplicacions de les tres regions analitzades en la població control i en els pares amb descendència afectada per la SPW. Les barres d'error mostren l'error estàndard de la mitjana (SEM). Els asteriscs indiquen les diferències significatives (P<0.05).

Es van observar diferències significatives en les freqüències de del+dup de les diferents regions analitzades (15q11-q13, 7q11.23 i 22q11.2; 0.90%±0.14, 0.50%±0.12 i 0.44%±0.09,

respectivament) ($P=0.0001$). Amb l'objectiu de veure entre quines regions es produeixen aquestes diferències significatives, es van realitzar comparacions dos a dos de les freqüències mitjanes de del+dup (Taula 4.12). Es van observar diferències significatives en la freqüència de del+dup entre les regions 15q11-q13 i 7q11.23 ($P=0.001$) i les regions 15q11-q13 i 22q11.2 ($P=0.0001$). A més, es van observar correlacions significatives de del+dup entre les regions 15q11-q13 i 7q11.23 ($r=0.868$; $P=0.022$) i les regions 15q11-q13 i 22q11.2 ($r=0.890$; $P=0.002$).

del+dup	Comparacions ^a	Correlacions ^b
15q11-q13 i 7q11.23	$P=0.001^*$	$r=0.868$; $P=0.022^*$
15q11-q13 i 22q11.2	$P=0.0001^*$	$r=0.890$; $P=0.002^*$
7q11.23 i 22q11.2	$P=0.378$	$P=0.194$

*Comparacions significatives

^a Test de Wilcoxon

^b Correlació de Pearson

TAULA 4.12: Comparacions i correlacions de les freqüències de del+dup de les regions analitzades en la població de pares amb descendència afectada per la SPW.

Les comparacions individuals van mostrar increments significatius de del+dup de la regió 7q11.23 en 5 dels 16 casos analitzats ($P<0.01$; Taula 4.11 i Figura 4.10a) i increments significatius de del+dup de la regió 22q11.2 en 3 dels 16 casos analitzats ($P<0.01$; Taula 4.11 i Figura 4.10a). És important destacar que tots els casos que van presentar increments significatius de del+dup per alguna d'aquestes dues regions o les dues alhora van ser prèviament descrits com individus de risc per presentar increments significatius de del+dup de la regió 15q11-q13 respecte la població control (apartat 4.2.1; **Treball 1**).

Es va realitzar un anàlisi de conglomerats jeràrquics que va agrupar els diferents individus en funció de les similituds que presentaven per les freqüències de del+dup de les tres regions analitzades en un dendrograma (Figura 4.10b).

El dendrograma va separar l'individu PW-10 de la resta a una distància d'associació de 25; aquest cas mostrava freqüències incrementades de del+dup per totes les regions analitzades en un grau molt superior a la resta de casos estudiats. A part de l'individu PW-10, el dendrograma va mostrar dos grups clarament diferenciats a una distància d'associació de 5:

- Grup 1 (distància d'associació <5). Format per individus que no presentaven increments significatius per cap regió (PW-9, PW-14, PW-4, PW-8, PW-11), o que presentaven increments moderats de la regió 15q11-q13 (PW-6, PW-7) o de les regions 15q11-q13 i 22q11.2 (PW-15).

- Grup 2 (distància d'associació <5). Format per individus que presentaven increments significatius de la regió 15q11-q13 i amb freqüències considerablement més elevades que les observades per les del+dup de les altres regions analitzades (PW-13 i PW-17) i individus que presentaven increments significatius per dos o més regions analitzades (PW-2, PW-5, PW-16 i PW-1).

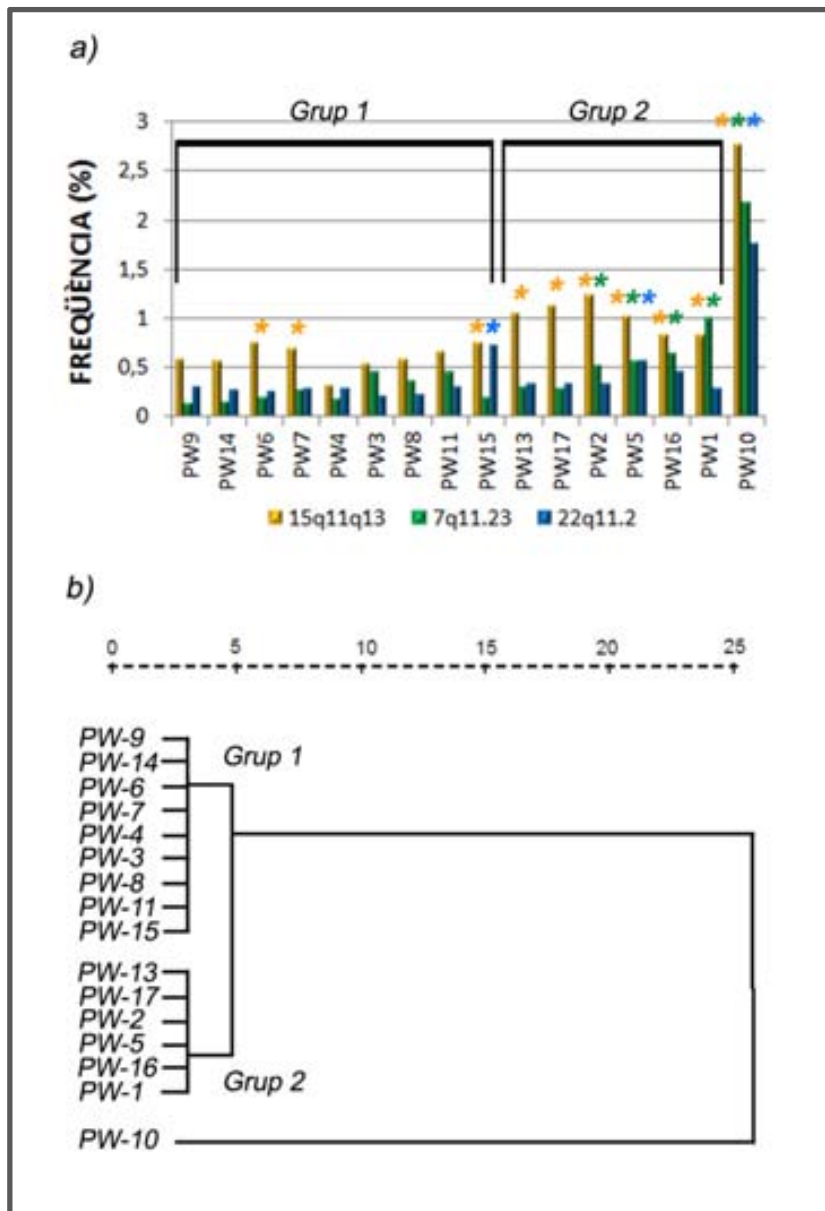


FIGURA 4.10: a) Freqüències de delecions i duplicacions observades per cadascuna de les regions analitzades en els parets amb descendència afectada per la SPW (els asteriscs mostren els increments de del+dup respecte la població control de cada regió), b) Anàlisi de conglomerats jeràrquics pels patrons de NAHR.

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN I DIGEORGE/VELOCARDIOFACIAL

En els pares que presentaven increments d'anomalies per les regions 7q11.23 (WS-1, WS-11 i WS-12) i 22q11.2 (DG-2 i DG-6), es varen analitzar les freqüències d'anomalies per les altres dues regions.

Es van analitzar un total de 60293 espermatozoides en els tres casos de pares amb descendència afectada per la SWB: 30223 espermatozoides per la regió 15q11-q13 i 30070 espermatozoides per la regió 22q11.2 (Taula 4.13). Es van observar increments significatius de del+dup de la regió 15q11-q13 en dos individus (WS-1 i WS-11) respecte als valors observats en la població control i increments significatius de del+dup de la regió 22q11.2 en un sol cas (WS-1) ($P < 0.01$).

CASOS	Edat	15q11-q13				22q11.2			
		del	dup	del+dup	total	del	dup	del+dup	total
WS-1	61	37 (0.37%)	28 (0.28%)	65 (0.65%)*	10011	73 (0.73%) ^a	17 (0.17%)	90 (0.90%)*	10010
WS-11	36	71 (0.70%) ^a	12 (0.12%)	83 (0.82%)*	10093	22 (0.22%)	20 (0.20%)	42 (0.42%)	10019
WS-12	39	32 (0.32%) ^a	10 (0.10%)	42 (0.42%)	10119	32 (0.32%) ^a	12 (0.12%)	44 (0.44%)	10041

*Incrementos significatius respecte a la població control ($P < 0.01$)

^a Incrementos significatius de delecions respecte duplicacions ($P < 0.01$)

TAULA 4.13: Resultats de l'anàlisi de delecions i duplicacions de les regions 15q11-q13 i 22q11.2 en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SWB amb increments significatius de del+dup de la regió 7q11.23.

Es van analitzar un total de 40469 espermatozoides en els dos casos de pares amb descendència afectada per la SDG: 20309 espermatozoides per la regió 15q11-q13 i 20160 espermatozoides per la regió 7q11.23 (Taula 4.14). Es van observar increments significatius de del+dup de la regió 15q11-q13 en un individu (DG-2) respecte als valors observats en la població control i increments significatius de del+dup de la regió 7q11.23 en els dos individus analitzats ($P < 0.01$).

CASOS	Edat	15q11-q13				7q11.23			
		del	dup	del+dup	total	del	dup	del+dup	total
DG-2	48	82 (0.81%) ^a	39 (0.38%)	121 (1.19%)*	10159	40 (0.40%) ^a	14 (0.14%)	54 (0.54%)*	10084
DG-6	36	34 (0.33%)	25 (0.25%)	59 (0.59%)*	10150	29 (0.29%)	25 (0.25%)	54 (0.54%)*	10076

*Incrementos significatius respecte a la població control ($P < 0.01$)

^a Incrementos significatius de delecions respecte duplicacions ($P < 0.01$)

TAULA 4.14: Resultats de l'anàlisi de delecions i duplicacions de les regions 15q11-q13 i 7q11.23 en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SDG amb increments significatius de del+dup de la regió 22q11.2.

4.2. EFECTE DE L'EDAT

En la població control no es va observar una correlació positiva significativa entre el total de delecions i duplicacions (suma de del+dup de les tres regions analitzades) i l'edat dels individus ($P=0.545$).

No es va observar una correlació significativa entre la freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13 i l'edat dels individus de la població control ($P=0.743$).

Els pares amb descendència afecta per la SPW no van presentar una correlació significativa entre del+dup ni inversions de la regió 15q11-q13 amb l'edat ($P=0.354$ i $P=0.519$, respectivament).

En els pares amb descendència afecta per la SW i la SDG, la mida mostral no ens va permetre establir correlacions entre la freqüència d'anomalies i l'edat. Tot i això, la majoria dels individus que mostraven increments significatius de del+dup en espermatozoides es trobaven en el rang intermedi d'edat (WS.11, WS-12 i DG-6; Taules 4.7 i 4.9).

4.3. ANÀLISI COMPARATIU DE LES FREQUÈNCIES DE DELECIONS, DUPLICACIONS I INVERSIONS

4.3.1. REGIÓ 15q11-q13

No es van observar diferències significatives entre la freqüència de delecions i la freqüència de duplicacions de la regió 15q11-q13 en la població control ($P=0.609$; Figura 4.11a). Cap dels individus analitzats presentava diferències significatives entre ambdues anomalies ($P>0.01$).

En els individus amb descendència afecta per la SPW, la freqüència mitjana de delecions va ser significativament més elevada que la freqüència mitjana de duplicacions ($P=0.001$, Figura 4.11a). Les comparacions individuals entre les freqüències de delecions i les freqüències de duplicacions van mostrar increments significatius de delecions en 7 dels 16 pares analitzats ($P<0.01$; Taula 4.5; Figura 4.11b). És important destacar que tots els casos excepte un (PW-14) coincidien amb els individus que mostraven increments significatius de del+dup de la regió 15q11-q13 (Taula 4.5).

Les freqüències d'inversions varen ser un grau de magnitud més elevades que les freqüències de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13, tant el l'anàlisi poblacional com en l'anàlisi individual.

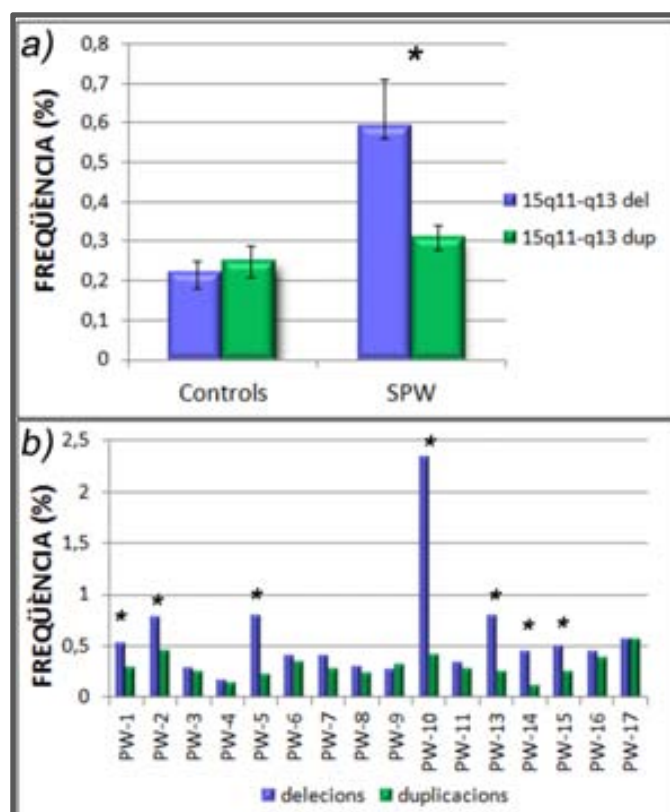


FIGURA 4.11: **a)** Freqüències mitjanes de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 observades en la població control i en els pares amb descendència afectada per la SPW. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (SEM), **b)** Freqüències de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 observades en cadascun dels pares amb descendència afectada per la SPW. L'asterisc mostra els increments significatius entre la freqüència de delecions i de duplicacions ($P < 0.01$).

4.3.2. REGIÓ 7q11.23

En els individus control, no es van observar diferències significatives entre la freqüència de delecions i la freqüència de duplicacions de la regió 7q11.23, ni en l'anàlisi poblacional ($P = 0.202$) ni en les valoracions individuals ($P > 0.01$).

En els individus amb descendència afectada per la SWB, només en aquells casos en que es va observar un increment significatiu de del+dup en relació a la població control (WS-1, WS-11 i WS-12; $P < 0.01$), la freqüència de delecions va ser significativament més elevada que la freqüència de duplicacions (Figura 4.12).

4.3.3. REGIÓ 22q11.2

Es va observar un increment significatiu en la freqüència de delecions respecte a la freqüència de duplicacions en la població control ($P = 0.032$). Tot i això, les comparacions individuals no van mostrar increments significatius en cap dels individus analitzats ($P > 0.01$).

4. RESULTATS

En els individus amb descendència afecta per la SDG, la freqüència de delecions va ser significativament més elevada que la freqüència de duplicacions en els dos individus que presentaven increments significatiu d'anomalies en espermatozoides (DG-2 i DG-6) i en un individu amb valors normals de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 (DG-7; $P < 0.01$) (Figura 4.13).

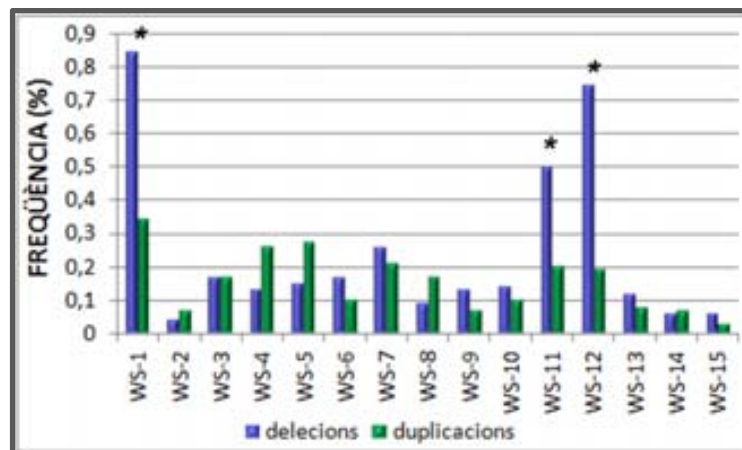


FIGURA 4.12: Freqüències de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 observades en cadascun dels pares amb descendència afecta per la SWB. L'asterisc mostra els increments significatius entre la freqüència de delecions i duplicacions ($P < 0.01$).

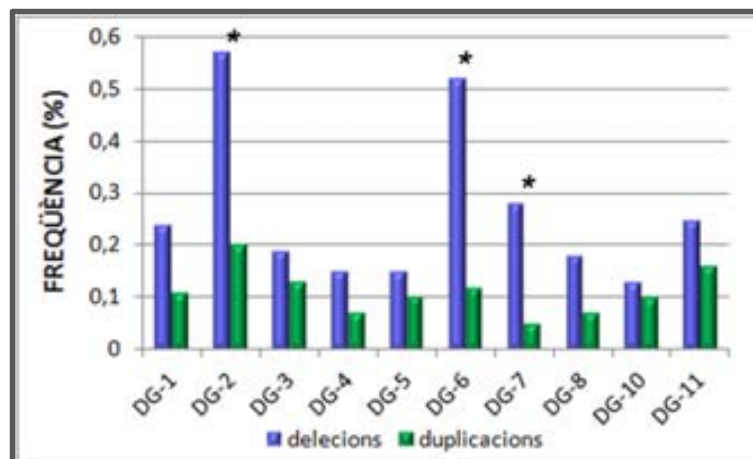


FIGURA 4.13: Freqüències de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 observades en cadascun dels pares amb descendència afecta per la SDG. L'asterisc mostra els increments significatius entre la freqüència de delecions i la freqüència de duplicacions ($P < 0.01$).

4.4. MAPATGE DEL LCR22-2 MITJANÇANT FIBER-FISH

4.4.1. POSICIONAMENT DELS CLONS

Prèviament a la seva aplicació sobre fibres de cromatina, les sondes obtingudes a partir dels clons utilitzats en aquest estudi es varen hibridar sobre metafases control per confirmar el seu posicionament (**Treball 4**).

Totes les sondes van mostrar senyals específics localitzats a la regió pericentromèrica del cromosoma 22 i no es varen observar senyals d'hibridació en altres cromosomes (Figura 4.14).

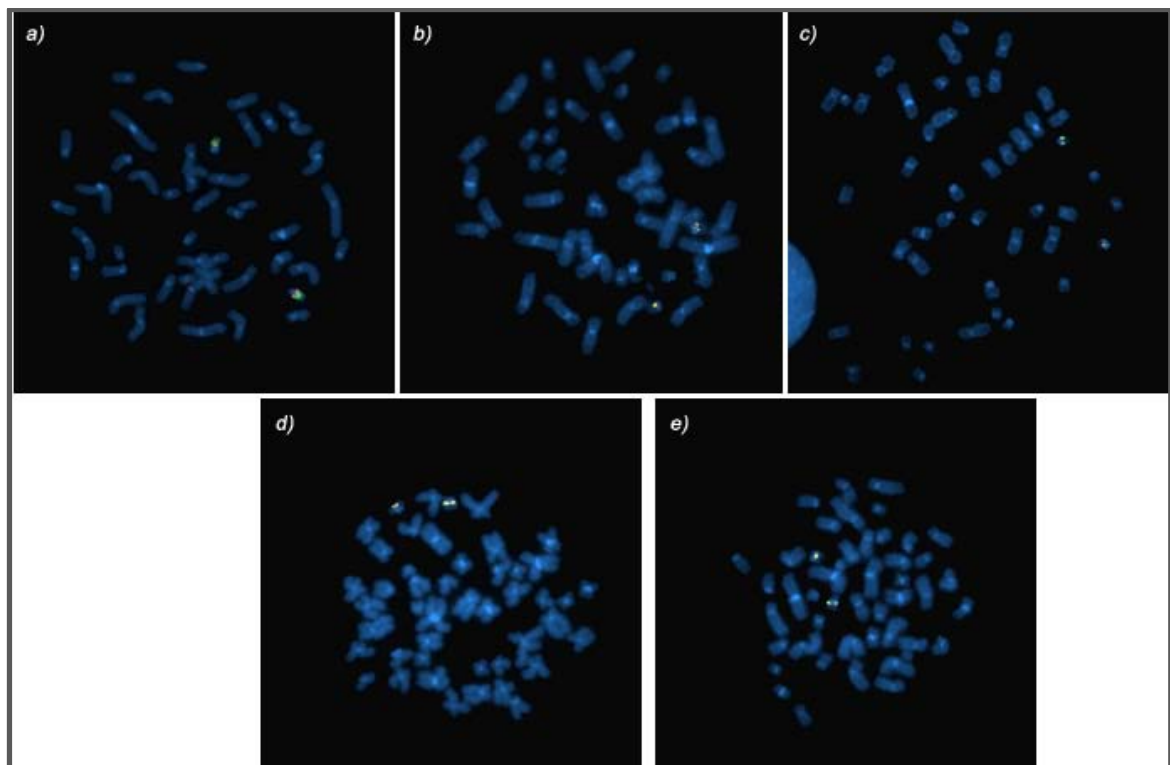


FIGURA 4.14: **a)** RP11-66F9 (vermell) i sonda de pintat cromosòmic pel cromosoma 22 (verd), **b)** RP11-66F9 (vermell) i WI2-938L9 (verd), **c)** RP11-66F9 (vermell) i WI2-1268B22 (verd), **d)** WI2-938L9 (vermell) i WI2-451K3 (verd) i **e)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-1822L21 (verd).

4.4.2. ESTRUCTURA DEL LCR22-2

El disseny experimental per estudiar l'arquitectura genòmica del LCR22-2 mitjançant *Fiber-FISH* es va realitzar mitjançant diferents co-hibridacions que van permetre:

1. Identificar de forma inequívoca els senyals corresponents al LCR22-2: Per distingir els senyals d'hibridació específics del LCR22-2 d'altres senyals corresponents a còpies paràlogues localitzades a 22q, es va utilitzar com a control de posició el BAC RP11-66F9 (de

localització proximal al LCR22-2) i es va hibridar amb el fòsmid WI2-451K3. Una vegada establert el patró específic de repeticions del clon WI2-451K3, aquest fòsmid es va utilitzar com a referència en les hibridacions posteriors.

2. Determinar l'arquitectura genòmica del LCR22-2: es van realitzar tres *Fiber-FISH* de dos colors mitjançant co-hibridacions dels fòsmids WI2-451K3 i WI2-938L9, WI2-451K3 i WI2-1268B22, i WI2-1268B22 i WI2-1822L21.

LÍNIA CEL·LULAR A

Es van capturar i analitzar un total de 68 imatges informatives de *Fiber-FISH* per determinar l'estructura del LCR22-2 en la línia cel·lular A.

- RP11-66F9 i WI2-451K3 (n=20): Es va observar un senyal d'hibridació més llarg corresponent al clon RP11-66F9 seguit o precedit de un patró repetitiu de cinc senyals corresponents a WI2-451K3. Els senyals corresponents a RP11-66F9 es van observar separats (55%; Figura 4.15a) o solapats (45%; Figura 4.15b) amb el primer senyal de WI2-451K3.
- WI2-451K3 i WI2-938L9 (n=17): Es va observar el mateix patró per WI2-451K3. A més, es van identificar cinc senyals per WI2-938L9 que es trobaven solapats total o parcialment amb els senyals corresponents a WI2-451K3 (Figura 4.15c).
- WI2-451K3 i WI2-1268B22 (n=21): Es van observar senyals solapats o parcialment solapats per aquestes dues sondes. Els resultats van mostrar dos patrons diferents per WI2-1268B22, amb dos o tres senyals (52.4% i 47.6% respectivament; Figura 4.15d i e).
- WI2-1268B22 i WI2-1822L21 (n=10): Es van observar dos o tres senyals corresponents a WI2-1268B22 (60% i 40% respectivament) seguits/precedits per un sol senyal de WI2-1822L21 (Figura 4.15f i g).

Amb l'objectiu de determinar si les diferents posicions del BAC RP11-66F9 en relació amb els senyals corresponents a WI2-451K3 poden ser degudes a la presència d'una inversió es va realitzar una *Fiber-FISH* de tres colors utilitzant els clons RP11-66F9, WI2-451K3 i WI2-1822L21. Es van observar dos patrons de senyals d'hibridació amb la mateixa freqüència suggerint la presència d'una inversió que implica gran part del LCR22-2: 1) RP11-66F9 seguit de WI2-451K3 i WI2-1822L21 (42.8%, Figura 4.16a), i 2) RP11-66F9 seguit per WI2-1822L21 i WI2-451K3 (57.1%; Figura 4.16b). Per relacionar aquesta inversió amb el número de senyals d'hibridació observats per WI2-1268B22 (Figures 4.15d i e) es va realitzar una *Fiber-FISH* de tres colors utilitzant els clons RP11-66F9, WI2-1268B22 i WI2-1822L21. Es van observar dues distribucions de clons diferents: 1) RP11-66F9, WI2-1268B22 (tres senyals) i WI2-1822L21 (Figura 4.16c), i 2) RP11-

66F9, WI2-1822L21 i WI2-1268B22 (dos senyals) (Figura 4.16d). Aquests resultats van indicar que la inversió segrega amb l'haplotip de dos senyals per WI2-1268B22.

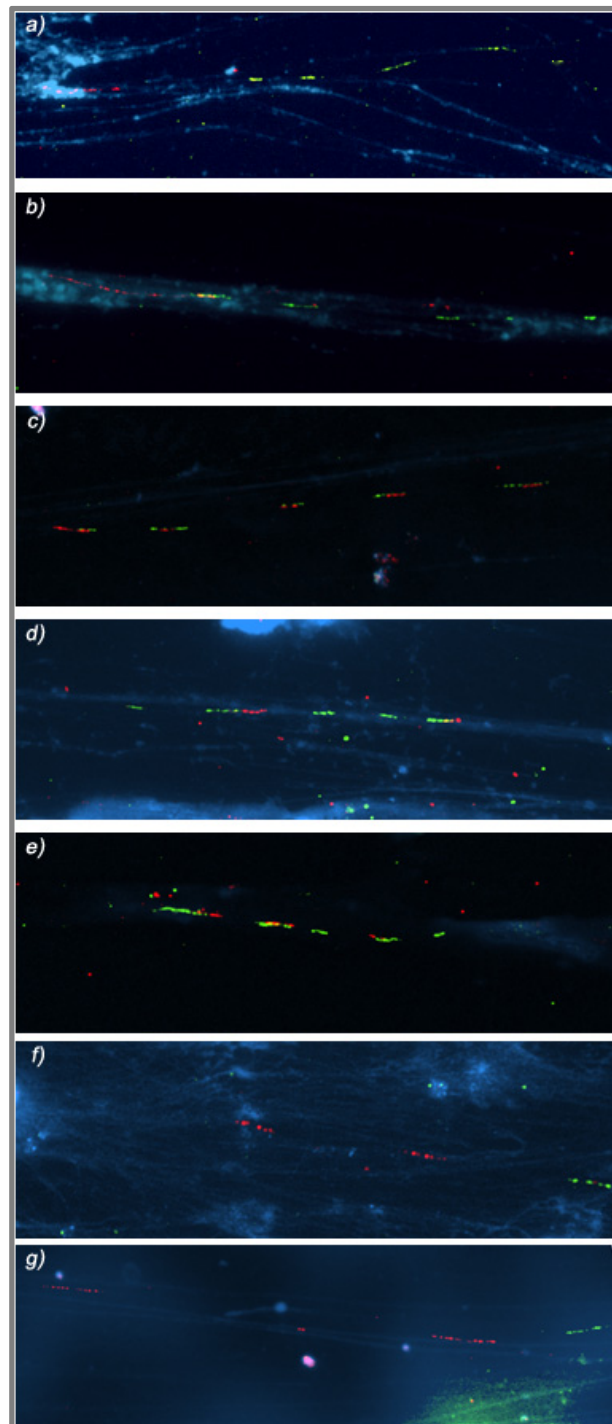


FIGURA 4.15: *Fiber-FISH* de dos colors en la línia cel·lular A. **a)** RP11-66F9 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **b)** RP11-66F9 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **c)** WI2-938L9 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **d)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **e)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **f)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-1822L21 (verd), **g)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-1822L21 (verd).

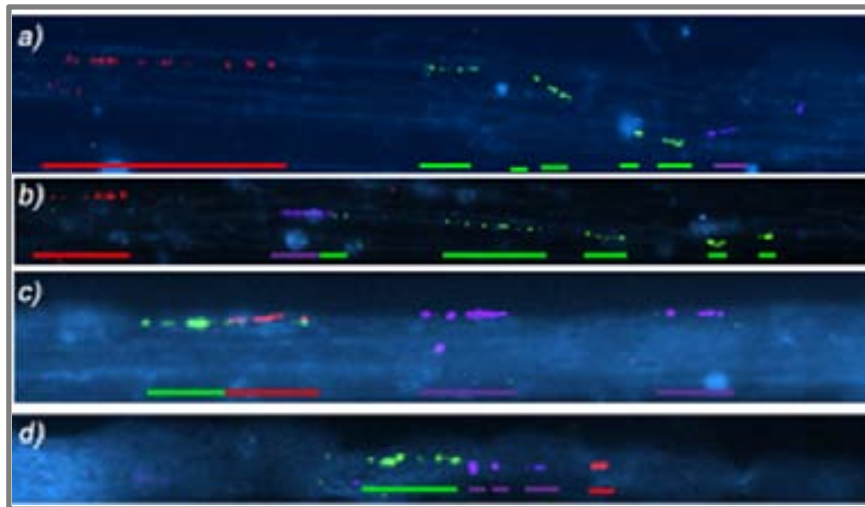


FIGURA 4.16: Detecció de l'haplotip d'inversió en la línia cel·lular A mitjançant *Fiber-FISH* de tres colors. Les línies de colors representen les distribucions de senyals observades per cadascun dels haplotips, **a)** Co-hibridació de RP11-66F9 (vermell), WI2-451K3 (verd) i WI2-1822L21 (lila), distribució de senyals que segueixen l'ordre d'acord amb la llibreria actual del genoma humà; **b)** Co-hibridació de RP11-66F9 (vermell), WI2-451K3 (verd) i WI2-1822L21 (lila), distribució de senyals que es correspon a una inversió el relació amb l'ordre establert en la llibreria actual del genoma humà; **c)** Co-hibridació de RP11-66F9 (verd), WI2-1268B22 (lila) i WI2-1822L21 (vermell), distribució de senyals que segueixen l'ordre d'acord amb la llibreria actual del genoma humà; **d)** Co-hibridació de RP11-66F9 (verd), WI2-1268B22 (lila) i WI2-1822L21 (vermell), distribució de senyals que es correspon a una inversió en relació amb l'ordre establert en la llibreria actual del genoma humà.

LÍNIA CEL·LULAR B

Es van capturar i analitzar un total de 69 fibres informatives per tal de determinar l'estructura del LCR22-2 en la línia cel·lular B.

- RP11-66F9 i WI2-451K3 (n=18): Es varen observar cinc senyals contigus per WI2-451K3 que es trobaven separats d'un senyal corresponent a RP11-66F9 en tots els casos (Figura 4.17a).
- WI2-451K3 i WI2-938L9 (n=20): Es varen observar cinc senyals contigus per WI2-451K3 i cinc senyals solapats o parcialment solapats corresponents a WI2-938L9 (Figura 4.17b).
- WI2-451K3 i WI2-1268B22 (n=14): Es varen observar dos senyals corresponents a WI2-1268B22 parcialment solapats amb el tercer i quart senyal de WI2-451K3 (Figura 4.17c).
- WI2-1268B22 i WI2-1822L21 (n=17): Es varen observar dos senyals per WI2-1268B22 seguits per un senyal corresponent a WI2-1822L21 (Figura 4.17d).

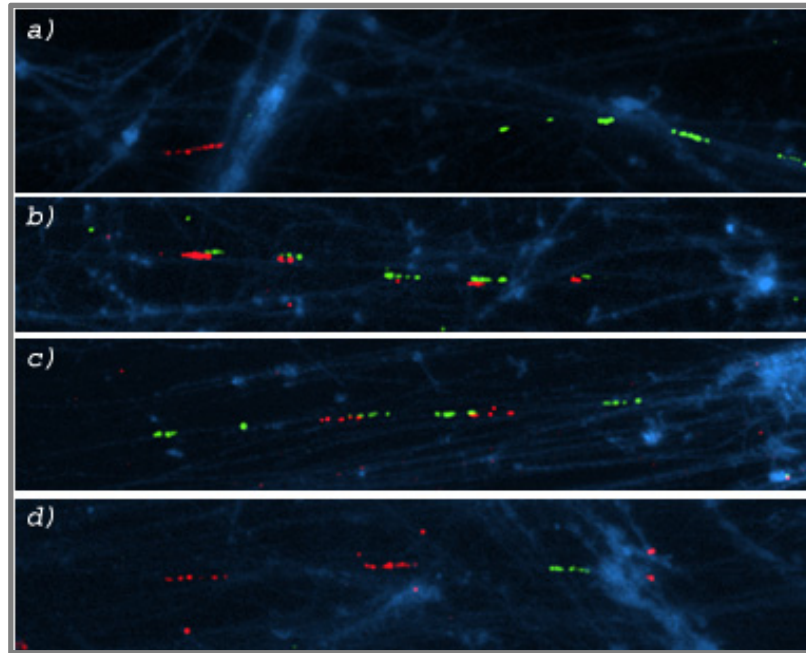


FIGURA 4.17: *Fiber-FISH* de dos colors en la línia cel·lular B. **a)** RP11-66F9 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **b)** WI2-938L9 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **c)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-451K3 (verd), **d)** WI2-1268B22 (vermell) i WI2-1822L21 (verd).

Els resultats obtinguts van permetre proposar un model sobre l'arquitectura genòmica del LCR22-2 en les línies cel·lulars A i B (Figura 4.18). En total es varen observar tres haplotips diferents, dos en la línia cel·lular A (A1 i A2) i un en la línia cel·lular B (B1). Tots presentaven cinc senyals sobreposats o parcialment sobreposats pels clons WI2-938L9 i WI2-451K3. A1 presentava tres senyals pel clon WI2-1268B22 i un senyal per WI2-1822L21 localitzat entre el control de posició (RP11-66F9) i la resta de senyals del LCR22-2. A2 presentava dos senyals pel clon WI2-1268B22 i un senyal per WI2-1822L21 localitzat distalment respecte al control de posició. Per altra banda, B1 presentava dos senyals per WI2-1268B22 i un senyal distal per WI2-1822L21.



FIGURA 4.18: Arquitectura genòmica del LCR22-2 en les dues línies cel·lulars analitzades. Els dos haplotips detectats en la línia cel·lular A es van anomenar A1 i A2, i l'haplotip detectat en la línia cel·lular B es va anomenar B1.

5. PUBLICACIONES

Els resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi han donat lloc a la publicació de 2 articles en revistes científiques internacionals i dues publicacions en procés de revisió.

- **Treball 1:**

DELETIONS AND DUPLICATIONS OF THE 15q11-q13 REGION IN SPERMATOZOA FROM PRADER-WILLI SYNDROME FATHERS

Molina O, Blanco J, Vidal F

Molecular Human Reproduction (2010) 16: 320-328

- **Treball 2:**

SPERM RATES OF 7q11.23, 15q11-q13 AND 22q11.2 DELETIONS AND DUPLICATIONS: A FISH APPROACH

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J

Human Genetics (2011) 129:35-44

- **Treball 3:**

HIGH RATES OF DE NOVO 15q11-q13 INVERSIONS IN HUMAN SPERMATOZOA

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J

Molecular Cytogenetics (en procés de revisió)

- **Treball 4:**

HIGH-RESOLUTION FISH ON DNA FIBERS FOR LOW-COPY REPEATS GENOME ARCHITECTURE STUDIES

Molina O, Blanco J, Anton E, Vidal F, Volpi EV

BMC Genomics (en procés de revisió)

TREBALL 1:

Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers

Molina O, Blanco J, Vidal F

Molecular Human Reproduction (2010): 16: 320-328

Deletions and duplications of the 15q11–q13 region in spermatozoa from Prader–Willi syndrome fathers

O. Molina, J. Blanco, and F. Vidal*

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-935812781; E-mail: francesca.vidal@uab.cat

Submitted on December 7, 2009; resubmitted on January 8, 2010; accepted on January 13, 2010

ABSTRACT: Prader–Willi syndrome (PWS) is a genomic disorder mostly caused by deletions of 15q11–q13 region (70%). It has been suggested that the particular genomic architecture of 15q11–q13 region, characterized to be flanked by low copy repeats, could predispose it to Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR). However, no studies in gametes of fathers of PWS individuals have been published to date. The objective of the study was to assess the incidence of 15q11–q13 deletions and duplications in spermatozoa from PWS fathers and to appraise the value of the data obtained for the estimation of the risk of recurrence for the syndrome. Semen samples from 16 fathers of PWS individuals and 10 control donors, were processed by triple-color fluorescence *in situ* hybridization. A customized combination of probes was used to discriminate between normal, deleted and duplicated sperm genotypes. A minimum of 10 000 sperm were scored for every single sample. A significant increase in the frequency of 15q11–q13 deletions and duplications were observed in PWS fathers ($0.90 \pm 0.14\%$) compared with control donors ($0.47 \pm 0.07\%$). Ten out of 16 individuals contributed to this population increase ($P < 0.01$), suggesting a predisposition for 15q11–q13 reorganizations. Statistical differences were observed in the frequency of 15q11–q13 deletions and duplications in fathers of PWS individuals (0.59 versus 0.31%; $P = 0.001$), indicating that intra-chromatid NAHR exchanges also substantially contribute to the rearrangements. Results demonstrated the increased susceptibility of some fathers of PWS individuals to generate 15q11–q13 deletions, suggesting that the screening of anomalies in sperm should be advisable as a valuable complement for genetic counseling.

Key words: deletions and duplications / microdeletion syndromes / non-allelic homologous recombination / spermatozoa

Introduction

The concept of genomic disorder was proposed to describe human diseases caused by DNA reorganizations giving rise to a gain, loss or alteration of dosage-sensitive genes (Lupski, 1998). The number of genetic diseases identified as genomic disorders is increasing continuously (Sharp *et al.*, 2006) and those caused by chromosome deletions are part of these alterations (Ji *et al.*, 2000a). It has been observed that the DNA regions involved in genomic disorders caused by deletions are flanked by low copy repeats (LCR). Several authors have pointed out that the presence of LCR makes them prone to reorganizations (Inoue and Lupski, 2002; Gu *et al.*, 2008).

Prader–Willi syndrome (PWS) is a genomic disorder with an incidence of 1/15 000 newborns. The genetic cause is the lack of expression of paternally inherited 15q11–q13 genes which are under imprinting control. PWS can be caused by different genetic mechanisms: 15q11–q13 deletions (70%), maternal uniparental disomy (UPD; 25%), disruption of the imprinting center (4%) and other chromosome reorganizations that affect the integrity or function of genes within the 15q11–q13 region (1%) (Cassidy *et al.*, 2000).

The 15q11–q13 region is flanked by three LCR (LCR15-1, LCR15-2, LCR15-3) in which most of the deletion breakpoints (BP) in PWS cases take place (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). Two types of deletions have been described according to the proximal BP (Fig. 1). Class I deletions have the proximal breakpoint within LCR15-1 (BP1), although Class II deletions have their breakpoint in LCR15-2 (BP2). Both Class I and Class II deletions have the distal breakpoint predominantly located within the LCR15-3 (BP3; 97%). Class II deletions are the most frequent ones (60%) and represent an ~6.5 Mb loss (Butler *et al.*, 2008). The 15q11–q13 LCRs have an approximate size of 400 kb and are mainly duplications of the gene/pseudogene *HERC2* forming blocks called END-repeats. Recently, the organization of these END-repeats and their orientation in each LCR15 have been established (Fig. 1; Makoff and Flomen, 2007). These blocks have more than 98% homology and act as hot-spots for recombination (Emanuel and Shaikh, 2001). These features favor Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR) between different copies of END-repeats, triggering reorganizations of the critical region (Ji *et al.*, 2000b; Inoue and Lupski, 2002; Stankiewicz and Lupski, 2002).

The orientation in which END-repeats are arranged determines the pairing and the consequent products of NAHR. When the END-repeats are oriented directly, it will give rise to complementary deletions and duplications if the NAHR took place between END-repeats of two chromatids (Fig. 2A.1), or only deletions if a pairing between END-repeats of the same chromatid take place (Fig. 2A.2). The indirect orientation of END-repeats favors the formation of inversions as a result of NAHR, caused by a pairing of END-repeats in the same chromatid (Fig. 2B).

Several studies have suggested that the particular genomic architecture of 15q11–q13 region predisposes it to NAHR phenomena,

triggering different chromosome reorganizations: deletions (Amos-Landgraf *et al.*, 1999), duplications (Kotzot *et al.*, 2000), inversions (Gimelli *et al.*, 2003) and other reorganizations that emphasize the instability in this region (Ungaro *et al.*, 2001; Dennis *et al.*, 2006). Some authors suggest that structural variation within LCR, such as an increase in the number of repetitions in LCR segments, could be the cause of the predisposition to produce deletions in the germ line of some individuals (Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Sharp *et al.*, 2007; Cusco *et al.*, 2008).

Nevertheless, it is considered that the deletions causing PWS, as well as other genomic disorders, have the same recurrence risk as

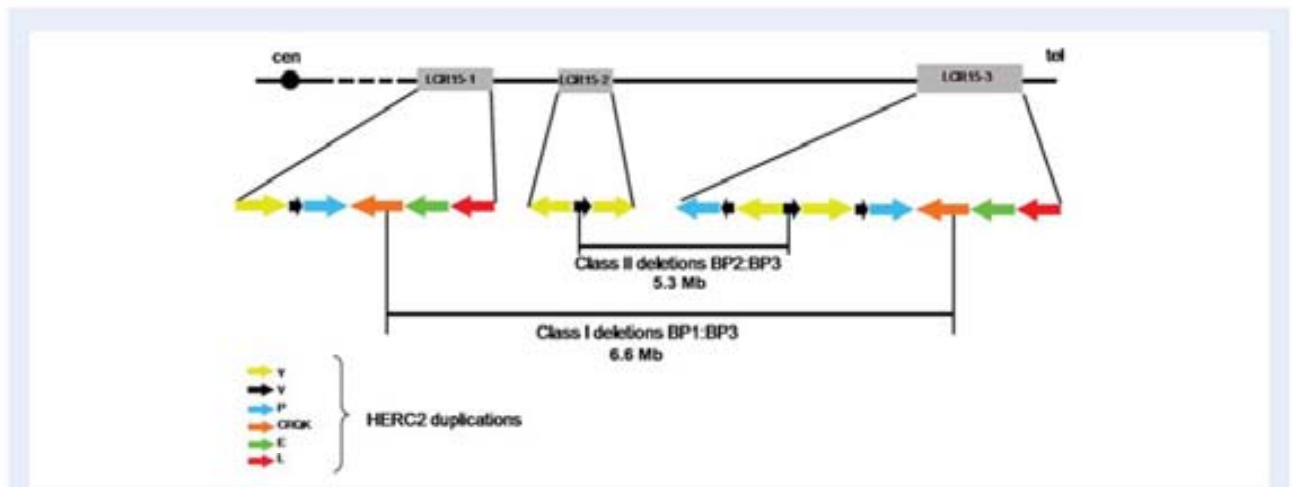


Figure 1 Schematic representation of 15q11–q13 region (Adapted from Makoff and Flomen, 2007). Color arrows represent HERC2 duplications and their orientation within the LCR15.

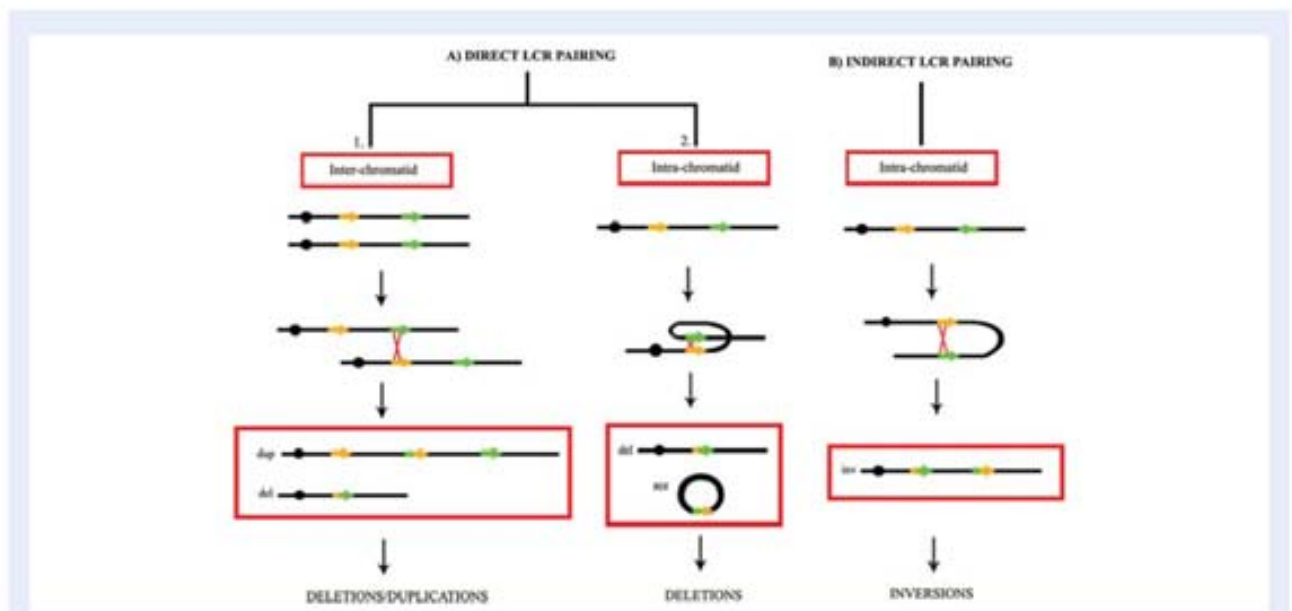


Figure 2 Schematic representation of different classes of NAHR according to the LCR orientation and the chromatids involved. Stable products of each reorganization are shown at the bottom of the figure.

that found in the general population, established from epidemiological studies, to be less than 0.5% (Gardner and Sutherland, 2004). However, population approaches for assessing the recurrence of these types of diseases show some limitations that hamper a reliable estimation of the risk (Rothlisberger and Kotzot, 2007): (i) Most rearrangements are very rare or even unique, (ii) Not all recurrence cases have to be reported and (iii) Families with one affected child might resign from having further children.

Studies in gametes, and especially in spermatozoa, have an advantage in obtaining large numbers of samples, and provide an alternative to studying the frequency of these reorganizations. The use of methodologies that allow fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses in decondensed sperm nuclei enables an approach with high reliability and wide spectrum (Downie et al., 1997; Egozcue et al., 1997) and offers the possibility of direct assessment of gametes carrying deletions and duplications. Furthermore, an interphase analysis technique offers the possibility to analyze, cell by cell, a great number of sperm in the same individual (a great number of NAHR phenomena) and, as a result, assess phenomena that take place in a very low frequency with a high reliability.

The aim of this study was to assess the incidence of 15q11–q13 deletions and duplications in spermatozoa from fathers of PWS individuals. The analysis of the results has allowed the estimation of the recurrence risk for the syndrome and the assessment of the participation of intra or inter-chromatid NAHR in the production of anomalies.

Materials and Methods

Biological samples

Semen samples were obtained from 16 PWS fathers, aged 32–60 years old and 10 control donors of 24–50 years of age. Control donors were volunteers recruited from the general population. All subjects had normal karyotypes and were normozoospermic. To our knowledge, none of them were exposed to genotoxic agents and no history of chemotherapy, radiotherapy or chronic illness was recorded.

Patients gave their informed consent in writing to participate in the study and the protocol was approved by our Institutional Ethics Committee.

Fluorescence *in situ* hybridization

Samples were processed as described previously by our group; details of sperm fixation, nuclear decondensation and FISH protocol have been described elsewhere (Vidal et al., 1993).

A triple-color FISH approach was used to determine the frequency of deletions and duplications of the 15q11–q13 region. We combined a locus-specific probe for the 15q11–q13 region (LSI D15S11, Spectrum Orange; Abott Molecular; Abott Park, IL, USA), a centromeric probe for chromosome 15 (CEP 15p11.2, D15Z1, Spectrum Green; Abott Molecular) and a centromeric probe for chromosome 6 (CEP 6, D6Z1, Spectrum Aqua; Abott Molecular). CEP15 and CEP6 probes were used as hybridization and ploidy control, respectively.

Analyses were carried out using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter and specific filters for Aqua, FITC and Cy3.

A minimum of 10 000 sperm was scored for every single father and control. Samples were analyzed independently by two experienced observers, applying the following assessment criteria:

- (i) Only spermatozoa with a well-defined boundary were evaluated. Overlapping spermatozoa were discarded from the count.
- (ii) According to the number and distribution of the 15q11–q13 signals, the following genotypes were assigned (Fig. 3):
 - Normal: spermatozoa displaying the 15q11–q13 signal and both centromeric signals for chromosomes 15 and 6 (Fig. 3a).
 - Deletion of 15q11–q13 region: spermatozoa lacking the 15q11–q13 signal but displaying the centromeric signals for chromosomes 15 and 6 (Fig. 3b).
 - Duplication of 15q11–q13 region: spermatozoa showing two 15q11–q13 signals, having the same size and intensity and being separated from each other by a distance longer than the diameter of each signal, plus a centromeric signal for chromosomes 15 and 6 (Fig. 3c).
- (iii) In cases of disomy or diploidy, signals must be of the same size and intensity, and the distance between them must be at least the same as the diameter of the signal (Blanco et al., 1996).

Sperm-FISH analyses were performed in a blind manner regarding the genetic origin of the syndrome in the children. These data were provided, once the study in gametes ended, by the Centre de Diagnòstic UDIAT from the Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell, Spain).

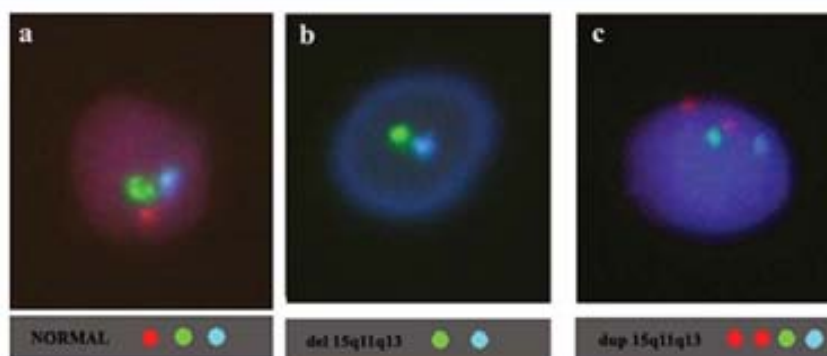


Figure 3 Spermatozoa classification regarding the signal combination observed.

Data analysis

Data were analyzed statistically using SPSS 14.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) under the advice of the statistical service of the Universitat Autònoma de Barcelona.

To assess the participation of the NHAR interchromatid (deletions = duplications) and/or intrachromatid (deletions), in the generation of anomalies three comparisons were performed:

- (i) A Pearson's correlation test of the frequency of 15q11-q13 deletions and duplications in control and PWS father series. The correlation was considered statistically significant when $P < 0.05$.
- (ii) A Wilcoxon test to analyze whether the mean population frequency of 15q11-q13 deletions were different from that of duplications, both in control donors and PWS fathers. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.
- (iii) A χ^2 test to compare, at the individual level, the frequency of 15q11-q13 deletions and duplications. To avoid false positives due to the high number of spermatozoa analyzed per patient, differences were considered to be statistically significant when $P < 0.01$.

To assess the susceptibility of the 15q11-q13 region to generate deletions and duplications, the following statistical analyses were performed:

- (i) The mean population frequency of deletions and the sum of deletions and duplications were compared between controls and PWS fathers by means of a Mann-Whitney test. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.
- (ii) A Pearson's correlation test of the frequency of deletions and duplications and paternal age was performed. Correlation was considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

A total of 101 505 sperm nuclei from the control donors were analyzed (Table I). The mean frequency of 15q11-q13 deletions was 0.22%, ranging from 0.08 to 0.38%, and with a standard deviation of 0.03%. In fathers of PWS individuals, a total of 163 542 sperm nuclei were analyzed (Table II). The mean frequency of 15q11-q13 deletions was 0.59% (± 0.12 SD), ranging from 0.18 to 2.34%. The mean frequency of 15q11-q13 duplications in control donors was

0.24% (± 0.04 SD) ranging from 0.12 to 0.53%. In PWS fathers, the mean frequency of 15q11-q13 duplications was 0.31% (± 0.03 SD), ranging from 0.12 to 0.56%. A significant correlation was found between the frequency of 15q11-q13 deletions and the frequency of duplications in the control population ($P = 0.028$). Moreover, the frequency of 15q11-q13 deletions and duplications did not show statistical differences in the control population ($P = 0.609$). The correlation between the frequency of 15q11-q13 deletions and duplications was not significant in the fathers of PWS individuals, the frequency of deletions being significantly higher than the frequency of duplications ($P = 0.001$; Fig. 4a).

There was no correlation between the percentage of deletions and/or duplication and age, either in controls ($P = 0.381$) or in PWS fathers ($P = 0.329$).

At the individual level, significant differences between the frequency of deletions and duplications were observed in 7 out of 16 fathers analyzed ($P < 0.01$; Table II; Fig. 4b). In all of them, the frequency of deletions was significantly higher. Mean values for the frequency of 15q11-q13 deletions between controls ($0.22 \pm 0.03\%$) and individuals with PWS affected offspring ($0.59 \pm 0.12\%$) showed significant differences ($P = 0.0001$). However, the frequency of 15q11-q13 duplications was equivalent ($P = 0.097$).

When considering deletions and duplications as a whole (del + dup), a significant increase in the frequency of 15q11-q13 del + dup was also observed in fathers of PWS individuals ($0.90 \pm 0.14\%$), as compared with control donors ($0.47 \pm 0.07\%$; $P = 0.002$).

Comparing each father with the control values, moderate significant increases were found for the frequency of 15q11-q13 del + dup in sperm of 10 out of 16 cases analyzed ($P < 0.01$; Table II).

Discussion

Methodological considerations

FISH on decondensed sperm nuclei has been widely used as a tool for cytogenetic studies in spermatozoa (Martin, 2005), mainly involving meiotic segregation analyses in carriers of chromosome

Table I Sperm-FISH results in control donors.

Cases	Age	Normal	del 15q11-q13	dup 15q11-q13	del + dup ^a	Other ^b	Total
C-1	26	10 120 (99.07%)	31 (0.31%)	23 (0.23%)	54 (0.54%)	41 (0.40%)	10 215
C-2	24	10 105 (98.95%)	31 (0.30%)	30 (0.29%)	61 (0.59%)	47 (0.46%)	10 212
C-3	25	10 084 (99.22%)	8 (0.08%)	22 (0.22%)	30 (0.30%)	49 (0.48%)	10 163
C-4	23	10 155 (98.93%)	23 (0.22%)	38 (0.37%)	61 (0.59%)	49 (0.48%)	10 265
C-5	36	10 028 (99.31%)	25 (0.25%)	18 (0.18%)	43 (0.43%)	27 (0.27%)	10 098
C-6	28	10 016 (99.33%)	11 (0.11%)	12 (0.12%)	23 (0.23%)	45 (0.45%)	10 084
C-7	50	10 062 (99.25%)	24 (0.23%)	20 (0.19%)	44 (0.42%)	32 (0.32%)	10 138
C-8	50	10 038 (99.46%)	12 (0.12%)	16 (0.16%)	28 (0.28%)	27 (0.27%)	10 093
C-9	42	10 030 (99.36%)	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	35 (0.35%)	10 095
C-10	26	10 022 (98.82%)	39 (0.38%)	54 (0.53%)	93 (0.91%)	93 (0.91%)	10 142
% \pm SEM		99.17% \pm 0.07	0.22% \pm 0.03	0.24% \pm 0.04	0.47% \pm 0.07	0.38% \pm 0.07	

^a15q11-q13 reorganizations (deletions + duplications).

^bDisomies, diploidies and nullisomies.

Table II Sperm-FISH results in PWS fathers.

Cases	Age	Normal	del 15q11-q13	dup 15q11-q13	del + dup*	Other ^b	Total	Etiology
PW-1	41	10 007 (98.17%)	54 (0.53%)	32 (0.32%)	86 (0.85%)*	51 (0.50%)	10 214	UPD
PW-2	35	9873 (98.42%)	79 (0.79%)	45 (0.45%)	124 (1.24%)*	35 (0.35%)	10 032	Deletion
PW-3	44	10 554 (98.96%)	32 (0.30%)	27 (0.25%)	59 (0.55%)	52 (0.49%)	10 665	Deletion
PW-4	35	10 037 (99.47%)	18 (0.18%)	15 (0.15%)	33 (0.33%)	22 (0.22%)	10 090	Deletion
PW-5	30	9948 (98.57%)	80 (0.80%)	23 (0.23%)	103 (1.03%)*	32 (0.32%)	10 092	Deletion
PW-6	33	10 120 (98.77%)	42 (0.41%)	36 (0.35%)	78 (0.76%)*	48 (0.47%)	10 246	Deletion
PW-7	47	10 061 (99.08%)	43 (0.42%)	28 (0.28%)	71 (0.70%)*	22 (0.22%)	10 154	Unknown
PW-8	50	10 164 (99.07%)	32 (0.31%)	27 (0.26%)	59 (0.57%)	36 (0.35%)	10 259	Deletion
PW-9	60	10 049 (99.16%)	28 (0.28%)	32 (0.32%)	60 (0.60%)	25 (0.25%)	10 134	Deletion
PW-10	60	9867 (96.56%)	239 (2.34%)	43 (0.42%)	282 (2.76%)*	70 (0.68%)	10 219	UPD
PW-11	42	10 549 (99.04%)	37 (0.35%)	30 (0.28%)	67 (0.63%)	35 (0.33%)	10 651	UPD
PW-13	53	9986 (98.32%)	81 (0.80%)	26 (0.26%)	107 (1.06%)*	64 (0.63%)	10 157	Deletion
PW-14	55	10 031 (99.22%)	47 (0.46%)	12 (0.12%)	59 (0.58%)	41 (0.40%)	10 130	UPD
PW-15	47	9918 (98.28%)	51 (0.51%)	26 (0.26%)	77 (0.77%)*	97 (0.96%)	10 092	Deletion
PW-16	44	10 177 (98.85%)	46 (0.45%)	39 (0.39%)	85 (0.84%)*	34 (0.33%)	10 295	Deletion
PW-17		10 020 (98.12%)	59 (0.58%)	57 (0.56%)	116 (1.14%)*	76 (0.74%)	10 212	Unknown
% ± SEM		98.63% ± 0.17	0.59% ± 0.12	0.31% ± 0.03	0.90% ± 0.14	0.45% ± 0.05		

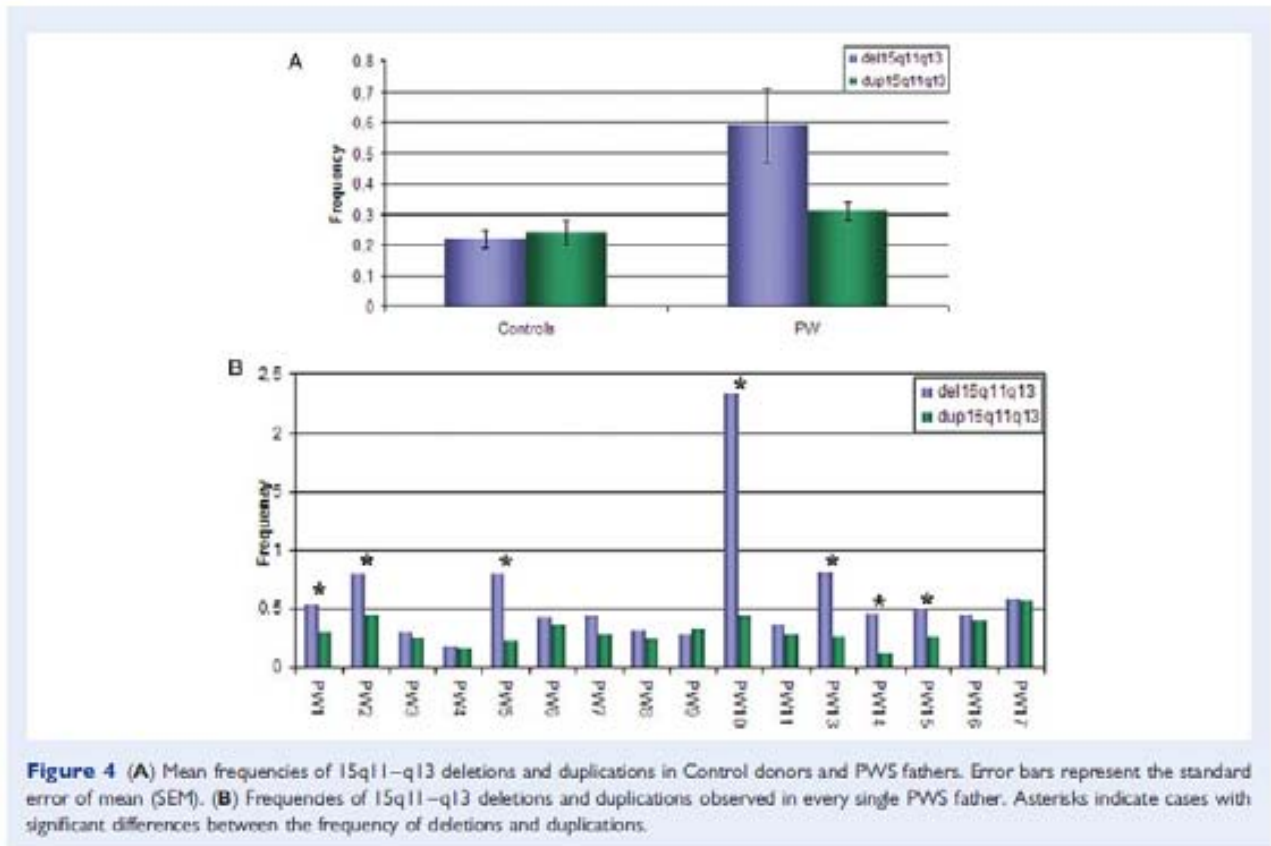
Data on the offspring etiology are shown in the last column.

*15q11-q13 rearrangements (deletions + duplications).

^bDeletions, duplications and nullisomies.

*Significant increases versus control values ($P < 0.01$).

In bold are shown the significant differences between deletions and duplications within the same row ($P < 0.01$).



reorganizations (Anton *et al.*, 2007) as well as aneuploidy rate evaluation in infertile men (Sarrate *et al.*, 2009). The results obtained in our work have proven that it is also a valuable and powerful methodological approach to evaluate the frequency of deletions and duplications in sperm cells, provided that an accurate FISH design is used: probes spanning the region to be examined, control probes for the chromosome involved and a well defined and strict scoring criteria.

In our study, the assessment of deletions and duplications was performed by using a combination of two probes: a centromeric probe for chromosome 15 indicating the presence of this chromosome, and a LSI probe for the 15q11-q13 region. The presence of the centromeric signal and the absence of the LSI probe were identified as deletions. The same experimental design was used for the evaluation of the frequency of duplications of the 15q11-q13 region. Taking scoring criteria into account (Blanco *et al.*, 1996), two signals should be considered as independent if they shown separated by a distance greater than the diameter of each signal. In this sense, it is important to state that the resolution of the FISH technique on interphase nuclei is 100 kb (Andreeff and Pinkel, 1999). Considering that a duplication of the 15q11-q13 region will separate the signals to a distance of ~4 Mb (Fig. 1), a separation far greater than the resolution limit, we were able to clearly distinguish two signals from the LSI probe and thus, to assess duplications of the region.

Starting from the assessment of the control population, the basal frequency of deletions and duplications of the 15q11-q13 region

were established. The results in the control population showed very clearly that there was little variability (Table 1). This suggests a high homogeneity and an optimum hybridization efficiency of the LSI probe used in sperm cells. As a result, data obtained in this work indicate that this technique is also useful in determining the recurrence risk of syndromes caused by deletions of paternal origin and in inferring the type of NAHR involved in the appearance of deletions and duplications in spermatozoa.

Mechanism of origin of deletions and duplications of the 15q11-q13 region

The significant correlation between the frequency of deletions and duplications of the 15q11-q13 region in the control population indicates that inter-chromatid NAHR is the main mechanism originating deletions in these individuals (with complementary deletions and duplications). Thus, as expected for this region, a basal level of NAHR in meiosis can be assumed and established at 0.47%.

In PWS fathers, a significant increase was observed in the frequency of deletions with respect to the frequency of duplications, indicating that intra-chromatid NAHR would also participate in the increase of the frequency of deletions in these individuals. If it is taken into account that the frequency of duplications in PWS fathers is not different from that seen in controls, although the frequency of deletions is significantly greater in the former, our results suggest that

intra-chromatid NAHR would be the mechanism mostly involved in the significant increases of reorganizations of the 15q11–q13 region.

It is well-known that during spermiogenesis, programmed double strand breaks (DSBs) are induced to facilitate the chromatin remodelling that takes place in elongating spermatids (Leduc et al., 2008). It was observed that the proteins involved in the Homologous Recombination (HR) repair machinery are present during this stage of spermatogenesis, pointing out the participation of this DNA repair system in spermatids (Srivastava and Raman, 2007). Our results suggest that 15q11–q13 deletions, which are generated in a higher frequency in PWS fathers, could be triggered at this stage by intra-chromatid NAHR, because only one chromatid is available to repair the DSBs. As this phenomenon was not observed in control donors, our results indicate that these individuals could be susceptible to generating these anomalies, probably related to the presence of specific haplotypes that predispose this region to NAHR.

Susceptibility in generating deletions and duplications of the 15q11–q13 region

In population terms, PWS fathers showed a significant increase of 15q11–q13 del + dup. Ten of the 16 individuals analyzed contributed to this increase. It has been suggested that structural variations, such as inversions of critical regions with similar features (Osborne et al., 2001; Gimelli et al., 2003) or variations in the number of repetitions of the LCRs (Amas-Landgraf et al., 1999; Sharp et al., 2007; Cusco et al., 2008) could be predisposing factors for the appearance of deletions in descendants. These numerical and structural changes could make homologue pairing during the recombination process difficult, thus favoring heterologous pairing with nearby chromosomal segments that share a very high degree of homology, such as is the case of the LCRs. In this way, individuals who are carriers of changes of this type could be susceptible to different degrees to the phenomena of NAHR, and the consequent increase of reorganizations in the region involved.

As regards the comparison of the results obtained in spermatozoa with the PWS etiology, no relation between an increase of deletions and duplications in sperm and the etiology was observed. Furthermore, some of the individuals who show increases of 15q11–q13 del + dup in spermatozoa are fathers with descendants affected by PWS caused by maternal UPD (Table II). Among these is the case with the highest frequency of deletions of all of the series analyzed (PW-10: 2.76%). As has been previously described, LCRs are regions which are susceptible to DSB which increase the processes of HR in the repair these breakages (Baumer et al., 1998; Christian et al., 1999; Gu et al., 2008). A predominance has been described for HR in repairing DSB in the first stages of embryonic development (Essers et al., 2000). LCR pairing of homologous chromosomes to repair by means of HR will generate partial UPDs, which in the case of genes controlled by imprinting will give rise to different pathologies (Feuk et al., 2006). In our situation, a repair process for post-zygote HR could generate the partial UPD of the 15q11–q13 region. Cases have been published of PWS caused by partial UPD (Gregory et al., 1991; Nazarenko et al., 2004; Salavours et al., 2008) and cases of partial UPD implicated in other pathologies (Kotzot, 2008). In our study, the genetic origin of the syndrome was mainly performed using internal markers (data not shown). In one out of the four UPD

cases, both internal and external markers were analyzed in order to discriminate between total and partial UPD (in the remaining cases no DNA was available for the analysis). Interestingly, in one case in this study a partial UPD was identified in a father (PW-14) who also displayed an increased incidence of del15q11q13 in spermatozoa (Table II).

Thus, our results indicate that the increased frequency of deletions of the 15q11–q13 region in spermatozoa is in fact an indicator of the instability of this region that predisposes it to different types of reorganizations: deletions, duplications, inversions and probably partial UPDs.

Clinical significance

Despite the increases observed being moderate (range: 0.70–2.76%), these individuals should be considered at risk of transmitting PWS to their descendants. Our results suggest a relationship between the presence of PWS descendants and an increase of deletions and duplications of the 15q11–q13 region in the spermatozoa. In these individuals an increased frequency of NAHR may occur, affecting regions with a similar genomic architecture to the 15q11–q13 region, giving rise to a high number of gametes carriers of reorganizations. Presumably, the vast majority of them would lead to non-viable embryos or fetuses but those related to genomic disorders compatible with life, such as deletions of the 15q11–q13 region, must be also present. In this situation, the recurrence risk could reach clinical relevance. In this sense, it will be interesting to study whether these individuals show an increase of deletions in spermatozoa for other regions of the genome with similar characteristics, such as 7q11.23 region (involved in Williams–Beuren syndrome) or 22q11.2 (involved in DiGeorge/Velocardiofacial syndrome). Similar situations have been observed in other studies where moderate increases of chromosomal anomalies have been found in spermatozoa of fathers with offspring affected by different syndromes: chromosome 21 disomies in spermatozoa from Down syndrome fathers (Blanco et al., 1998) or sex chromosomes disomies in spermatozoa from fathers with descendants affected by Turner syndrome (Martinez-Pasarell et al., 1999) and Klinefelter syndrome (Arnedo et al., 2006).

In conclusion, although additional cases should be analyzed, our results demonstrate the increased susceptibility of some PWS fathers to generate 15q11–q13 deletions, probably related to the particular genomic architecture of the region.

These preliminary results deserve to be taken into consideration and the screening of 15q11–q13 anomalies in spermatozoa should be suggested in fathers of PWS individuals seeking genetic advice, both to generate larger data sets and to gather information that can further help the genetic counseling of these families.

Authors' roles

O.M. was responsible for acquisition of data, data analysis and interpretation, final approval.

J.B. was responsible for conception and design, data analysis and interpretation, final approval.

F.V. was responsible for conception and design, revision of data and interpretation, final approval.

Acknowledgements

Authors wish to thank Centre de diagnostic UDIAT from Consorci Hospital Parc Taulí (Sabadell, Spain) for providing data about the genetic origin of the syndrome. Special thanks are given to *Associació Catalana Síndrome de Prader-Willi* (Barcelona, Spain) and *Asociación Madrileña para el Síndrome de Prader-Willi* (Madrid, Spain).

Funding

This work was supported by project CF-180034 (*Universitat Autònoma de Barcelona*). Oscar Molina is recipient of a grant from the *Universitat Autònoma de Barcelona* (PIF/2007).

References

- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 1999;**65**:370–386.
- Andreeff M, Pinkel D. *Introduction to Fluorescent in situ Hybridization Principles and Clinical Applications*. Wiley-Liss, Inc., 1999.
- Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 2007;**22**:2088–2092.
- Amedeo N, Templado C, Sanchez-Blanco Y, Rajmil O, Nogues C. Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y. *Hum Reprod* 2006;**21**:524–528.
- Baumer A, Dudy F, Balmer D, Riegel M, Tukel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 1998;**7**:887–894.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;**11**:722–726.
- Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F. Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:1067–1072.
- Butler MG, Fischer W, Kibiriyeva N, Bittel DC. Array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2008;**146**:854–860.
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* 2000;**97**:136–146.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11–q13). *Hum Mol Genet* 1999;**8**:1025–1037.
- Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res* 2008;**18**:683–694.
- Dennis NR, Veltman MW, Thompson R, Craig E, Bolton PF, Thomas NS. Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11–q13. *Am J Med Genet A* 2006;**140**:434–441.
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997;**3**:585–598.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;**3**:441–452.
- Emanuel BS, Shaikh TH. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:791–800.
- Essers J, van Steeg H, de Wit J, Swagemakers SM, Vermeij M, Hoelmakers JH, Kanaar R. Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *Embo J* 2000;**19**:1703–1710.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;**7**:85–97.
- Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosomal Abnormalities and Genetic Counseling*. New York: Oxford University Press, 2004.
- Gimelli G, Pujara MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X 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**:849–858.
- Gregory CA, Schwartz J, Kirklilionis AJ, Rudd N, Hamerton JL. Somatic recombination rather than uniparental disomy suggested as another mechanism by which genetic imprinting may play a role in the etiology of Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 1991;**88**:42–48.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 2008;**1**:4.
- Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;**3**:199–242.
- Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 2000a;**10**:597–610.
- Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res* 2000b;**10**:319–329.
- Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* 2008;**45**:545–556.
- Kotzot D, Martínez MJ, Bagci G, Basaran S, Baumer A, Binkert F, Brecevic L, Castellán C, Chrzanoska K, Dudy F et al. Parental origin and mechanisms of formation of cytogenetically recognizable de novo direct and inverted duplications. *J Med Genet* 2000;**37**:281–286.
- Leduc F, Nikoma GB, Boissonneault G. Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Syst Biol Reprod Med* 2008;**54**:3–10.
- Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998;**14**:417–422.
- Makoff AJ, Flomen RH. Detailed analysis of 15q11–q14 sequence corrects errors and gaps in the public access sequence to fully reveal large segmental duplications at breakpoints for Prader-Willi, Angelman, and inv dup(15) syndromes. *Genome Biol* 2007;**8**:R114.
- Martin R. *Cytogenetics of Human Germ Cells*. Basel: S Karger AG, 2005.
- Martinez-Pasarell O, Nogues C, Bosch M, Egozcue J, Templado C. Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 1999;**104**:345–349.
- Nazarenko S, Sazhenova E, Baumer A, Schinzel A. Segmental maternal heterodisomy of the proximal part of chromosome 15 in an infant with Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2004;**12**:411–414.
- Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet* 2001;**29**:321–325.

- Rothlisberger B, Kotzot D. Recurrence risk in de novo structural chromosomal rearrangements. *Am J Med Genet A* 2007;**143A**: 1708–1714.
- Salavoura K, Kolialexi A, Sofocleous C, Kalaitzidaki M, Pampanos A, Kitsiou S, Mavrou A. Complex rearrangements of chromosome 15 in two patients with mild/atypical Prader Willi syndrome. *Genet Couns* 2008;**19**:219–224.
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 2009; doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139.
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennelam RC et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006;**38**:1038–1042.
- Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV et al. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:567–572.
- Srivastava N, Raman MJ. Homologous recombination-mediated double-strand break repair in mouse testicular extracts and comparison with different germ cell stages. *Cell Biochem Funct* 2007;**25**:75–86.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002;**18**:74–82.
- Ungaro P, Christian SL, Fantes JA, Mutirangum A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH. Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11–q14. *J Med Genet* 2001;**38**:26–34.
- Vidal F, Moragas M, Catala V, Torello MJ, Santalo J, Calderon G, Gimenez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;**8**:1740–1743.

TREBALL 2:

*Sperm rates of 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 deletions
and duplications: a FISH approach*

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J

Human Genetics (2011) 129:35-44

Sperm rates of 7q11.23, 15q11q13 and 22q11.2 deletions and duplications: a FISH approach

Oscar Molina · Ester Anton · Francesca Vidal · Joan Blanco

Received: 26 March 2010 / Accepted: 23 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Genomic disorders are human diseases caused by meiotic chromosomal rearrangements of unstable regions flanked by Low Copy Repeats (LCRs). LCRs act as substrates for Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR) leading to deletions and duplications. The aim of this study was to assess the basal frequency of deletions and duplications of the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions in spermatozoa from control donors to check differences in the susceptibility to generate anomalies and to assess the contribution of intra- and inter-chromatid NAHR events. Semen samples from ten control donors were processed by FISH. A customized combination of probes was used to discriminate among normal, deleted and duplicated sperm genotypes. A minimum of 10,000 sperm were assessed per sample and region. There were no differences in the mean frequency of deletions and duplications (del + dup) among the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions (frequency \pm SEM, 0.37 ± 0.02 ; 0.46 ± 0.07 and $0.27 \pm 0.07\%$, respectively) ($P = 0.122$). Nevertheless, hierarchical cluster analysis reveals interindividual differences suggesting that particular haplotypes could be the main source of variability in NAHR rates. The mean frequency of deletions was not different from the mean frequency of duplications in the 7q11.23 ($P = 0.202$) and 15q11-q13 ($P = 0.609$) regions, indicating a predominant inter-chromatid NAHR. By contrast, in the 22q11.2 region the frequency of deletions slightly exceed duplications ($P = 0.032$), although at the individual level any donor showed differences. Altogether, our results support the inter-chromatid NAHR as the pre-

dominant mechanism involved in the generation of sperm deletions and duplications.

Introduction

Genomic disorders are human diseases caused by meiotic chromosomal rearrangements involving unstable regions. These regions are characterized by being flanked by Low Copy Repeats (LCRs) that contain hotspots susceptible to double-strand breaks (DSBs). LCRs are highly similar duplicated sequences of 95–97% homology and ranging in size of between 10 and 300 Kb (Emanuel and Shaikh 2001). This situation provides a chance for misalignment during meiosis, which may lead to rearrangement if a DSB is formed in the vicinity. Actually, most recurrent rearrangements occur by non-allelic homologous recombination (NAHR) between LCRs flanking critical regions (Gu et al. 2008).

The pairing and recombination between paralogous LCRs will generate different products depending on the orientation (direct, indirect) and the chromatids involved (inter, intra) in the NAHR event. The direct orientation of the LCRs will generate complementary deletions and duplications (inter-chromatid NAHR) or only deletions (intra-chromatid NAHR) (Fig. 1). LCRs arranged in an indirect orientation will generate inversions via intra-chromatid NAHR.

Several loci that undergo NAHR are known to be associated with reciprocal deletions and duplication disorders: for instance, Williams-Beuren syndrome (OMIM 194050) and 7q11.23 duplication syndrome (OMIM 609757), Prader-Willi syndrome (OMIM 176270) and Angelman syndrome (OMIM 105830) and also the 15q11q13 duplication syndrome (OMIM 608636), DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (OMIM 188400) and 22q11.2 duplication syndrome (OMIM 608363).

O. Molina · E. Anton · F. Vidal · J. Blanco (✉)
Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències,
Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain
e-mail: joan.blanco@uab.cat

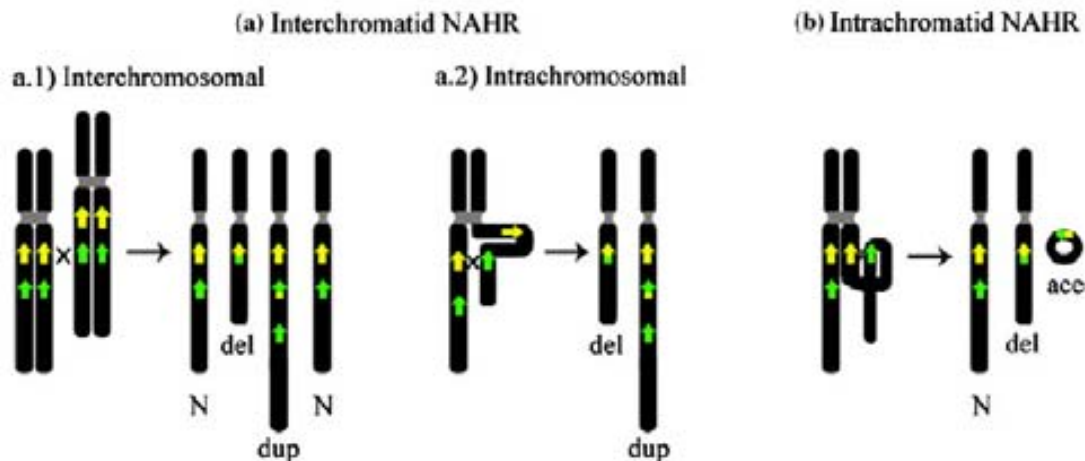


Fig. 1 Genomic rearrangements by Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR) between directly oriented LCRs. a Interchromatid, b Intrachromatid

The 7q11.23 region is flanked by three highly homologous LCRs covering approximately 2 Mb (Fig. 2a). They are named according to their position as centromeric (c), medial (m) and telomeric (t) LCRs. These LCRs are divided into three different blocks (A, B and C) containing different genes and pseudogenes as a result of evolutionary duplications (Antonell et al. 2005).

Deletions of the 7q11.23 region are the cause of Williams-Beuren syndrome (WBS) (Table 1). The incidence of WBS has been established as being between 1/7,000 and 1/20,000 newborns, and the most frequently recurrent 7q11.23 deletions causing WBS are 1.55 Mb long, involving the LCR-Bc and the LCR-Bm (Fig. 2a) (Peoples et al. 2000). No preferred parental origin was observed in the formation of these deletions, and the inter-chromosomal (inter-chromatid) NAHR seems to be the most frequent mechanism involved in these cases (Thomas et al. 2006).

The reciprocal duplication of the 7q11.23 region has been recently described (Table 1), showing milder phenotypes that, in some cases, were unnoticed and inherited from a seemingly unaffected parent (Depienne et al. 2007; Somerville et al. 2005; Van der Aa et al. 2009). The estimated population frequency of duplications has been established in 1/13,000 to 1/20,000 (Van der Aa et al. 2009).

The proximal long arm of chromosome 15 is frequently involved in structural rearrangements. The 15q11-q13 region is flanked by three LCRs consisting of duplications of the *HERC2* gene/pseudogene (Fig. 2b) (Makoff and Flomen 2008). Two classes of deletions were described according to the proximal LCR involved in the rearrangement: class I deletions (LCR-1; 6.2 Mb) and Class II deletions (LCR-2; 5.4 Mb). Taking into account that the 15q11-q13 region is under imprinting control, the phenotypic effects of the reorganized chromosome will depend on the parental origin of the inherited deletion (Table 1): paternal

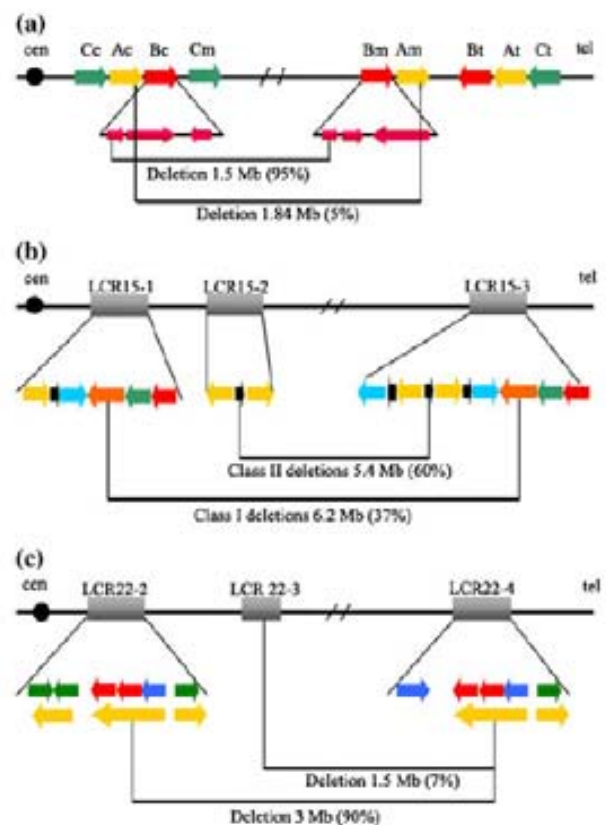


Fig. 2 Schematic representation of the regions analyzed. a 7q11.23 region (adapted from Antonell et al. 2005); b 15q11-q13 region (adapted from Makoff and Flomen 2008); c 22q11.2 region (adapted from Babcock et al. 2007)

15q11q13 deletions cause Prader-Willi syndrome (PWS), while maternal ones cause Angelman syndrome (AS). The incidence of both PWS and AS is between 1/10,000 and 1/20,000 live births. However, 15q11q13 deletions only

Table 1 Deletion and duplication syndromes associated with regions 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2

Region	Genomic disorder	Chromosome anomaly	Size (Mb) ^a	Parental origin	Incidence
7q11.23	Williams-Beuren syndrome	Deletion	1.5	Paternal/maternal	1/7,000–1/20,000
	7q11.23 duplication syndrome	Duplication	1.5	Paternal/maternal	1/13,000–1/20,000
15q11-q13	Prader-Willi syndrome	Deletion	5.4	Paternal	1/14,000–1/28,000
	15q11-q13 duplication syndrome	Duplication	5.4	Maternal	Unknown
22q11.2	DiGeorge/velocardiofacial syndrome	Deletion	3	Paternal/maternal	1/4,000
	22q11.2 duplication syndrome	Duplication	3	Paternal/maternal	Unknown

^a Size of the most frequent rearrangement

account for 70% of PWS and AS cases, being the incidence of 15q11q13 deletions between 1/14,000 and 1/28,000 live births. No significant bias in the parental origin of 15q11q13 deletions was observed, so both syndromes have the same population incidence. Differences in the mechanisms of origin were observed regarding the parental origin of the 15q11q13 deletion. In maternal deletions an excess of inter-chromosomal (inter-chromatid) NAHR events was observed, while for paternal deletions intra-chromosomal (inter- or intra-chromatid) NAHR events were found to be more frequent (Thomas et al. 2006).

Interstitial duplications of 15q11-q13 were also described, sharing the same breakpoints as the deletions (Table 1). Maternally inherited duplications give rise to an abnormal phenotype, whereas the paternal ones are not associated with any effect (Repetto et al. 1998); it may explain the reported excess of maternally derived 15q11q13 duplication cases over the paternally inherited duplications (Thomas et al. 2006). An approximately equal number of inter-chromosomal and intra-chromosomal (inter-chromatid) NAHR as a cause of 15q11q13 duplications was observed (Thomas et al. 2006). The incidence of de novo duplications has not been established yet due to the low number of cases reported to-date.

Due to its high density of LCRs, chromosome 22 is especially prone to rearrangements causing different genomic disorders (Urban et al. 2006). Among them, 22q11.2 deletions cause the DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (DGS). This syndrome represents the most frequent genomic disorder caused by deletion, occurring in 1/4,000 live births (Table 1). The deletions causing DGS mainly involve LCR 22-2 and LCR 22-4, giving rise to deletions of 3 Mb (Fig. 2c). No significant bias in parental origin has been reported (Thomas et al. 2006). Deletions causing DGS seem to be mainly caused by an inter-chromosomal (inter-chromatid) NAHR rather than intra-chromosomal (inter- or intra-chromatid) NAHR (Thomas et al. 2006).

The reciprocal duplications were first reported by Ensenauer et al. (2003) where 13 out of 653 patients referred for a 22q11.2 deletion analysis were carriers of 22q11.2 duplications (Table 1). The incidence of 22q11.2 duplications

has not been established to-date due to the low number of de novo cases reported (Portnoi 2009).

Overall, epidemiological studies point out a higher incidence of deletions over duplications for the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions. Actually, this also accounts for most of the deletion/duplication-associated syndromes. This situation has been related to different causes: (1) the under-diagnosis of duplication carriers due to the mild phenotype they confer (Ensenauer et al. 2003), (2) Limitations of metaphase-FISH analysis to detect duplications (Portnoi 2009) or (3) The formation of gametes carrying de novo deletions at a higher rate than duplications (Turner et al. 2008).

The studies in gametes provide an alternative to studying the frequency of these rearrangements. We have already demonstrated that the use of methodologies that allow performing FISH analyses in decondensed sperm nuclei enables studies of high reliability and wide spectrum and offers the possibility of direct assessment of gametes carrying deletions and duplications (Molina et al. 2010). This interphase analysis offers the possibility to analyze a great number of spermatozoa and thus to assess rare NAHR events on the level of single cells.

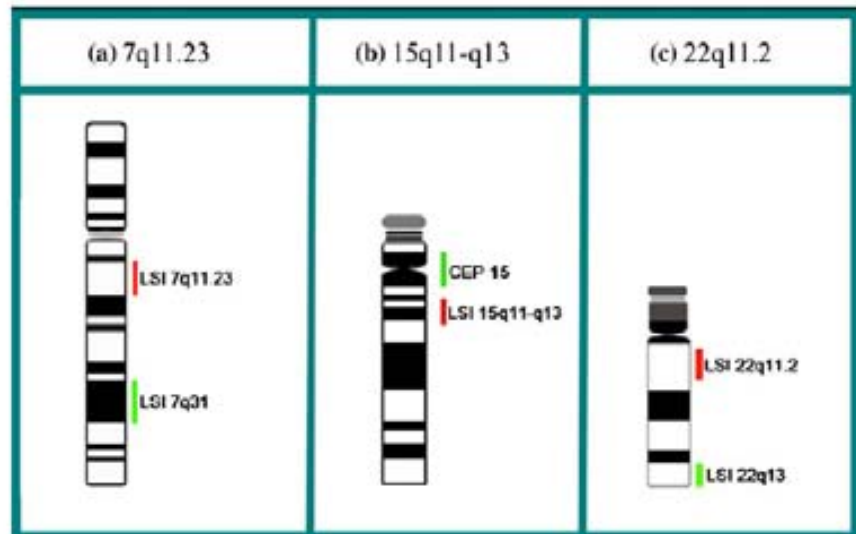
The aim of this study was to assess the frequency of deletions and duplications occurring at the 7q11.23 and 22q11.2 regions in spermatozoa of control donors by means of sperm-FISH. Results of 7q11.23, 22q11.2 and those already published for the 15q11-q13 region in the same control donors (Molina et al. 2010) will be used (1) to assess the susceptibility of every single region in generating deletions and duplications and (2) to determine the particular contribution of inter-chromatid and/or intra-chromatid NAHR events.

Materials and methods

Sperm donors

Semen samples from ten control donors, aged 24–50 (mean \pm SD, 33 years old \pm 10.73) were obtained.

Fig. 3 Probe combinations. **a** LSI ELN, LIMK1, D7S613 (*Spectrum Orange*; Abbott Molecular; Abbott Park, IL, USA) and LSI D7S486 (*Spectrum Green*; Abbott Molecular). **b** LSI D15S11 (*Spectrum Orange*; Abbott Molecular) and CEP 15p11.2, D15Z1 (*Spectrum Green*; Abbott Molecular). **c** LSI TUPLE1 (*Spectrum Orange*; Abbott Molecular) and LSI ARSA (*Spectrum Green*; Abbott Molecular)



Subjects were normozoospermic and showed normal karyotypes. To our knowledge, none of them were exposed to genotoxic agents, and no history of chemotherapy, radiotherapy or chronic illness was recorded.

All subjects gave their informed consent in writing to participate in the study and the protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Sperm fluorescence in situ hybridization (Sperm-FISH)

Samples were processed as described previously by our group (Anton and Sarrate 2009). The sperm fraction were fixed in methanol:acetic acid (3:1) and spread on a slide. Slides were kept at -20°C until processed. Prior to hybridization sperm nuclei were decondensed by slide incubation at 37°C in Tris buffer containing 5 mmol/l dithiothreitol and 1% Triton X-100 for 5–12 min.

A triple-color FISH was performed for each subject and region analyzed using a combination of three probes (Fig. 3): (1) a locus-specific probe for the critical region, labeled with *Spectrum Orange*; (2) a centromeric or a locus-specific probe on the same chromosome labeled with *Spectrum Green* as a hybridization control and (3) a centromeric probe for chromosome 6 labeled with *Spectrum Aqua* as a ploidy control.

All probes were provided by Abbot Molecular. Together with the probes, Abbot Molecular provide a Certificate of Analysis which contains lot information data and traceability, lot testing information (hybridization efficacy and specificity) and a quality declaration. According to this certificate, the probes used in our study are highly specific (only the targeted regions are hybridized) and display hybridization efficiency close to 100%.

The combinations of two probes targeting the same chromosome (the hybridization control probe and the probe specific for the critical region) allow the analysis of deletions and duplications. Accordingly, the presence of the hybridization control signal and the absence of the LSI probe were identified as deletions. The same experimental design was used for the evaluation of the frequency of duplications. Taking our scoring criteria into account, two signals were considered as independent if they appeared separated by a distance greater than the diameter of each signal. It is important to state that the resolution of the FISH technique on interphase nuclei is 100 kb. Considering that a duplication of the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions will separate the signals 3, 4 and 6 Mb, respectively, this would allow to clearly distinguish two signals from the LSI probe and thus, to assess duplications.

Sperm DNA and probe mixture were separately denatured in formamide solution (70 and 50%, respectively, in $2\times$ SSC) at 73°C for 5 min. Slides were hybridized in a moist chamber at 37°C overnight. Post-hybridization washes were performed according to the manufacturer's instructions (Abbott Molecular), and sperm nuclei were counterstained with DAPI II solution (Abbott Molecular).

Sperm-FISH analyses were performed using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter and specific filters for Aqua, FITC and Cy3.

A minimum of 10,000 sperm were scored for every single subject and region. Samples were analyzed independently by two experienced observers, applying the following assessment criteria:

1. Only spermatozoa with a well-defined boundary were evaluated. Overlapping spermatozoa were discarded from the count.

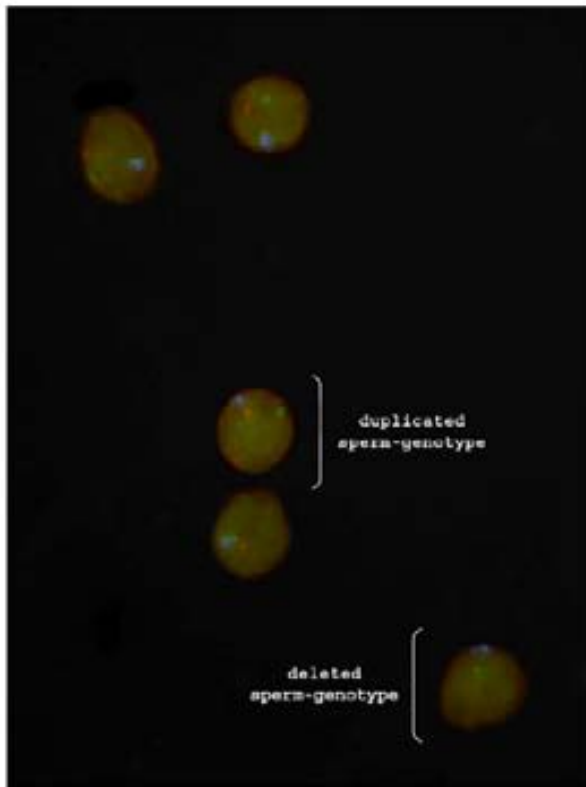


Fig. 4 Triple-color FISH on decondensed sperm nuclei showing some examples of normal, deleted and duplicated spermatozoa of the 22q11.2 region (Probe combination: LSI TUPLE1 (*Spectrum Orange*; Abbott Molecular), LSI ARSA (*Spectrum Green*; Abbott Molecular) and CEP 6 (*Spectrum Aqua*; Abbott Molecular))

2. According to the number and distribution of the critical-region signals, the following genotypes were assigned (Fig. 4):

- Normal: spermatozoa displaying the specific signal of the critical region and the hybridization and ploidy control signals.
- Deletion: spermatozoa lacking the specific signal of the critical region but displaying the hybridization and ploidy control signals.
- Duplication: spermatozoa showing two specific signals of the critical region (of the same size and intensity and separated from each other by a distance longer than the diameter of every single signal) and the respective signals corresponding to the hybridization and ploidy control.

The Olympus BX-60 microscope plate was equipped by X and Y scale which defines a Cartesian coordinate system. This system identifies each point uniquely in a plane by a pair of numbers. To guarantee that the same spermatozoon was not analyzed repeatedly, the analyzer always initiated

the microscope analysis from the last coordinates. Moreover, the analyzers always followed the same itinerary along the microscope slide.

Data analysis

Data obtained were analyzed statistically using SPSS 14.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) under the advice of the statistical service of the Universitat Autònoma de Barcelona.

To assess the susceptibility to generate deletions and duplications, the following statistical analyses were performed:

- Population level: the mean frequency of deletions and duplications were compared among the regions analyzed by means of a Friedman Test. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.
- Individual level: a hierarchical conglomerate analysis was performed to group the cases according to the similarity of the NAHR rates.
- Age effect: a Spearman's correlation between the frequency of the total deletions and duplications observed and the age was performed. Correlation was considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

To assess the participation of inter-chromatid NAHR and/or intra-chromatid NAHR the following tests were performed:

- Population level: a Wilcoxon test to analyze whether the mean frequency of deletions were different from that of duplications in every single region. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.
- Individual level: a McNemar test to compare the frequency of deletions and duplications. To avoid false positives due to the high number of spermatozoa analyzed per subject, differences were considered to be statistically significant when $P < 0.01$.

Results

A total of 201,884 sperm nuclei were analyzed: 101,042 nuclei for the 7q11.23 region and 100,842 nuclei for 22q11.2 region (Table 2). Concerning the 15q11-q13 region, the basal levels of deletions and duplications recently published by our group in the same control population have been included to perform the statistical analyses (Molina et al. 2010).

There were no differences in the mean frequency of deletions and duplications (del + dup) among the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions (frequency \pm SEM, 0.37 ± 0.02 ; 0.46 ± 0.07 and $0.27 \pm 0.07\%$, respectively) ($P = 0.122$) (Fig. 5a).

Table 2 Sperm-FISH results

Cases	Age	7q11.23				15q11-q13 ^a				22q11.2			
		Deletions	Duplications	del + dup	Total	Deletions	Duplications	del + dup	Total	Deletions	Duplications	del + dup	Total
C-1	26	32 (0.32%)	14 (0.14%)	46 (0.46%)	10,057	31 (0.31%)	23 (0.23%)	54 (0.54%)	10,215	6 (0.06%)	8 (0.08%)	14 (0.14%)	10,084
C-2	24	34 (0.34%)	20 (0.20%)	54 (0.54%)	10,138	31 (0.30%)	30 (0.29%)	61 (0.59%)	10,212	15 (0.15%)	6 (0.06%)	21 (0.21%)	10,105
C-3	25	31 (0.31%)	18 (0.18%)	49 (0.49%)	10,120	8 (0.08%)	22 (0.22%)	30 (0.30%)	10,163	6 (0.06%)	10 (0.10%)	16 (0.16%)	10,052
C-4	23	29 (0.29%)	25 (0.25%)	54 (0.54%)	10,047	23 (0.22%)	38 (0.37%)	61 (0.59%)	10,265	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	10,105
C-5	36	25 (0.25%)	11 (0.11%)	36 (0.36%)	10,130	25 (0.25%)	18 (0.18%)	43 (0.43%)	10,098	23 (0.23%)	20 (0.20%)	43 (0.43%)	10,033
C-6	28	11 (0.11%)	23 (0.23%)	34 (0.34%)	10,085	11 (0.11%)	12 (0.12%)	23 (0.23%)	10,084	16 (0.16%)	8 (0.08%)	24 (0.24%)	10,064
C-7	50	16 (0.16%)	21 (0.21%)	37 (0.37%)	10,098	24 (0.23%)	20 (0.19%)	42 (0.42%)	10,138	32 (0.32%)	34 (0.34%)	66 (0.66%)	10,158
C-8	50	10 (0.10%)	7 (0.07%)	17 (0.17%)	10,063	12 (0.12%)	16 (0.16%)	28 (0.28%)	10,093	29 (0.29%)	15 (0.15%)	44 (0.44%)	10,108
C-9	42	5 (0.05%)	11 (0.11%)	16 (0.16%)	10,072	17 (0.17%)	13 (0.13%)	30 (0.30%)	10,095	15 (0.15%)	8 (0.08%)	23 (0.23%)	10,075
C-10	26	17 (0.17%)	16 (0.16%)	33 (0.33%)	10,232	39 (0.38%)	54 (0.53%)	93 (0.91%)	10,142	9 (0.09%)	2 (0.02%)	11 (0.11%)	10,058
% ±SEM		0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.37 ± 0.04		0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.47 ± 0.07		0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.27 ± 0.05	

^a Data extracted from Molina et al. (2010)

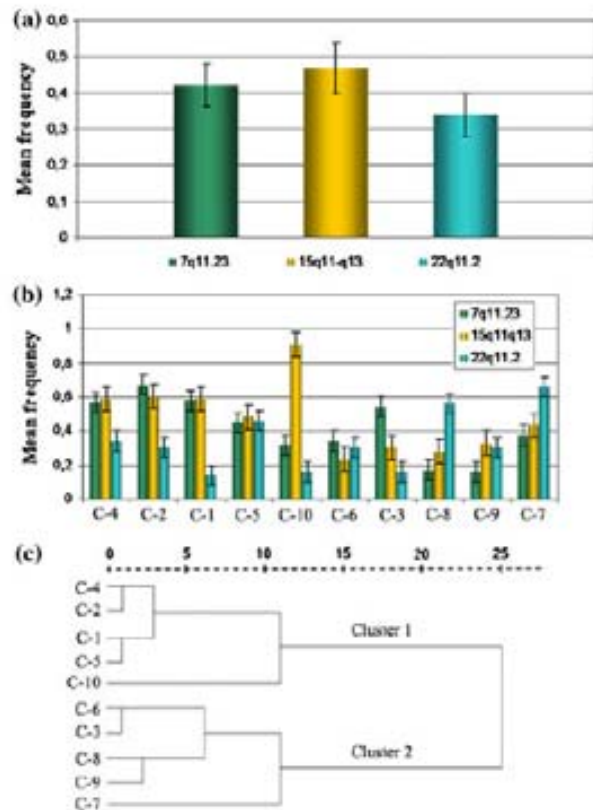


Fig. 5 a Mean frequencies of deletions plus duplications in each region analyzed. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). b Frequencies of deletions plus duplications observed in every single subject. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). c Hierarchical cluster analyses for NAHR pattern of subjects analyzed

The rates of deletions and duplications were evaluated at the individual level (Fig. 5b) using an Analysis of Hierarchical conglomerates that established different clusters. The classification obtained has been presented in a dendrogram (Fig. 5c), where the cases appear at a certain degree of distance that goes from 0 (maximum similarity) to 25 (less correspondence).

Individuals appeared grouped in two major clusters (Fig. 5c):

Cluster 1: comprises five subjects showing high frequencies of deletions and duplications of the 7q11.23 and 15q11-q13 regions. It includes subjects C-4, C-2, C-1, C-5 and C-10. Subject C-10 was separated from the rest at a distance of 10-12, because the frequency of the 15q11q13 del + dup was found to be considerably higher than the rest.

Cluster 2: is more heterogeneous. Cases C-6 and C-3 (sub-cluster 2.1) were grouped together, at a distance of 1, because they showed lower frequencies of 15q11q13 and 22q11.2 deletions and duplications. Cases C-8 and

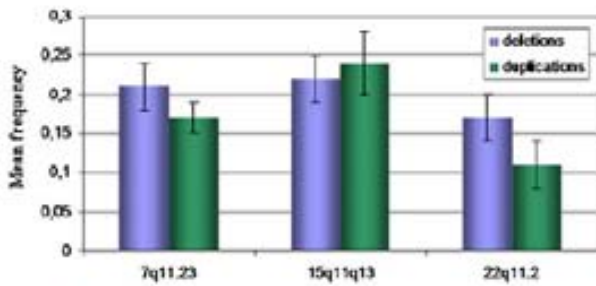


Fig. 6 Mean frequencies of deletions and duplications found in each region analyzed. Error bars represent the standard error of the mean (SEM)

C-9 (sub-cluster 2.2) were grouped together, at a distance of 2, and showed the frequency of the 15q11q13 and 7q11.23 deletions and duplications lower than the other region analyzed. Finally, individual C-7 was separated at a distance of 10 from the other subjects of Cluster 2 showing the rates of deletions and duplications which were all slightly higher.

No significant correlation was observed between the frequency of the sum of deletions and duplications for all of the regions analyzed and the age of donors ($r = 0.22$; $P = 0.545$).

The mean frequency of deletions was not different from the mean frequency of duplications in the 7q11.23 ($P = 0.202$) and 15q11-q13 ($P = 0.609$) regions. By contrast, in the 22q11.2 region the frequency of deletions slightly exceed duplications ($P = 0.032$) (Fig. 6). The comparison between the frequency of deletions and duplications at the individual level reveal no significant differences in any of the 30 comparison performed (ten comparisons per region) ($P > 0.01$).

Discussion

Sperm-FISH studies have long enabled cytogenetic studies in spermatozoa (Martin 2008) mainly addressed to meiotic segregation analyses in carriers of chromosomal rearrangements (Anton et al. 2007) and to the assessment of the aneuploidy rate in infertile men (Sarrate et al. 2009). We have already demonstrated the reliability of this methodology to assess the frequency of deletions and duplications in spermatozoa when an accurate FISH design is performed: probes spanning the region to be examined, control probes for the chromosomes involved and well-defined strict scoring criteria (Molina et al. 2010).

Susceptibility in generating deletions and duplications

The relationship between the phenomenon of NAHR and the presence of flanking LCRs is well known. Three LCR features have been hypothesized as being determinants for

Table 3 Differences in the frequency of deletions found in spermatozoa and in the general population

Locus	Frequency in spermatozoa	Frequency in population ^a	Ratio sperm/population
7q11.23	2.1×10^{-3}	7.4×10^{-5}	28.4
15q11-q13	2.2×10^{-3}	4.8×10^{-5}	45.8
22q11.2	1.7×10^{-3}	2.5×10^{-4}	6.8

^a Mean incidence established for the general population

the rate of NAHR events: homology, distance and size (Lupski 1998; Inoue and Lupski 2002; Gu et al. 2008).

Regarding the LCRs involved in the three regions analyzed in this study (Fig. 2) no differences exist in the degree of homology, being higher than 99% in all of them. On the contrary, distance displays some differences. Thus, the most frequent LCRs involved in NAHR events are separated by 1.5 Mb, 5.4 Mb and 3 Mb for the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions, respectively (Fig. 2). LCR sizes also display differences: 320 Kb (7q11.23 region; Cusco et al. 2008), 500 Kb (15q11-q13 region; Makoff and Flomen 2008) and 240 Kb (22q11.2 region; McDermid and Morrow 2002). As the rate of anomalies is equivalent among regions, our results disagree with the hypothetical effects of these three parameters on the frequency of NAHR events.

Other authors have calculated the rate of sperm-NAHR in hotspots relating the figures with LCR homology, distance and size. Among the four hotspots analyzed by Turner et al. (2008) (WBS-LCR at 7q11.23, CMT1A-REP at 17p11.2, LCR17p at 17p11.2 and AZFa-HERV at Yq11.21), they found that the lowest NAHR rates occurred between the LCRs located furthest apart in the 17-p region (separated at 5 Mb), in agreement with the hypothesized relation between NAHR rates and LCR distance. However, no correlation was found among the other three regions analyzed.

Overall, results seem to indicate a negligible effect of homology, distance and size on the final outcome of sperm deletions and duplications mediated by NAHR, at least for the figures of six out of the seven regions analyzed to-date (Turner et al. 2008; present work).

From our results, the frequency of sperm deletions was higher than the incidence of the associated syndromes in the population, suggesting a negative selection before birth (Table 3). Actually, 15q11q13 duplications (Schaeffer et al. 2004) and 22q11.2 deletions (Le Caignec et al. 2005; Chen et al. 2006; Patel et al. 2006) have been reported in prenatal diagnosis and first-trimester spontaneous miscarriages.

The incidence of deletions and duplications was equivalent in sperm, but showed different rates in the live born population (Table 1). Assuming no differences in the fertilization capacity of spermatozoa with the respective deletion or duplication, this comparison suggests that the degree of viability depends on the affected region. From the

comparison of the rates of NAHR in sperm and the prevalence of the associated syndromes in the population, it seems that 22q11.2 deletions are more viable than 7q11.23 and 15q11q13 deletions (ratio spermatozoa/population deletions = 6.8; 28.4; 45.8, respectively) (Table 3). These differences in embryo viability would depend on the number and the expression of the genes comprised in each region (Enkhmandakh et al. 2004, 2009). For instance, the lower viability of embryos carrying paternal 15q11q13 deletions could be attributed to the total lack of gene expression, since this region is submitted to imprinting control.

The hierarchical conglomerate analysis has grouped the subjects according to the NAHR rates in different clusters, suggesting differences at the individual level (Fig. 5c). In this sense, inter-individual variation in the frequency of NAHR events has also already been reported using a single-sperm typing assay (Lam and Jeffreys 2007). From the analysis of the genomic architecture of some regions in at-risk individuals (parents of affected offspring), the presence of predisposing haplotypes making some regions more susceptible to NAHR phenomena is well-documented: inversions of the critical region of WBS (7q11.23) (Osborne et al. 2001) or AS (15q11q13) (Gimelli et al. 2003) and variation in the copy number of 7q11.23 LCR repetitions (Cusco et al. 2008). A similar situation could be found in the general population, where differences in the genomic architecture among individuals would lead to different degrees of NAHR and, hence, to differences in the frequency of deletions and duplications. For instance, although the rate of deletions and duplication of the 7q11.23 is not different at the population level, individual C-4 has a threefold higher frequency of 7q11.23 deletions and duplications than individual C-8.

On the other hand, no correlation was found between the frequency of the total deletions and duplications and the age of the subjects. Some controversy exists regarding the relationship between age and the frequency of chromosomal abnormalities in spermatozoa. Some authors described an effect of the donor's age on the frequency of sperm carrying numerical (Asada et al. 2000; Bosch et al. 2003) or structural chromosome abnormalities (Bosch et al. 2003; Slotter et al. 2007). By contrast, other authors did not find this relationship (Kurahashi and Emanuel 2001; Plastira et al. 2007). Contradictory results could be due to differences in the nature of the anomalies: age-dependent and age-independent anomalies could exist, explaining the different results observed to-date. In any case our results argue in favor of a null effect of age on the rate of NAHR.

Mechanisms of formation of deletions and duplications

There are different data concerning the mechanisms of formation of deletions and duplications in the literature. Some

authors infer the mechanism from the comparison of the frequency of both anomalies in sperm: The same percentage of deletions and duplications would indicate the predominance of the inter-chromatid NAHR, while a significant amount of deletions would indicate the participation of intra-chromatid events. The study of Lam and Jeffreys (2007) compared the incidences of these events in two men, and whereas one of them showed the same rates of sperm deletions and duplications (suggesting inter-chromatid exchanges), the other displayed a higher rate of duplications indicating the occurrence of intra-chromosomal exchanges (inter-/intra-chromatid). These authors suggested that the increase in the duplication frequency could be due to premeiotic events, giving rise to a mosaicism that enhances the frequency of duplications (Lam and Jeffreys 2007). On the other hand, Turner et al. (2008) analyzed the rate of deletions and duplications in sperm samples by QF-PCR in four regions, concluding that intra-chromatid NAHR was the predominant mechanism in all of the regions studied.

Studies in affected patients refute this interpretation. Actually, the 7q11.23 and the 22q11.2 deletions tend to arise from by inter-chromosomal (inter-chromatid) NAHR events, while intra-chromosomal NAHR seems to be the cause of 15q11q13 deletions; in this last region, both inter- and intra-chromatid NAHR could be the cause of the deletions (Thomas et al. 2006).

Our results support the predominance of the inter-chromatid NAHR mechanism; the comparison between the frequency of deletions and duplications at the 7q11.23 and 15q11-q13 regions, in which no significant differences were found at the populations and the individual level, suggests that the inter-chromatid NAHR is the main mechanism involved in the generation of anomalies. At region 22q11.2 a slight difference was observed. Nevertheless, at the individual level any subject showed a significantly higher frequency of deletions, indicating that the inter-chromatid NAHR mechanism should also be the main mechanism involved in the generation of deletions and duplications in the 22q11.2 region. Differences observed between our results and those found by Turner et al. (2008) could be due to the experimental design, as Turner et al. specially measured the NAHR events across the hotspots in the LCRs, whereas the present study and also the one performed by Lam and Jeffreys (2007) measured the entire loci, thus allowing researchers to score NAHR events outside the hotspots.

Importantly, this situation seems to be different in some individuals. We have already demonstrated that some fathers of children affected by PWS generated more sperm carrying deletions than duplications (Molina et al. 2010). In other words, while in control donors deletions and duplications are generated at the same rate, specific haplotypes

would increase the chance of intra-chromatid NAHR events, thus significantly increasing the rate of deletions and biasing the 1:1 ratio towards deletions.

Our results suggest that, if the same viability is assumed for duplications, the higher incidence of deletion over duplication syndromes for 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 is a consequence of undiagnosed duplications. Moreover, the presence of these duplications in apparently normal individuals could have clinical consequences for their offspring (e.g. idiopathic mental retardation). The phenotype associated with duplications is quite variable, probably depending on the penetrance and expressivity of the genes comprised in the region. Some duplication cases were diagnosed for whom one of the parents was a duplication-carrier subject showing milder effects (Bolton et al. 2001; Portnoi 2009; Van der Aa et al. 2009).

In summary, as a whole, the rate of sperm deletions and duplication is equivalent among the 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11.2 regions. However, interindividual differences have been evidenced. These data suggest that particular haplotypes could predispose these regions to different degrees of NAHR events. Moreover, the mechanisms of the formation of deletions and duplications seem to be caused by inter-chromatid exchange events.

Acknowledgments This work was supported by the projects CF-180034 (Universitat Autònoma de Barcelona) and SAF 2010-22241 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Oscar Molina is the recipient of a grant from Universitat Autònoma de Barcelona (PIF/2007).

References

- Anton E, Sarrate Z (2009) Fluorescence in situ hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm. *J Vis Exp*. <http://jove.com/index/details.asp?id=1405>. doi:10.3791/1405
- Anton E, Vidal F, Blanco J (2007) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088–2092
- Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA (2005) Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res* 15:1179–1188
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17:51–59
- Babcock M, Yatsenko S, Hopkins J, Brenton M, Cao Q, de Jong P, Stankiewicz P, Lupski JR, Sikela JM, Morrow BE (2007) Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22 s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 16:2560–2571
- Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, Jacobs P (2001) The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* 105:675–685
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C (2003) Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11:754–759
- Chen M, Hwu WL, Kuo SJ, Chen CP, Yin PL, Chang SP, Lee DJ, Chen TH, Wang BT, Lin CC (2006) Subtelomeric rearrangements and 22q11.2 deletion syndrome in anomalous growth-restricted fetuses with normal or balanced G-banded karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* 28:939–943
- Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Bragues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA (2008) Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res* 18:683–694
- Depienne C, Heron D, Betancur C, Benyahia B, Trouillard O, Bouteiller D, Verloes A, LeGuern E, Leboyer M, Brice A (2007) Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication. *J Med Genet* 44:452–458
- Emanuel BS, Shaikh TH (2001) Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2:791–800
- Enkhmandakh B, Bitebevaia N, Ruddle F, Bayarsaihan D (2004) The early embryonic expression of TFII-I during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 4:25–28
- Enkhmandakh B, Makeyev AV, Erdenechimeg L, Ruddle FH, Chinghe NO, Tussie-Luna MI, Roy AL, Bayarsaihan D (2009) Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:181–186
- Enscnauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73:1027–1040
- Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X, Zuffardi O (2003) Genomic inversions of human chromosome 15q11–q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 12:849–858
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1:4
- Inoue K, Lupski JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:199–242
- Kurahashi H, Emanuel BS (2001) Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet* 29:139–140
- Lam KW, Jeffreys AJ (2007) Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10950–10955
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121–128
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417–422
- Makoff AJ, Flomen RH (2008) Detailed analysis of 15q11–q14 sequence corrects errors and gaps in the public access sequence to fully reveal large segmental duplications at breakpoints for Prader-Willi, Angelman, and inv dup(15) syndromes. *Genome Biol* 8:R114
- Martin RH (2008) Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 14:379–390
- McDermid HE, Morrow BE (2002) Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet* 70:1077–1088
- Molina O, Blanco J, Vidal F (2010) Deletions and duplications of the 15q11–q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers. *Mol Hum Reprod* 16:320–328

- Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC, Scherer SW (2001) A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet* 29:321–325
- Patel ZM, Gawde HM, Khatkhatay MI (2006) 22q11 microdeletion studies in the heart tissue of an abortus involving a familial form of congenital heart disease. *J Clin Lab Anal* 20:160–163
- Peoples R, Franke Y, Wang YK, Perez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Franke 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
- Plastira K, Angelopoulou R, Mantas D, Msaouel P, Lyraou S, Plastiras A, Bolaris S, Baka S, Papanisteidis N (2007) The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *Int J Androl* 30:65–72
- Portnoi MF (2009) Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* 52:88–93
- Repetto GM, White LM, Bader PJ, Johnson D, Knoll JH (1998) Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* 79:82–89
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J (2009) Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lesc Martin C (2004) Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* 74:1168–1174
- Sloter ED, Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, Nath J, Cabrerós D, Wyrobek AJ (2007) Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril* 87:1077–1086
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR (2005) Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med* 353:1694–1701
- Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youngs S, Dennis N, Jacobs P (2006) Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119:444–450
- Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet* 40:90–95
- Urban AE, Korb J, Selzer R, Richmond T, Haacker A, Popescu GV, Cubells JF, Green R, Emanuel BS, Gerstein MB, Weissman SM, Snyder M (2006) High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4534–4539
- Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, Destree A, Maystadt I, Mannik K, Kurg A, Reimand T, McMullan D, Oley C, Bructon L, Bongers EM, van Bon BW, Pfund R, Jacquemont S, Ferrarini A, Martinet D, Schrandt-Stumpel C, Stegmann AP, Frints SG, de Vries BB, Ceulemans B, Kooy RF (2009) Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet* 52:94–100

TREBALL 3:

High rates of de novo 15q11-q13 inversions in human spermatozoa

Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J

Molecular Cytogenetics (en procés de revisió)

**HIGH RATES OF *DE NOVO* 15q11-q13 INVERSIONS IN HUMAN
SPERMATOZOA**

Oscar MOLINA, Ester ANTON, Francesca VIDAL and Joan BLANCO¹

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències). Universitat Autònoma de
Barcelona. 08193-Bellaterra, Barcelona, SPAIN

¹ Corresponding author

E-mail addresses:

OM: oscar.molina.campoy@uab.cat

EA: ester.anton@uab.cat

FV: francesca.vidal@uab.cat

JB: joan.blanco@uab.cat

ABSTRACT

Low-Copy Repeats predispose the 15q11-q13 region to non-allelic homologous recombination. We have already demonstrated that a significant percentage of Prader-Willi syndrome (PWS) fathers have an increased susceptibility to generate 15q11q13 deletions in spermatozoa, suggesting the participation of intrachromatid exchanges. This work has been focused on assessing the incidence of *de novo* 15q11q13 inversions in spermatozoa of control donors and PWS fathers in order to determine the basal rates of inversions and to confirm the intrachromatid mechanism as the main cause of 15q11q13 anomalies.

Semen samples from 10 control donors and 16 PWS fathers were processed and analyzed by triple-color FISH. Three differentially labeled BAC-clones were used: one proximal and two distal of the 15q11-q13 region. Signal associations allowed the discrimination between normal and inverted haplotypes, which were confirmed by laser-scanning confocal microscopy.

Two types of inversions were detected which correspond to the segments involved in Class I and II PWS deletions. No significant differences were observed in the mean frequencies of inversions between controls and PWS fathers ($3.59\% \pm 0.46$ and $9.51\% \pm 0.87$ vs $3.06\% \pm 0.33$ and $10.07\% \pm 0.74$). Individual comparisons showed significant increases of inversions in four PWS fathers ($P < 0.05$) previously reported as patients with increases of 15q11q13 deletions.

Results suggest a high incidence of heterozygous inversion carriers in the general population that could have important implications, as they have been described as predisposing haplotypes for genomic disorders. As a whole, results confirm the high instability of the 15q11q13 region, which is prone to different types of *de novo* reorganizations by intrachromatid NAHR.

Keywords:

Low Copy Repeats; Non-allelic Homologous Recombination; 15q11q13 Inversions; Spermatozoa; Fluorescence *in situ* Hybridization.

BACKGROUND

The human genome has been proven to be a highly dynamic structure, showing a great number of structural and copy-number variation [1]. Four major mechanisms contribute to the genesis of variations: non-allelic homologous recombination (NAHR), non-homologous end joining (NHEJ), fork stalling and template switching (FoSTeS) and retrotransposition [1]. The presence of segmental duplications or low-copy repeats (LCR) throughout the human genome plays a significant role in the formation of variation through NAHR [2,3]. LCRs are DNA fragments longer than 1 Kb in size which share more than 90% of sequence identity between paralogous copies [4]. They represent 5% of the human genome, and their interspersed nature and sequence identity provide a substrate for NAHR [5].

Different stable products can be produced by NAHR according to the orientation of the LCR and the number of chromatids involved in the event. Complementary deletions and duplications can be generated by interchromatid NAHR involving direct LCRs, deletions will be the only resulting product of intrachromatid NAHR also involving direct LCRs. Inversions will be generated via intrachromatid NAHR if LCRs are arranged in an indirect orientation (Figure 1). While deletions and duplications are usually related to altered phenotypes, most inversions are considered as being polymorphic variants with no apparent phenotypic effects for the carriers. This fact, together with the lack of high-throughput methods currently available for the detection of submicroscopic inversions, leads to an underestimation of the true amount of their real occurrence in the human genome [6]. Nevertheless, it has been postulated that they can increase the likelihood of secondary rearrangements leading to recurrent genomic disorders in the offspring [7] (Table 1).

The human 15q11-q13 region is a highly dynamic segment involved in different rearrangements by NAHR. This region is flanked by three complex LCRs (LCR15-1, LCR15-2 and LCR15-3), clustering most of the breakpoints involved in chromosome reorganizations [8]. LCRs of the 15q11-q13 region are built by duplications of the *HERC2* gene/pseudogene which form blocks called END-repeats that are oriented both in direct or indirect orientations [9]. Two major types of deletions have been reported: Class-I deletions involve a 6.6-Mb region delimited by two breakpoints localized within the LCR15-1 and LCR15-3, and Class-II deletions, which have the proximal breakpoint within the LCR15-2 and the distal one in the LCR15-3, leading to a loss of 5.3 Mb of genetic material [10]. It is well known that paternal 15q11q13 deletions are the major cause of Prader-Willi syndrome (PWS; OMIM 176270) [11], while maternal deletions cause Angelman syndrome (AS; OMIM 105830) [11].

Inversions of the 15q11q13 region have been indirectly related to the occurrence of genomic disorders. In particular, Gimelli et al. (2003) reported a 5.3-Mb heterozygote *inv(15)(q11q13)* (corresponding to the Class-II deletion segment) in a significant proportion of mothers with Angelman syndrome-affected children. Based on these findings, they suggested the existence of haplotypes at risk for the generation of secondary rearrangements (deletions and/or duplications) as was previously described in the 7q11.23 region [12]. Strikingly, this inversion was also observed in heterozygosis in 9% of the control population. Other NAHR-based chromosomal rearrangements have been reported in this region that emphasize its instability: duplications [13], supernumerary marker chromosomes [14], triplications [15] or partial uniparental disomies [16].

Our group has recently reported that some PWS fathers produce significantly increased frequencies of spermatozoa carrying *de novo* 15q11q13 deletions, suggesting the presence

of predisposing haplotypes for intra-chromatid NAHR events [17]. As intra-chromatid NAHR events could also generate inversions, in the present work we have analyzed the frequency of *de novo* 15q11q13 inversions in spermatozoa from control donors and PWS fathers. The aim of this work was: 1) to determine the basal rate of *de novo* 15q11q13 inversions, and 2) to investigate if the PWS fathers with an increase of deletions also show increases of inversions.

RESULTS

Clone selection and positioning

Three BAC clones were selected using the resources of the Genome Browser database (UCSC Assembly; February 2009) [18] for triple-color FISH experiments on decondensed sperm-nuclei: one proximal BAC clone (RP11-1122J3) mapping between the LCR15-1 and LCR15-2, and two distal clones (RP11-322N14 and RP11-230M20) on either site of the LCR15-3 (Figure 2a).

The positions of the selected probes were verified on metaphase spreads. Every single probe showed specific signals on the pericentromeric area of chromosome 15 (identified by DAPI banding), and no cross-hybridization was observed.

Experimental design

A minimum of 1,000 informative sperm nuclei were analyzed per sample (controls and PWS fathers). The following criteria of analysis were strictly used:

1. Only spermatozoa with a well-defined boundary were evaluated. Overlapping spermatozoa were discarded from the count.
2. Only spermatozoa with a clear distribution of two associated signals (in close proximity or overlapped) and one separated signal were considered informative. The separated signal must be separated from the others by at least a two-fold longer distance compared with the separation of the associated signals.

Our design implies that two probes would potentially change their positions (RP11-1122J3 and RP11-322N14) while the third probe remains in place (RP11-230M20). This allowed us to unequivocally discriminate between normal and inverted haplotypes.

According to the distribution of signals in the informative sperm nuclei, the following genotypes were assigned:

- Normal (Figure 2a): spermatozoa displaying an association of the two distal signals (orange and blue) and the proximal signal (green) located apart from the others.
- Type-1 inversion (Figure 2b): spermatozoa displaying the proximal signal (green) associated with the most distal signal (blue), and the orange signal being located apart.
- Type-2 inversion (Figure 2c): spermatozoa displaying the proximal signal (green) associated with the orange signal, and the blue signal being located apart.

The presence of normal and inverted haplotypes was confirmed by confocal laser-scanning microscopy (Figure 2).

Sperm-FISH results

The hybridization efficiency of every single probe in sperm nuclei was higher than 98%.

The mean frequencies of informative nuclei in both controls and PWS populations were higher than 70% (71.45% and 73.78%, respectively) (Tables 2 and 3).

A total of 10,292 informative sperm nuclei from the control population were analyzed (Table 2). The mean frequency of Type-1 inversions was 3.59%, ranging from 1.29% to 5.32%, with a standard error of the mean (S.E.M) of 0.46%. The mean frequency of Type-2 inversions was 9.51% ($\pm 0.87\%$ SEM), ranging from 6.47% to 14.06%.

In fathers of PWS individuals, a total of 16,545 informative sperm nuclei were analyzed (Table 3). The mean frequency of Type-1 inversions was 3.06% ($\pm 0.33\%$ SEM), ranging

from 1.37% to 5.73%. The mean frequency of Type-2 inversions was 10.07% ($\pm 0.73\%$ SEM), ranging from 5.39% to 15.02%.

Frequencies of Type-2 inversions were significantly higher than the frequencies of Type-1 inversions in both the control population ($P=0.005$) and in the PWS fathers ($P=0.0001$). Moreover, a significant correlation was observed between the frequencies of Type-1 and Type-2 inversions ($r=0.55$; $P=0.004$) (Figure 3a).

No significant differences were observed for either the frequencies of Type-1 or Type-2 inversions between the PWS fathers and the controls ($P>0.05$) (Figure 3b). Nevertheless, individual comparisons showed higher incidences of inversions in four PWS fathers due to increases of Type-2 inversions: PW-5, PW-10 and PW-13 ($P<0.05$), or increases in both types of inversions: PW-1 ($P<0.05$) (Table 3) (Figure 3c). It deserves to be mentioned that significant increases of 15q11q13 deletions were previously reported in all these four individuals [17]. No significant correlation was observed between the frequencies of 15q11q13 inversions and age ($P>0.05$).

When considering the frequency of the different stable products resulting from intrachromatid NAHR events, that is, inversions and deletions (data previously reported [17]), no correlation was observed in either the control population ($P=0.121$) or in the PWS fathers. However, a tendency to correlate ($r=0.69$; $P=0.062$) was observed in the PWS fathers.

DISCUSSION

Experimental design

Sperm-FISH analyses have been widely used for cytogenetic studies in spermatozoa [19] and have been mainly focused on evaluating the genetic reproductive risk of carriers of abnormal karyotypes [20] and infertile patients [21]. Furthermore, and more recently, we have demonstrated the reliability of this methodology to assess the rates of deletions and duplications in spermatozoa [17]. In all of these approaches, the chromosomal constitution of the sperm nuclei is inferred by the evaluation of the presence or absence of a given FISH signal.

In the present work, the potentiality of sperm-FISH to also detect inversions has been evaluated. Our results confirm that this approach is feasible and realistic if an accurate experimental design is used, taking into consideration the relation between the genetic distances and the physical distances of FISH signals in the interphase nucleus.

Our experimental design has led to the observation of two types of signal distributions: two plus one (2+1) and associations of three. As the images of the three signals in association could be the consequence of chromatin loops resulting from high-order packaging of interphase DNA, all of the nuclei showing this distribution were classified as uninformative and were discarded for haplotype evaluation. The 2+1 distributions were assigned to three different haplotypes: normal, Type-1 and Type-2 inversions. In any case, the two associated probes were always located closer than 1Mb and the probe apart was separated by a distance longer than 5 Mb. It is well-known that the separation of interphase FISH signals increases as the genomic distance between the probes becomes larger, and this correlation is consistent for genomic separations up to 2 Mb [22]. As a

consequence, the three signals in our experimental design will appear as specific distributions of 2 associated dots plus 1 separated dot.

Two different types of 15q11q13 inversions were observed

The results obtained point to the existence of two types of inversions that involve the segments corresponding to the reported Class-I and Class-II 15q11q13 deletions. Our data are in agreement with the existence of the 15q11q13 inversions between the LCR15-2 and 3 (Type-2) previously described by other authors [23]. Furthermore, our experimental approach allowed us to describe a new inversion involving the segment between LCR15-1 and 3 (Type-1 inversion). As in the case of deletions, the most frequent inversion was the Type-2 inversion. Altogether, these data suggest that the LCR15-2 could harbor longer stretches of homology than LCR15-1 with the LCR15-3, making the first more susceptible to NAHR events.

Susceptibility to generate 15q11q13 inversions

Unexpectedly high rates of 15q11q13 inversions were found in spermatozoa from the two populations studied. Two pieces of evidence indicate that these inversions are generated *de novo*: 1) Since the frequency of inversions was not close to 50% in any case, the possibility of having any constitutional heterozygote inversion carrier can be ruled out. 2) Another possibility is the presence of a mosaicism for the inversion restricted to the germ line. Two pieces of data make such a possibility unlikely. First, inversions are considered to be a predisposing haplotype that increases the risk of secondary rearrangements such as deletions. While the incidence of inversion was consistently high in all control and PWS fathers, most of them did not show increases of deletions. Second, if mosaicism is present in testicular tissue, we would expect that the degree were different among individuals

generating different percentages of sperm inversions. Instead, as mentioned above, the percentage of sperm inversions was consistent (Tables 2 and 3).

The high rate of 15q11q13 inversions in spermatozoa suggests that a certain percentage of heterozygous carriers are present among the general population. Taking into account the frequency of sperm inversions observed in the present study (Type-1 and Type-2 inversions: 13.1%) and assuming that the frequency of these inversions would be the same in oocytes, we can infer that the frequency of heterozygous carriers in the general population would be 11.3% ($13/100 \times 87/100$). These results are in agreement with the 9% of inv(15)(q11q13) heterozygous carriers (4 out of 44 individuals) found in the control population assessed by Gimelli et al.(2003). This situation has already been described in population studies analyzing other regions with similar features such as 7q11.23 and 8p23.1, where inversions were observed in 5.8% and 79% , respectively [24, 25]. In this sense, it seems likely that the frequency of inversions in regions with a genomic architecture characterized as being flanked by LCR could be as high as the one described in the 15q11q13 region, and this would strengthen the hypothesis that the frequencies of inversions are underestimated within the great deal of structural variants of the human genome [6].

This situation might have important implications at a population level. As was previously suggested, the presence of an inverted chromosome in heterozygosity originates an unpaired region at pachytene making the region prone to misalignment and NAHR. Thus, the risk for a secondary rearrangement affecting the offspring could be increased [6, 12, 23]. Consequently, heterozygote carriers of any of these types of inversions could have an increased risk of transmission of 15q11q13 deletions in descendants.

Intrachromatid NAHR is the major NAHR mechanism

Results obtained in the present work showed higher frequencies of 15q11q13 inversions than the frequencies of deletions and duplications previously reported in controls and PWS fathers [17], thus indicating that intrachromatid NAHR is the most frequent mechanism. Some PWS fathers showed significantly increased rates of inversions, as compared with the control population (Table 3). Strikingly, all of them were previously reported to have significant increases of 15q11q13 deletions [17]. These data point out the important participation of intrachromatid NAHR in the generation of 15q11-q13 anomalies. As a whole, our results suggest that individuals at risk (those showing significant increases of 15q11q13 anomalies in spermatozoa) have a disrupted intrachromatid NAHR mechanism, as only the products derived from this mechanism overrate those of the control population.

Since no constitutional heterozygous carriers of inversions were detected in any of the subjects analyzed, and different outcomes were found to be increased in spermatozoa of some PWS fathers (15q11q13 deletions or both 15q11q13 deletions and inversions), differences in the genomic architecture of the LCRs flanking this region might exist. Some authors have reported structural variation in the LCRs flanking some regions involved in genomic disorders [26, 27]. They suggested that some specific haplotypes within these LCRs could predispose those regions to misalignment between paralogous copies and thus predispose the region to NAHR, increasing the risk of transmission of genomic disorders. Our results suggest that, in fact, differences in the genomic architecture of the LCR15s predispose these individuals to intrachromatid NAHR, thus producing different rearrangements. Some individuals would show haplotypes with longer stretches of direct homology between paralogous LCRs, thus increasing the rates of deletions in spermatozoa, whereas other individuals might have haplotypes with higher degrees of direct and inverted homologies with their own paralogous copies increasing

both the rates of *de novo* deletions and inversions in spermatozoa. In this sense, the availability of methodologies that enable studying the genomic architecture of specific LCRs would allow for identifying possible predisposing haplotypes that would explain these differences and that would potentially increase the risk of transmission of 15q11q13 anomalies.

CONCLUSIONS:

We found a high frequency of 15q11-q13 inversions in spermatozoa from both controls and PWS fathers, thus suggesting a high incidence of heterozygous inversion carriers in the general population that could have important implications, as they have been described as predisposing haplotypes for genomic disorders. As a whole, the results obtained in this work confirm the high instability of the 15q11q13 region, which is prone to different types of *de novo* reorganizations generated by intrachromatid NAHR events.

METHODS

Biological samples

Semen samples from 10 control donors aged between 24 and 50, and 16 PWS fathers from 32 to 60 years of age were obtained. Donors were volunteers recruited from the general population. All subjects had normal karyotypes and were normozoospermic. To our knowledge, none of them had been exposed to genotoxic agents, and no history of chemotherapy, radiotherapy or chronic illness was recorded.

All subjects gave their informed consent in writing to participate in the study and the protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Slide preparation

Samples were processed as described previously by our group [28]. Briefly, the sperm fraction was resuspended in hypotonic solution (0.075 M KCl) for 30 minutes at 37°C and fixed in methanol:acetic acid (3:1). Spermatozoa were spread on a slide and kept at -20°C until processed.

Probes

Three BAC clones were selected using the resources of the Genome Browser database (UCSC Assembly; February 2009). All clones were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute, BACPAC resources (Oakland, CA 94609 USA). BAC DNA extraction was performed using the QIAprep Miniprep kit (Qiagen GmbH; Hilden, Germany) following manufacturer's instructions.

BAC clones RP11-1122J3, RP11-322N14 and RP11-230M20 were fluorescently labeled with Spectrum Green-dUTPs (Abbott Molecular; Abbott Park, IL, USA), Spectrum Orange-dUTPs (Abbott Molecular) and DEAC-dUTPs (Perkin Elmer Inc; Boston, USA), respectively, by Nick Translation (Roche; Mannheim, Germany). Probes were mixed with 10 µg of Cot 1 DNA (Invitrogen; Carlsbad, USA), ethanol precipitated and resuspended in hybridization buffer (50% Formamide, 1xSSC and 10% dextran sulphate) (Abbott Molecular).

Probe positions were verified on lymphocyte metaphase chromosomes. Hybridization in spermatozoa was determined by the evaluation of 1,000 sperm nuclei per probe in three different FISH experiments.

Fluorescence *in situ* Hybridization on sperm (sperm-FISH)

Prior to hybridization, sperm nuclei were decondensed by slide incubation at 37°C in Tris buffer containing 25 mmol/ml dithiothreitol and 1% Triton X-100 for 45 minutes.

A triple-color FISH using the three BAC clones differentially labeled was performed following standard procedures. Briefly, probes were denatured at 80°C for 8 minutes and pre-annealed at 37°C for 15 minutes. Sperm nuclei were denatured at 73°C in 70% formamide in 2xSSC for 5 minutes. Hybridization was carried out by adding 5 µl of the corresponding probe mixture (200 ng of each probe) to the sperm preparation and incubating the slides in a moist chamber at 37°C for 48 hours. Post-hybridization washes were performed in 1xSSC with 0.3% NP-40 at 73°C followed by 2xSSC with 0.1% NP-40 at room temperature, for one minute in each solution. Slides were mounted with antifade solution (Abbott Molecular).

Analyses were performed using an Olympus BX-60 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter, and specific filters for Aqua, FITC and Cy3.

A minimum of 1,000 informative sperm nuclei were analyzed per sample.

Confocal Laser-Scanning Microscopy

To confirm the existence of normal and inverted haplotypes, 80 sperm-nuclei were captured and analyzed using a confocal-laser scanning TCS-SP5 AOBS microscope (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH; Mannheim, Germany).

Spectrum Orange fluorochromes were excited with the 561-nm line of a DPSS laser and observed in the red channel at an emission range of 569-nm to 671-nm. Spectrum Green fluorochromes were excited with the 405-nm line of a diode laser and viewed in the green channel at 502-nm to 551-nm. Finally, DEAC fluorochromes were excited with the 488-nm line of an Argon laser and observed in the blue channel at an emission range of 444-nm to 500-nm. Stacks of 16 to 20 sections every 0.3 μm were acquired.

Image combining and processing were performed with the IMARIS software package version 2.7 (Bitplane AG; Zürich, Switzerland).

Data Analyses

Data obtained were statistically analyzed using SPSS version 15.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) under the advice of the statistical service of the Universitat Autònoma de Barcelona.

To assess the relationship between the two inverted haplotypes, the following analyses were performed:

- The mean frequencies of Type-1 and Type-2 inversions were compared in both populations by a Wilcoxon test.

- A Pearson's correlation test between the frequencies of the two inverted haplotypes was performed.

To assess the susceptibility of the 15q11-q13 region to generate inversions, the following statistical tests were performed:

- Population level: The mean population frequency of 15q11q13 inversions were compared between controls and PWS fathers by means of the Mann-Whitney test.
- Individual level: A Chi-square test comparing the inversion frequencies of every single PWS father with the mean frequency of inversions observed in the control population was performed.
- Age effect: A Pearson's correlation test between the sum of inversions and the age of all subjects was performed.

To assess a possible relationship between the frequency of inversions and the frequency of deletions previously found by our group [17]:

- Spearman's correlations between the frequency of the total inversions (Type-1 + Type-2) and the frequency of deletions were performed for both the control population and the PWS fathers.

Differences and correlations were considered statistically significant when $P < 0.05$.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

OM was responsible for conception and design, acquisition of data, data analysis and interpretation, writing the manuscript and final approval. EA was responsible for revision of data and interpretation and final approval. FV was responsible for conception and design, data analysis and interpretation, writing the manuscript and final approval. JB was responsible for conception and design, data analysis and interpretation, writing the manuscript and final approval.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Dr. Joan Aurich (OneCell Systems) for his kind assistance in BAC processing and labeling protocols. This work was supported by the projects CF-180034 (Universitat Autònoma de Barcelona) and SAF-2010-22241 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Oscar Molina is the recipient of a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB/PIF2007). This manuscript has been proofread by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking university instructor of English.

REFERENCES

1. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR: **Copy number variation in human health, disease, and evolution.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009, **10**:451-481.
2. Gu W, Zhang F, Lupski JR: **Mechanisms for human genomic rearrangements.** *Pathogenetics* 2008, **1**:4.
3. Stankiewicz P, Lupski JR: **Structural variation in the human genome and its role in disease.** *Annu Rev Med* 2010, **61**:437-455.
4. Emanuel BS, Shaikh TH: **Segmental duplications: an ‘expanding’ role in genomic instability and disease.** *Nat Rev Genet* 2001; **2**:791-800.
5. Bailey JA, Eichler EE: **Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**:552-564.
6. Feuk L: **Inversion variants in the human genome: role in disease and genome architecture.** *Genome Med* 2010, **2**:11.
7. 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**:R57-64.
8. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD: **Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:370-386.
9. Makoff AJ, Flomen RH: **Detailed analysis of 15q11-q14 sequence corrects errors and gaps in the public access sequence to fully reveal large segmental duplications at breakpoints for Prader-Willi, Angelman, and inv dup(15) syndromes.** *Genome Biol* 2008, **8**:R114.

10. Butler MG, Fisher W, Kibiryeveva N, Bittel DC: **Array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis in Prader-Willi syndrome.** *Am J Med Genet A* 2008, **146**:854-860.
11. **Online Mendelian Inheritance in Man.** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>].
12. Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC *et al*: **A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome.** *Nat Genet* 2001, **29**:321-325.
13. 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**:82-89.
14. Dennis NR, Veltman MW, Thompson R, Craig E, Bolton PF, Thomas NS: **Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11-q13.** *Am J Med Genet A* 2006, **140**:434-441.
15. Ungaro P, Christian SL, Fantes JA, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH: **Molecular characterization of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14.** *J Med Genet* 2001, **38**:26-34.
16. Salavoura K, Kolialexi A, Sofocleous C, Kalaitzidaki M, Pampanos A, Kitsiou S, Mavrou A: **Complex rearrangements of chromosome 15 in two patients with mild/atypical Prader-Willi syndrome.** *Genet Couns* 2008, **19**:219-224.
17. Molina O, Blanco J, Vidal F: **Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers.** *Mol Hum Reprod* 2010, **16**:320-328.
18. **UCSC Genome Bioinformatics.** [<http://genome.ucsc.edu/>]

19. Martin RH: **Cytogenetic determinants of male infertility.** *Hum Reprod Update* 2008, **14**:379-390.
20. Anton E, Vidal F, Blanco J: **Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers.** *Hum Reprod* 2007, **22**:2088-2092.
21. Sarrate Z, Vidal F, Blanco J: **Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance.** *Fertil Steril* 2009, **93**:1892-1902.
22. Van den Engh G, Sachs R, Trask BJ: **Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by random walk model.** *Science* 1992, **257**:1410-1412.
23. Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L; Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X *et al*: **Genomic inversion of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions.** *Hum Mol Gen* 2003, **12**:849-858.
24. Bosch N, Morell M, Ponsa I, Mercader JM, Armengol L, Estivill X: **Nucleotide, cytogenetic and expression impact of the human chromosome 8p23.1 inversion polymorphism.** *PLoS One* 2009, **4**:e8269.
25. Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, Pani AM, Kistler DJ, Rios CM, Kimberley KW, Gregg RG, Bray-Ward P: **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* 2010, **154C**:220-228.
26. Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA: **Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a**

- susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion.** *Genome Res* 2008; **18**:683-694.
27. Carvalho CM, Lupski JR: **Copy number variation at the breakpoint region of isochromosome 17q.** *Genome Res* 2008; **18**:1724-1732.
28. Sarrate Z, Anton E: **Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm.** *J Vis Exp* 2009.
29. Antonacci F, Kidd JM, Marques-Bonet T, Ventura M, Siswara P, Jiang Z, Eichler EE: **Characterization of six human disease-associated inversion polymorphisms.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**:2555-2566.
30. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: **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**:52-67.
31. Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez-Jurado LA: **Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:131-151.
32. Sugawara H, Harada N, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K, Ohta T, Kishido T, Niikawa N, Matsumoto N: **Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23.** *Genomics* 2003, **82**:238-244.
33. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RH, Schroer RJ, Novara F, DeGregory M, Ciccone R et al: **A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures.** *Nat Genet* 2008, **40**:322-328.

34. Rao PN, Li W, Vissers LE, Veltman JA, Ophoff RA: **Recurrent inversion events at 17p21.31 microdeletion locus are linked to the MAPT H2 haplotype.** *Cytogenet Genome Res* 2010, **129**:275-279.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Products generated by NAHR according to the LCR orientation and the chromatids involved. (N=normal; del=deletion; dup=duplication; ace=acentric; inv=inversion).

FIGURE 2: Spermatozoa classification regarding signal distribution. Examples of two- and three-dimensional images of the same sperm nucleus are showed. a) Normal haplotype, b) Type-1 inversion haplotype and c) Type-2 inversion haplotype.

FIGURE 3: a) Correlation between the frequencies of Type-1 and Type-2 inversions, b) Mean frequencies of 15q11q13 inversions in control donors and PWS fathers. Bars represent the standard error of the mean (SEM), c) Frequencies of Type-1 and Type-2 inversions observed in every single PWS father. Asterisks show cases with significant higher incidences of inversions.

TABLE 1: Examples of polymorphic inversions and the related genomic disorders reported to be caused as secondary rearrangements.

INVERSION	SIZE (Mb)	GENOMIC DISORDER/REARRANGEMENT	REFERENCE
inv(3)(q29)	1.9	3q29 microdeletion syndrome	[29]
inv(5)(q35)	1.3	Sotos syndrome	[30]
inv(7)(q11.23)	1.8	Williams-Beuren syndrome	[31]
inv(8)(p23)	4.7	8p23 microdeletion syndrome	[32]
inv(15)(q11q13)	4	Angelman syndrome	[23]
inv(15)(q13.3)	2	15q13.3 deletion syndrome	[33]
inv(17)(q12)	1.5	RCAD syndrome	[29]
inv(17)(q21.31)	0.9	17q21.21 deletion syndrome	[34]

TABLE 2: Sperm-FISH results in control donors

CASES	Age	Total	Informative (%)	Haplotypes ^a		
				Normal	Type-1 inv	Type-2 inv
C-1	26	1416	1015 (71.68)	873 (86.01)	54 (5.32)	88 (8.67)
C-2	24	1479	1061 (71.74)	932 (87.84)	41 (3.86)	88 (8.29)
C-3	25	1494	1018 (68.13)	842 (82.71)	45 (4.42)	131 (12.87)
C-4	23	1435	1063 (74.08)	937 (88.15)	56 (5.27)	70 (6.59)
C-5	36	1343	1012 (75.35)	862 (85.18)	45 (4.45)	105 (10.38)
C-6	28	1488	1024 (68.82)	834 (81.44)	46 (4.49)	144 (14.06)
C-7	50	1663	1051 (63.20)	960 (91.34)	23 (2.19)	68 (6.47)
C-8	50	1461	1005 (68.79)	852 (84.78)	28 (2.79)	125 (12.44)
C-9	42	1210	1003 (82.89)	912 (90.93)	13 (1.29)	78 (7.78)
C-10	26	1490	1040 (69.80)	943 (90.67)	19 (1.83)	78 (7.50)
%±SEM			71.45%±1.66	86.91%±1.10	3.59%±0.46	9.51%±0.87

^a Number and percentage of informative nuclei

TABLE 3: Sperm-FISH results in PWS fathers

CASES	Age	Total	Informative (%)	Haplotypes ^a		
				Normal	Type-1 inv	Type-2 inv
PW-1	41	1309	1012 (77.31)	802 (79.35)	58 (5.73)*	152 (15.02)*
PW-2	35	1278	1313 (79.26)	901 (88.94)	21 (2.07)	91 (8.98)
PW-3	44	1274	1017 (79.83)	929 (91.35)	21 (2.06)	67 (6.59)
PW-4	35	1373	1065 (77.57)	919 (86.29)	35 (3.29)	111 (10.42)
PW-5	30	1604	1045 (65.15)	874 (83.64)	38 (3.63)	133 (12.73)*
PW-6	33	1375	1008 (73.31)	903 (89.58)	26 (2.58)	79 (7.84)
PW-7	47	1465	1060 (72.35)	852 (89.81)	22 (2.08)	86 (8.11)
PW-8	50	1406	1048 (74.54)	907 (86.54)	24 (2.29)	117 (11.16)
PW-9	60	1462	1095 (74.90)	1021 (93.24)	15 (1.37)	59 (5.39)
PW-10	60	1321	1014 (76.76)	831 (91.95)	42 (4.14)	141 (13.90)*
PW-11	42	1313	1010 (76.92)	847 (83.86)	43 (4.26)	120 (11.88)
PW-13	53	1509	1063 (70.44)	856 (80.53)	54 (5.08)	153 (14.39)*
PW-14	55	1500	1015 (67.67)	929 (91.53)	22 (2.17)	64 (6.31)
PW-15	47	1357	1007 (74.21)	881 (87.49)	44 (4.37)	82 (8.14)
PW-16	44	1462	1014 (69.36)	886 (87.38)	17 (1.68)	111 (10.95)
PW-17	-	1494	1059 (70.88)	937 (88.48)	23 (2.17)	99 (9.35)
%±SEM			73.78%±1.05	86.87%±1.02	3.06%±0.33	10.07%±0.74

^a Number and percentage of informative sperm nuclei

* Statistically significant increases ($P<0.05$).

FIGURE 1

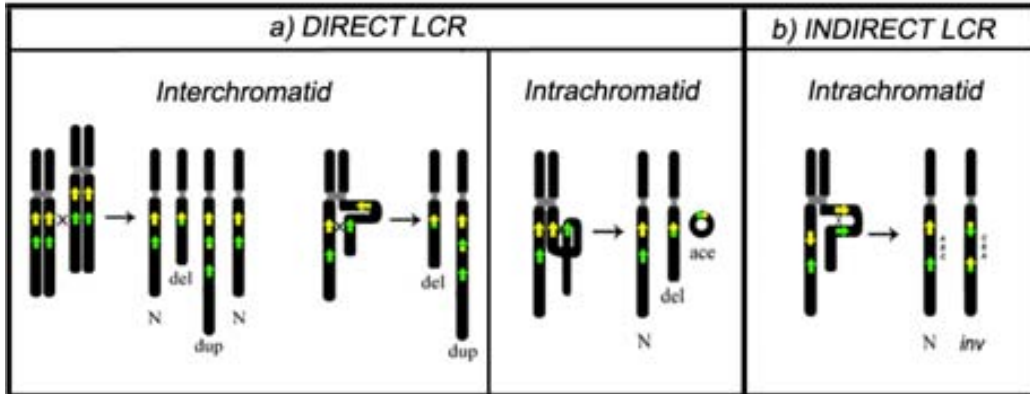


FIGURE 2

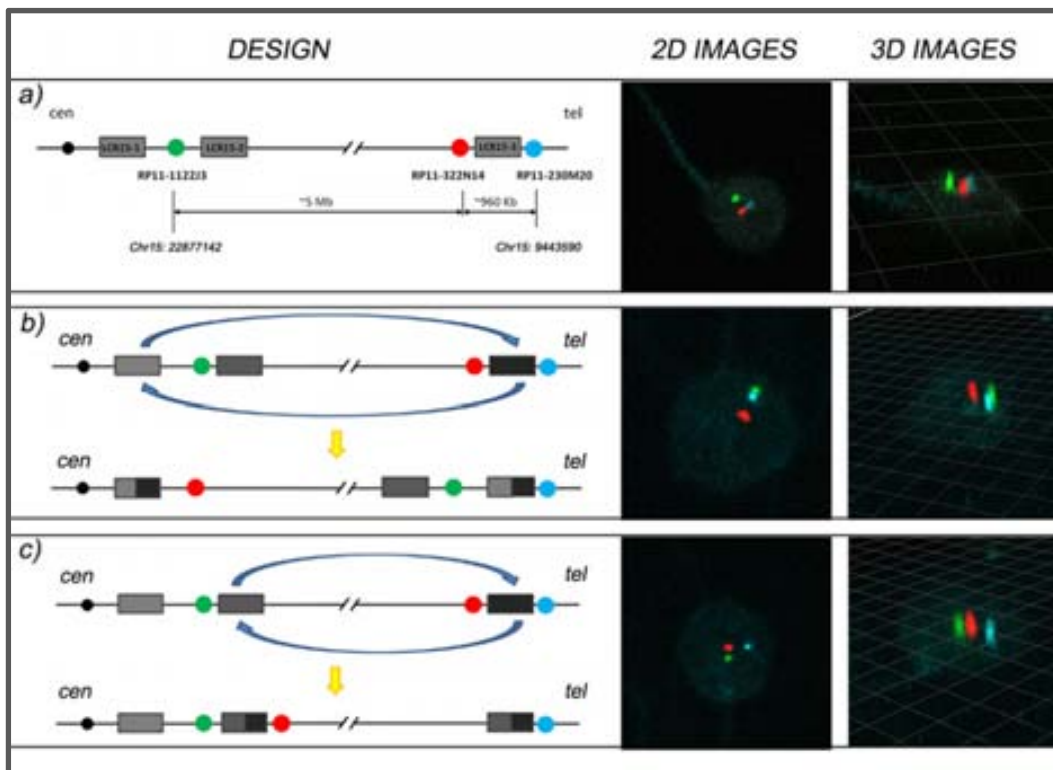
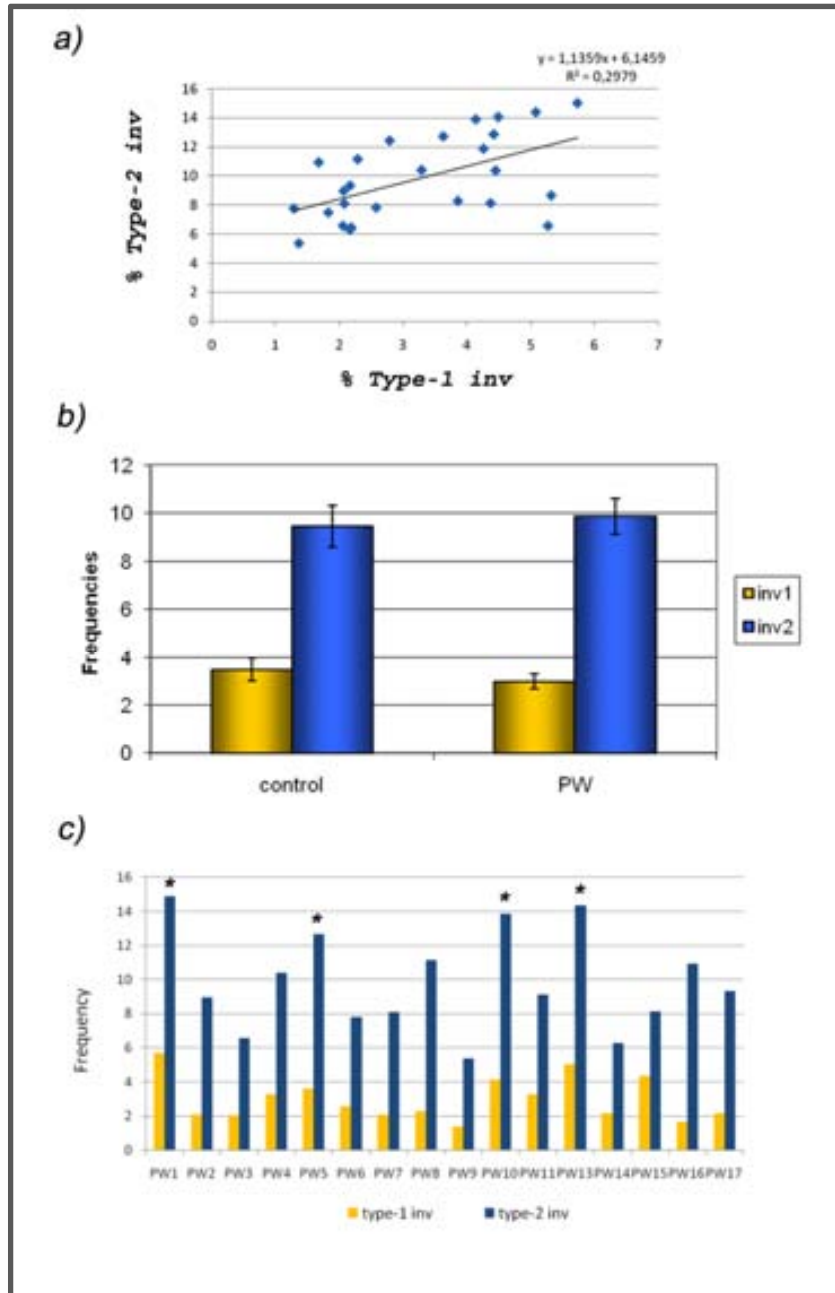


FIGURE 3



TREBALL 4 :

*High-resolution FISH on DNA fibers for low-copy repeats
genome architecture studies*

Molina O, Blanco J, Anton E, Vidal F, Volpi EV

BMC Genomics (en procés de revisió)

**HIGH-RESOLUTION FISH ON DNA FIBERS FOR LOW-COPY REPEATS
GENOME ARCHITECTURE STUDIES**

O. Molina¹, J. Blanco^{1§}, E. Anton¹, F. Vidal¹ and E.V. Volpi²

¹ Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain.

² The Wellcome Trust Center for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, United Kindom.

§ Corresponding author.

E-mail addresses:

OM: oscar.molina.campoy@uab.cat

JB: joan.blanco@uab.cat

EA: ester.anton@uab.cat

FV: francesca.vidal@uab.cat

EVV: evolpi@well.ox.ac.uk

ABSTRACT:

BACKGROUND: It has been estimated that 5% of the human genome is constituted by duplicated DNA sequences of 1Kb or more in size known as Low-Copy Repeats (LCRs). Due to the high degree of homology between paralogous copies, LCRs act as substrates for Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR) leading to genomic structural variation. The complex organization of LCRs hampers their study by sequence assembly methods. The aim of this study was to assess the potential of Fiber-FISH for LCRs direct visualization to support investigations of genome architecture within these challenging genomic regions. Our work focused on the LCR22-2 involved in NAHR events leading to deletions of the 22q11.2 region.

RESULTS: We describe a set of Fiber-FISH experiments specifically designed for the study of the LCR22-2 genomic organization. Four fosmid clones covering the entire length of the LCR22-2 and a proximally positioned single-copy BAC-clone were selected to allow unequivocal identification of the LCR22-2. The probes were hybridized in different multiple color combinations on DNA fibers from two karyotypically normal cell lines. We observed variability between the two cell lines and in particular were able to identify three distinct haplotypes, characterized by differences in copy-number and arrangement of the LCR22-2 genes and pseudogenes.

CONCLUSIONS: Our results show that Multicolor Fiber-FISH is a viable methodological approach for the analysis of genome organization within complex LCR regions.

BACKGROUND

It has been estimated that the 5% of the human genome is constituted by segmental duplications or Low Copy Repeats (LCR) [1]. LCRs are repetitive DNA elements from 1 to 400 Kb in length sharing a high level of sequence identity (>95%) [2]. Due to the high degree of homology between paralogous copies, they are considered highly dynamic regions leading to genomic instability by non-allelic homologous recombination (NAHR) [3, 4].

As a result, LCRs are susceptible to structural and copy-number variation of their own genes and pseudogenes. This variation has been directly associated to the occurrence of some diseases [5-7] and to the formation of specific haplotypes, which have been linked to an increased susceptibility to secondary rearrangements of the region flanked by the LCR [8]. Rearrangements may be either somatic, causing sporadic disease in the individual, or in the germ line, leading to an increase in the risk of transmission to the offspring [8].

Some LCR haplotypes have been suggested to predispose to specific structural rearrangements: 1) Copy number variation (CNV) within some portions of the LCRs flanking the 7q11.23 region has been linked to the occurrence of deletions of the Williams-Beuren syndrome critical region [9], 2) Variation in the copy-number and arrangement of the simple LCRs REPA and REPB at the chromosome region 17p11 is believed to confer different susceptibility to the formation of 17p isochromosomes [10], and 3) CNV of duplicated blocks within the BP1 and BP3 at 16p12.1 have recently been reported to predispose to deletions of this region [11].

Despite the recent advances in copy-number and structural variation detection [12], the repeated nature and often complex organization of LCRs hampers their analysis by standard methodologies such as array comparative genomic hybridization (array-CGH)

and single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays. The development of next-generation sequencing techniques has been successfully used to analyze the CNV of the whole genome [13], as well as specific LCRs, this is the case of the LCR22 of the 22q11.2 region [14]. PCR-based techniques have also allowed the quantification of the number of repeats shaping specific LCRs (7q11.23; [9]).

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) provides an alternative approach for the analysis of the genomic architecture of LCRs. By enabling the direct visualization of target DNA sequences *in situ*, FISH not only allows copy number assessment, but also facilitates the identification of balanced structural variants such as inversions and translocations. In particular, FISH on stretched DNA fibers (Fiber-FISH) with closely spaced probes has been satisfactorily applied in several high-resolution physical mapping studies [15-17] and as a validation technique in CNV studies [18-23]. Moreover, it has also been used to assess the number of paralogous copies of the simple LCRs REPA and REPB on the 17p11.2 region [24].

The pericentromeric area of chromosome 22 contains its own LCRs (LCR22). These LCRs are involved in recurrent reorganizations causing different genomic disorders [25]. Among them, the DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (DGS) represents the most common deletion-caused syndrome in humans with an incidence of 1 every 4,000 newborns (OMIM188400) [26]. DGS is mostly caused by 3 Mb hemizygous deletions involving the flanking LCR22-2 and LCR22-4 (Figure 1). These LCRs are complex mosaics of genes, pseudogenes and other repetitive elements partially formed by *Alu*-mediated recombination events during primate evolution [27]. The functional genes distributed along the LCR22s, are *USP8*, *BCR*, *GGTLA* and *GGT* (Figure 1). Duplications of these genes and their own pseudogenes during evolution shaped the LCR22s [28].

In this work, we applied Fiber-FISH to determine structural and copy number variants within the LCR22-2. The main objective of the study was to assess the ability of FiberFISH - as a high-resolution mapping technique - to resolve the genomic architecture of complex LCRs, and to establish its potential as a methodological approach to assess risk haplotypes for critical regions.

RESULTS

Clone selection and positioning

Four fosmid clones were selected from the *Genome Browser database* (UCSC Assembly Feb 2009) [29]: WI2-938L9, WI2-451K3, WI2-1268B22 and WI2-1822L21. These clones cover the genes and pseudogenes of the LCR22-2: *USP18*, *AC008132*, *GGT3P*, *DGCR6*, and *PRODH* (Figure 2) (table 1). A single-copy BAC clone (RP11-66F9) approximately 1 Mb proximal to the LCR22-2 (UCSC Assembly February 2009) (Figure 2), and a painting probe for the chromosome 22 (WCP22) (Cambio) were used as reference probes.

Chromosomal mapping was verified on metaphase chromosomes using the following combination of probes: RP11-66F9 and WCP22 (Figure 3a), RP11-66F9 and WI2-938L9 (Figure 3b), RP11-66F9 and WI2-1268B22 (Figure 3c), WI2-938L9 and WI2-451K3 (Figure 3d), WI2-1268B22 and WI2-1822L21 (Figure 3e).

Experimental design

A set of Fiber-FISH experiments were performed to establish the LCR22-2 genomic architecture in two karyotypically normal cell lines (see Methods section). DNA fibers were stretched on slides as previously described [30]. The experiments were designed as follows:

1. *Unequivocal identification of the specific LCR22-2 signals*

To distinguish between specific signals of LCR22-2 from paralogous copies distributed in other LCRs on 22q, the control probe RP11-66F9 (mapping just outside the LCR22-2, proximally) and the fosmid clone WI2-451K3 were co-hybridized, allowing to identify patterns – based on the number of WI2-451K3 repetitions - to be used as an LCR22-2 reference in the following hybridizations.

2. *Determination of the LCR22-2 architecture*

Once the number of WI2-451K3 copies was established, three dual-color fiber-FISH experiments were performed by co-hybridizing WI2-451K3 and WI2-938L9, WI2-451K3 and WI2-1268B22, WI2-1268B22 and WI2-1822L21. These high-resolution mapping experiments allowed the assessment of the LCR 22-2 genes copy number and relative arrangement.

Structure of the LCR22-2 in the Cell line A

A total of 68 informative fiber-FISH images were captured and analyzed to study the organization of the LCR22-2 in cell line A.

- RP11-66F9 and WI2-451K3: A larger signal corresponding to RP11-66F9 followed/preceded by a consistent pattern of five repeats for WI2-451K3 was observed. RP11-66F9 was either separated (55%; Figure 4a) or overlapping (45%; Figure 4b) with the first WI2-451K3 repeat (20 informative fibers were analyzed).
- WI2-451K3 and WI2-938L9: WI2-451K3 showed the previously observed pattern. Five signals were identified for WI2-938L9, totally or partially overlapping with WI2-451K3 (Figure 4c) (17 informative fibers were analyzed).
- WI2-451K3 and WI2-1268B22: Overlapped or partially-overlapped signals from these two probes were observed. Results showed two different patterns for WI2-1268B22 which either two or three signals (52.4% and 47.6% respectively; Figure 4d and e) (21 informative fibers were analyzed).
- WI2-1268B22 and WI2-1822L21: Two or three signals for WI2-1268B22 (60% and 40% respectively) were observed followed/preceded by one signal for WI2-1822L21 (Figure 4f and g) (10 informative fibers were analyzed).

To determine whether an inversion was the cause of the two different signal patterns or “Fiber-FISH haplotypes” observed co-hybridizing the RP11-66F9 and WI2-451K3 clones (Figures 4a and b), an additional three-color Fiber-FISH was performed using the probes RP11-66F9, WI2-451K3 and WI2-1822L21. Two different signal patterns with the same frequency were observed: 1) RP11-66F9 followed by WI2-451K3 and WI2-1822L21 (42.8%; Figure 5a), and 2) RP11-66F9 followed by WI2-1822L21 and WI2-451K3 (57.1%; Figure 5b). These results strongly suggest the presence of an inversion involving most of the LCR22-2 in one of the two chromosome 22 homologs. In order to relate the number of WI2-1268B22 signals (Figures 4d and e) with the inversion, a further three-color Fiber-FISH experiment was performed using the clones RP11-66F9, WI2-1268B22 and WI2-1822L21. Two clone distributions were observed: 1) RP11-66F9, WI2-1822L21 and two signals of WI2-1268B22 (38%; Figure 5c), and 2) RP11-66F9, WI2-1268B22 (three signals) and WI2-1822L21 (62%; Figure 5d). These results suggest that the inversion segregates with the haplotype showing two signals for WI2-1268B22.

Structure of the LCR22-2 in the cell line B

A total of 69 informative images were analyzed using the following two-color Fiber-FISH experiments.

- 1) RP11-66F9 and WI2-451K3: As observed in cell line A, five contiguous signals for WI2-451K3 were observed, all of them separated to the RP11-66F9 signal (Figure 6a) (18 informative fibers were analyzed).
- 2) WI2-451K3 and WI2-938L9: As in cell line A, five contiguous signals for WI2-451K3 and 5 partially overlapped WI2-938L9 signals were detected (Figure 6b) (20 informative fibers were analyzed).

- 3) WI2-451K3 and WI2-1268B22: Two signals for WI2-1268B22 were consistently found on the third and fourth WI2-451K3 signals (Figure 6c) (14 informative fibers were analyzed).
- 4) WI2-1268B22 and WI2-1821L21: Two signals for WI2-1268B22 were observed followed/preceded by one signal for WI2-1821L21 (Figure 6d) (17 informative fibers were analyzed).

Results allowed us to propose a model for the architecture of the LCR22-2 in the cell line A and B (Figure 7).

DISCUSSION

This work demonstrates the ability of Fiber-FISH to resolve the genomic architecture of complex LCRs. The experimental strategy consists in: 1) selecting specific clones spanning the genes and pseudogenes within the LCR, 2) selecting chromosomal markers to be used as positional references to facilitate the unequivocal identification of the LCR under investigation, and 3) developing and applying strict assessment criteria for the analysis of the Fiber-FISH hybridization patterns.

By direct visualization of haplotypic repeat patterns. Fiber-FISH allows both inter-chromosomal and inter-individual variability to be reliably ascertained, as our results on the LCR22-2 show (Figure 7). Our observations suggest an arrangement of the LCR22-2 comprising five copies of the *USP18* gene and the *GGT*-related *AC008132* pseudogene, and of either two or three copies of the *GGT3P* pseudogene, all of them closely localized to each other and repeated in a modular fashion (Figure 7). Furthermore, we observed an inverted haplotype. The inversion involves most of the LCR22-2; accordingly, the relative position of the *PRODH* and *DGCR6* genes was close to the clone RP11-66F9. This arrangement for the LCR22-2 is *different* from the one published in the current human genome assembly (UCSC Assembly Feb2009). Thus, our results highlight the potential of Fiber-FISH to elicit important, so far unmasked information on the structural complexity of LCRs.

Some LCR haplotypes have been suggested to increase the likelihood of misalignment and NAHR, thus increasing the risk of transmission of secondary disease-associated rearrangements to the offspring [9-11]. Moreover, some data demonstrated a different susceptibility to NAHR among individuals. Our group have recently reported increased rates of deletions of the 15q11-q13 region in spermatozoa of fathers of children affected by Prader-Willi syndrome [31], as well as increased rates of 7q11.23 and 22q11.2

deletions in spermatozoa of fathers of Williams-Beuren or DiGeorge/Velocardiofacial children respectively (unpublished data), thus suggesting the presence of predisposing haplotypes to NAHR in these subjects.

The results obtained in this work demonstrate the potential of the Fiber-FISH methodology for the identification of predisposing LCR haplotypes in the flanking critical regions in parents of individuals affected by genomic disorders. This would allow the establishment of a direct relationship between specific LCR haplotypes and increased rates of NAHR in gametes.

METHODS

Cell culture

Two karyotypically normal B-lymphoblastoid cell lines were used: 1) GM0171 (Human Genetics Collection, Health Protection Agency (HPA), U.K.; no longer available) and 2) DO208915 (European collection of Cell Cultures, HPA), referred in the manuscript as cell line A and B respectively.

Cell cultures were grown in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% foetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% L-Glutamine at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 72 hours.

Slide preparation

Two kinds of preparations were performed:

- 1) Metaphase chromosomes were obtained following standard procedures: one hour before harvesting, cells were treated with Colcemid (Invitrogen) at a final concentration of 0.2 µg/mL. They were then resuspended in hypotonic solution (0.075 M KCl) for 10 minutes at 37°C and fixed in methanol:acetic acid (3:1).
- 2) DNA fibers were stretched on as previously described [30]. Briefly, 2 mL of a cell culture were centrifuged and the pellets were washed in 1xPBS. Pellets were resuspended in 1xPBS to reach a final concentration of 2x10⁶ cells/mL and spread on slides. Once the slides were mounted on the Shandon Sequenza Coverplates DNA fibers were released applying a lysis solution (0.07 M NaOH in Ethanol). Finally, fibers were fixed in methanol.

In both cases, slides were kept at -20°C until processed.

Probes

All clones were kindly provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK). Clone extraction was carried out using the QuickClean 5M Miniprep kit (GenScript) following the manufacturer's instructions.

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

In two-color FISH experiments, clones were labeled by Nick-Translation (Abbott Molecular) either with Digoxigenin-11-dUTP (Roche) or Biotin-16-dUTP (Roche) (Table 1). In three-color experiments, Alexa594-dUTP (Invitrogen) was also used. Probes were ethanol precipitated with a mix of salmon testis DNA (GIBCO-BRL), *Escherichia coli* tRNA (Boehringer) and 3M sodium acetate. 200 ng of labeled DNA probe and 4 µg of Cot1 competitor DNA (Invitrogen) were mixed and dried on a heating block at 60°C, and resuspended in 1 x hybridization buffer (50% formamide, 1xSSC and 10% dextran sulfate) to a final concentration of 40 ng/µL. For Fiber-FISH experiments, two-fold the labeled DNA probe and Cot1 competitor DNA were used (final concentration of 80 ng/µL of each probe).

FISH was carried out following standard procedures (Jefferson i Volpi 2010). Briefly, probes were denatured at 75°C for 5 minutes and pre-annealed at 37°C for 45 minutes. Slides were denatured in 70% formamide/2xSSC at 70°C for 1 minute and hybridized in a moist chamber at 37°C overnight. Slides were washed twice in 50% formamide/1xSSC and once in 2xSSC, for 5 minutes at 42°C, followed by 5 minutes in 1xPBS at room temperature. For fiber-FISH experiments milder washes were used: one wash in 50% formamide/1xSSC, followed by one wash in 2xSSC, both of them for 5 minutes at 42°C.

In two-color FISH, probes were detected with either fluorescein-conjugated antidigoxigenin (Roche) or Cy3-conjugated Streptavidin (Sigma). In the three-color experiments, no detection was needed for the Alexa594 labeled-probe while probes

labeled with digoxigenin and biotin were detected by fluorescein-conjugated antidigoxigenin (Roche) and Cy5-conjugated Streptavidin (CyDye, Amersham Pharmacia Biotech) respectively. The slides were mounted with Vectashield (Vector Laboratories) containing 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for chromosome counterstaining.

Image acquisition and data analyses

Image capture and analysis were carried out on a CytoVision system (Leica) consisting of an Olympus BX-51 epifluorescence microscope coupled to a JAI CVM4+ CCD camera.

Fiber-FISH analysis was performed by applying the following scoring criteria:

- Fibers were considered informative when at least two signals of different colors were observed overlapping or proximal in a consecutive fashion.
- Two or more signals of the same color were considered independent when they were separated by a distance twice the distance of every single bead-on-string.
- Signals were considered informative regardless of the size.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS:

OM was responsible for conception and design, acquisition of data, data analysis and interpretation, writing the manuscript and final approval. JB was responsible for conception and design, data analysis and interpretation, writing the manuscript and final approval. EA was responsible for revision of data and interpretation and final approval. FV was responsible for revision of data and interpretation and final approval. EVV was responsible for conception and design, data analysis and interpretation, and final approval.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING:

This work was supported by the project SAF 2010-22241 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Oscar Molina is the recipient of a grant from Universitat Autònoma de Barcelona (UAB/PIF2007) and a mobility studentship from the same institution (UAB/ESTPIF0042). Emanuela Volpi is supported by the Wellcome Trust (Wellcome Trust Core Award 090532/Z/09/Z). The Authors would like to thank the Staff at the Molecular Cytogenetics and Microscopy Core of the Wellcome Trust Centre for Human Genetics (University of Oxford) for expert technical assistance. The DNA probes for Fiber-FISH were kindly provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, U.K.).

REFERENCES

1. She X, Jiang Z, Clark RA, Liu G, Cheng Z, Tuzun E, Church DM, Sutton G, Halpern AL, Eichler EE: **Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome.** *Nature* 2004, **431**:927-930.
2. Emanuel BS, Shaikh TH: **Segmental duplications: an ‘expanding’ role in genomic instability and disease.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:791-800.
3. Lupski JR: **Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits.** *Trends Genet* 1998, **14**:417-422.
4. Stankiewicz P, Lupski JR: **Structural variation in the human genome and its role in disease.** *Annu Rev Med* 2010, **61**:437-455.
5. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ *et al*: **The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility.** *Science* 2005, **307**:1434-1440.
6. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E *et al*: **Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans.** *Nature* 2006, **439**:851-855.
7. Fellerman K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P *et al*: **A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**:439-448.

8. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR: **Copy number variation in human health, disease, and evolution.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009, **10**:451-481.
9. Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA: **Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion.** *Genome Res* 2008, **18**:683-694.
10. Carvalho CM, Lupski JR: **Copy number variation at the breakpoint region of isochromosome 17q.** *Genome Res* 2008, **18**:1724-1732.
11. Antonacci F, Kidd JM, Marques-Bonet T, Teague B, Ventura M, Girirajan S, Alkan C, Campbell CD, Vives L, Malig *et al*: **A large and complex structural polymorphism at 16p12.1 underlies microdeletion disease risk.** *Nat Genet* 2010, **42**:745-750.
12. Aten E, White SJ, Kalf ME, Vossen RH, Thygesen HH, Ruivenkanp CA, Kriek M, Breuning MH, den Dunnen JT: **Methods to detect CNVs in the human genome.** *Cytogenet Genome Res* 2008, **123**:313-321.
13. Alkan C, Kidd JM, Marques-Bonet T, Aksay G, Antonacci F, Homozdiari F, Kitzman JO, Baker C, Malig M, Mutlu O *et al*: **Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing.** *Nat Genet* 2009, **41**:1061-1067.
14. Guo X, Freyer L, Morrow B, Zheng D: **Characterization of the past and current duplication activities in the human 22q11.2 region.** *BMC Genomics* 2011, **12**:71.

15. Raap AK, Florijin RJ, Blonden LAJ, Wiegant J, Vaandrager JW, Vrolijk H, den Dunnen J, Tanke HJ, van Ommen GJ: **Fiber FISH as a DNA Mapping Tool.** *Methods* 1996, **9**:67-73.
16. Protopopov A, Kashuba V, Zabarovska VI, Muravenko OV, Lemman MI, Klein G, Zabarovsky ER: **An integrated physical and gene map of the 3.5-Mb chromosome 3p21.3 (AP20) region implicated in the major human epithelial malignancies.** *Cancer Res* 2003, **63**:404-412.
17. Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P *et al*: **Two novel translocation breakpoints upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia.** *Clin Genet* 2007, **71**:67-75.
18. Erdel M, Hubalek M, Lingenhel A, Kofler K, Duba HC, Utermann G: **Counting the repetitive kringle-IV repeats in the gene encoding human apolipoprotein(a) by fiber-FISH.** *Nat Genet* 1999, **21**:357-358.
19. Sallinen R, Vihola A, Bachinski LL, Huoponen K, Haapasalo H, Hackman P, Zhang S, Sirtto M, Kalimo H, Meola G *et al*: **New methods for molecular diagnosis and demonstration of the (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2).** *Neuromuscul Disord* 2004, **14**:274-283.
20. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C: **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nat Genet* 2004, **36**:949-951.
21. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R *et al*: **Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation.** *Nat Genet* 2007, **39**:1256-1260.

22. Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T, Murphy C, Fitzgerald T, Lee AS, Hyland C, Stone AC, Hurles ME, Tyler-Smith C *et al*: **Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees**. *Genome Res* 2008, **18**:1698-1710.
23. Shimojima K, Imai K, Yamamoto T: **A de novo 22q11.22q11.23 interchromosomal tandem duplication in a boy with developmental delay, hyperactivity, and epilepsy**. *Am J Med Genet A* 2010, **152A**:2820-2826.
24. Barbouti A, Stankiewicz P, Nusbaum C, Cuomo C, Cook A, Hoglund M, Johansson B, Hagemeyer A, Park SS, Mitelman F *et al*: **The breakpoint region of the most common isochromosome, i(17q), in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large, palindromic, low-copy repeats**. *Am J Hum Genet* 2004, **74**:1-10.
25. Emanuel BS: **Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements**. *Dev Disabil Res Rev* 2008, **14**:11-18.
26. **Online Mendelian Inheritance in Man**, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>].
27. Babcock M, Pavlicek A, Spiteri E, Kashork CD, Ioshikhes I, Shaeffer LG, Jurka J, Morrow BE: **Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution**. *Genome Res* 2003, **13**:2519-2532.
28. Babcock M, Yatsenko S, Hopkins J, Brenton M, Cao Q, de Jong P, Stankiewicz P, Lupski JR, Sikela JM, Morrow BE: **Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome**. *Hum Mol Genet* 2007, **16**:2560-2571.
29. **UCSC Genome Bioinformatics**, [<http://genome.ucsc.edu>].

30. Jefferson A, Volpi EV: **Fluorescence in situ hybridization (FISH) for genomic investigation in rat.** *Methods Mol Biol* 2010, **659**:409-426.
31. Molina O, Blanco J, Vidal F: **Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers.** *Mol Hum Reprod* 2010, **16**:320-328.

FIGURE LEGENDS:

FIGURE 1: Schematic representation of the 22q11.2 region. Grey boxes represent the three LCR22 involved in the most frequent 22q11.2 deletions and duplications. Purple lines represent the genes described within the LCR22-2 and 4 (UCSC Assembly Feb2009) [29]. Red and green lines represent the clones used in this study and the color used for their detection in FISH experiments.

FIGURE 2: Map of the LCR22-2 (chr22:18,663,074-18,992,962) according to the *Genome Browser database* (UCSC Assembly Feb2009) [29]. The length of the LCR is represented as a grey box. Figure shows the Reference sequence genes (*purple*) and the clones used in the study. Bar colors represent the color they were detected with (*red*: Cy3 and *green*: FITC).

FIGURE 3: Clone mapping by metaphase FISH a) Co-hybridization of WCP22 (*green*) with RP11-66F9 (*red*), b) Co-hybridization of RP11-66F9 (*green*) with WI2-938L9 (*red*), c) Co-hybridization of RP11-66F9 (*green*) with WI2-1268B22 (*red*), d) Co-hybridization of WI2-938L9 (*green*) with WI2-451K3 (*red*) and e) Co-hybridization of WI2-1268B22 (*green*) with WI2-1822L21 (*red*).

FIGURE 4: Dual-color Fiber-FISH experiments in the cell line A: a) RP11-66F9 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); b) RP11-66F9 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); c) WI2-938L9 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); d) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); e) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); f) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-1822L21 (*green*); g) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-1822L21 (*green*).

FIGURE 5: Detection of an inverted haplotype in the cell line A by three-color Fiber-FISH. Color-bars show the signal distributions observed for every single haplotype. a) Co-hybridization of RP11-66F9 (*red*), WI2-451K3 (*green*) and WI2-1822L21 (*purple*), signal distribution following the current human genome assembly ; b) Co-hybridization of RP11-66F9 (*red*), WI2-451K3 (*green*) and WI2-1822L21 (*purple*), signal distribution corresponding to an inversion regarding the current human genome assembly; c) Co-hybridization of RP11-F99 (*green*), WI2-1268B22 (*purple*) and WI2-1822L21 (*red*), signal distribution following the current human genome assembly ; d) Co-hybridization of RP11-F99 (*green*), WI2-1268B22 (*purple*) and WI2-1822L21 (*red*), signal distribution corresponding to an inversion regarding the current human genome assembly.

FIGURE 6: Dual-color FiberFISH experiments in cell line B: a) RP11-66F9 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); b) WI2-938L9 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); c) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-451K3 (*green*); d) WI2-1268B22 (*red*) and WI2-1822L21 (*green*).

FIGURE 7: Proposed model for the genomic architecture of the LCR22-2 in the two cell lines analyzed. The two “Fiber-FISH haplotypes” detected in the cell line A were named A1 and A2, and the haplotype detected in the cell line B was names B1.

TABLE 1: Characteristics of the clones (UCSC Assembly Feb 2009) [27].

Clone	Whitehead F.E.S. name	Size (Kb)	Position	Gene	Labeling
WI2-938L9	G248P80545F5	37	chr22:18,631,074- 18,672,626	<i>USP18</i>	Biotin
WI2-451K3	G248P8704F2	44	chr22:18,725,757- 18,770,041	<i>AC008132</i>	Digoxigenin
WI2-1268B22	G248P82259A11	40	chr22:18,751,182- 18,793,055	<i>GGT3P</i>	Biotin
WI2-1822L21	G248P86641F11	39	chr22:18,883,978- 18,992,962	<i>DGCR6</i> and <i>PRODH</i>	Digoxigenin
RP11-66F9 ^a	-	175	chr22:17,381,569- 17,556,908	-	Biotin

^a Clone placed by cytogenetic map using FISH (UCSC Assembly Feb2009).

FIGURE 1:

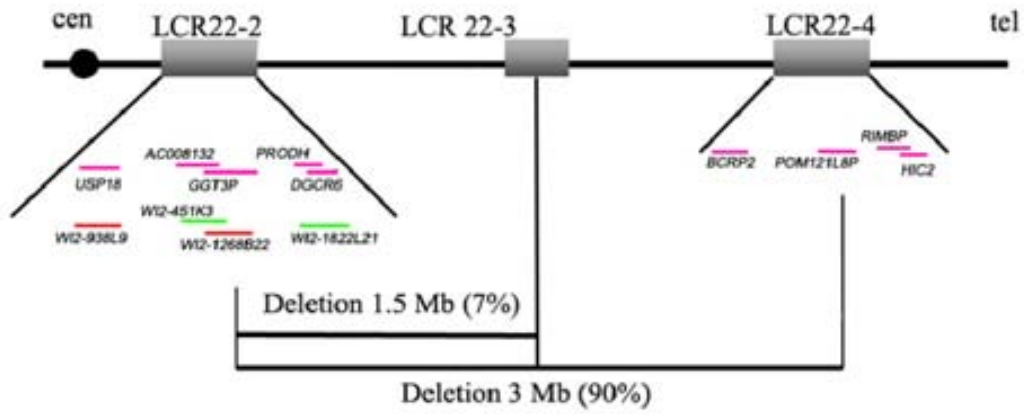


FIGURE 2:

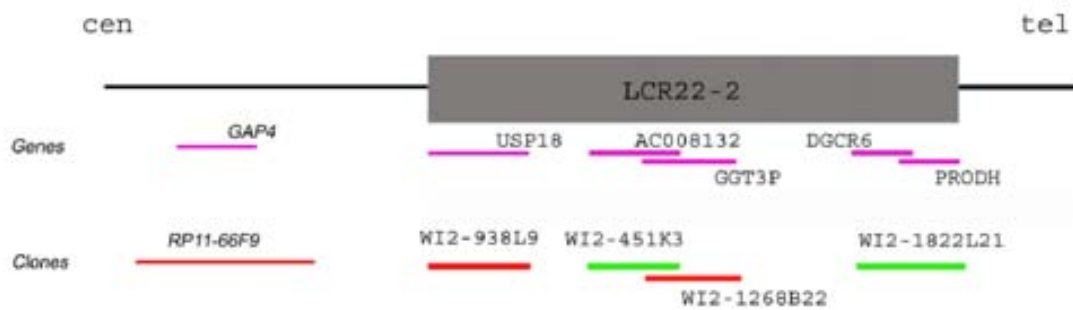


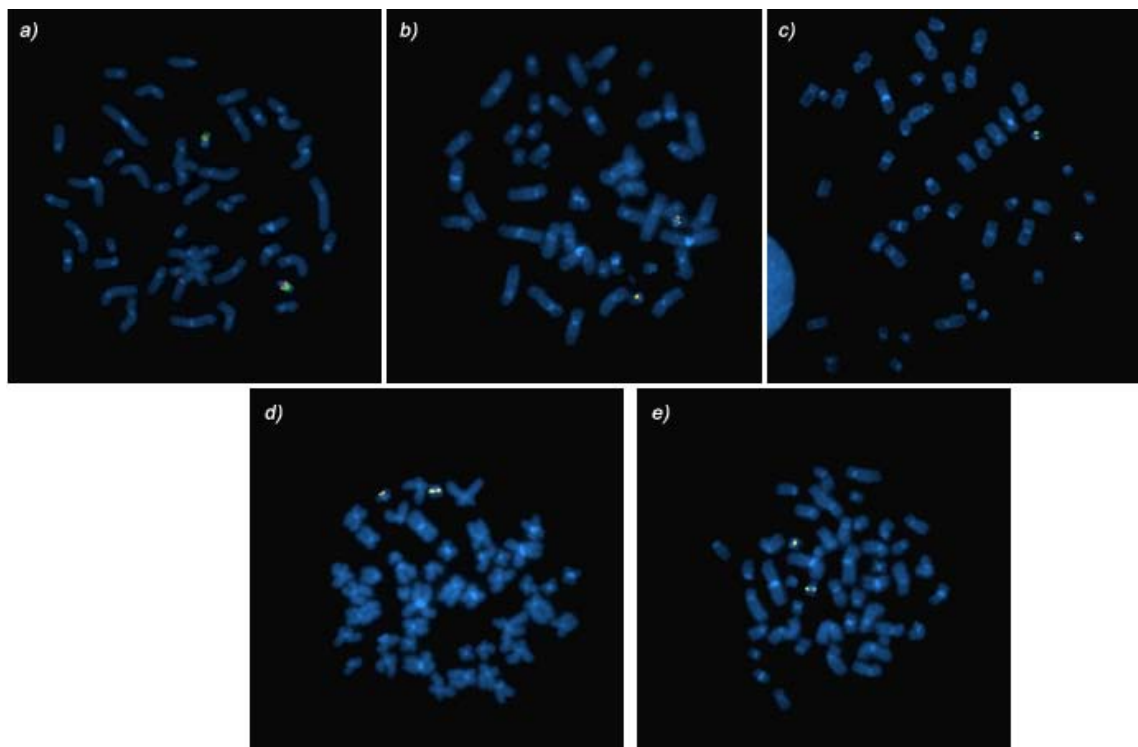
FIGURE 3:

FIGURE 4:

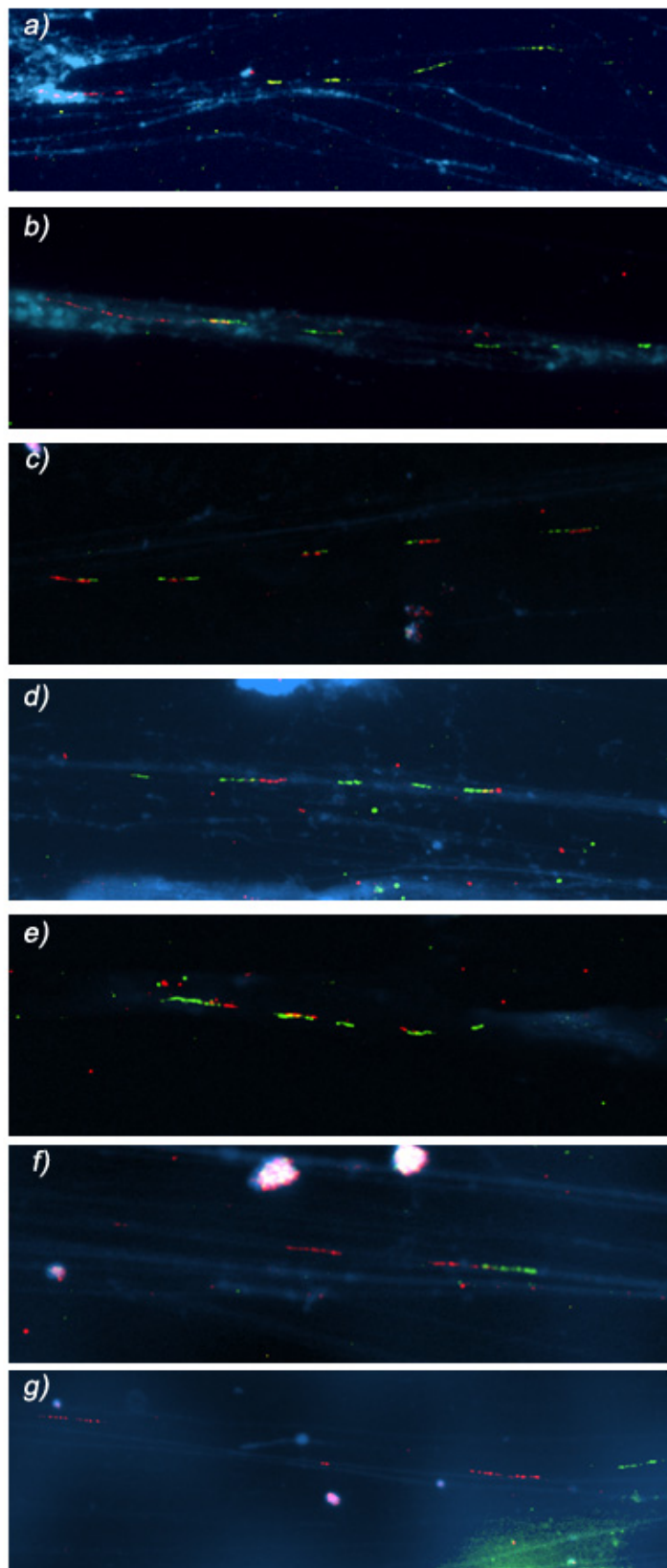


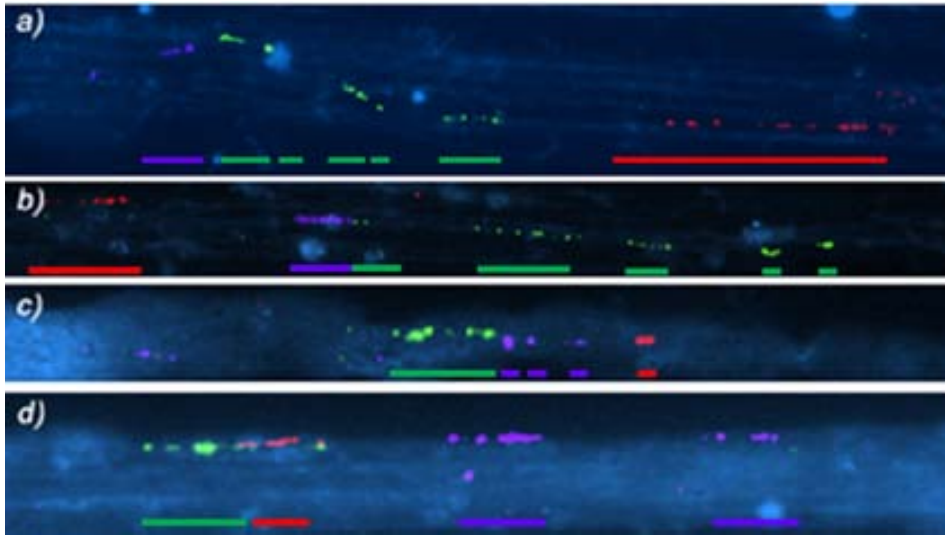
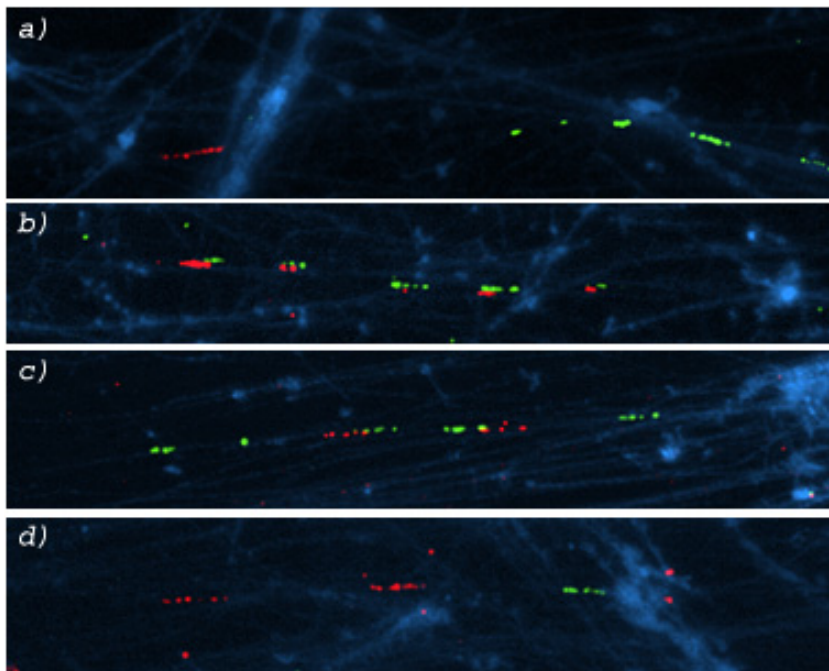
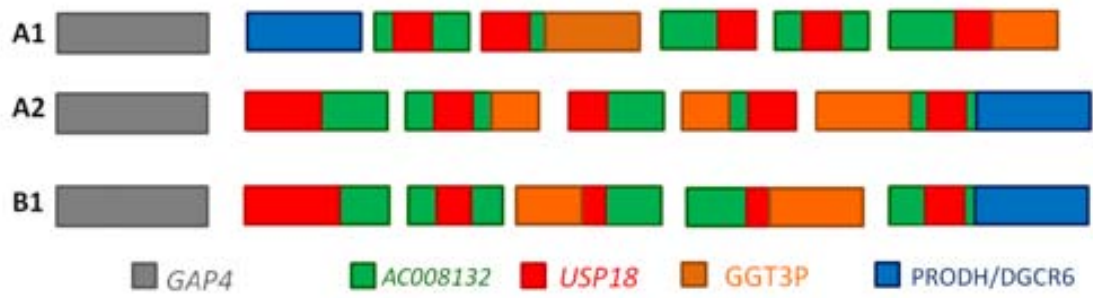
FIGURE 5:**FIGURE 6:**

FIGURE 7:



6. DISCUSSIÓ

6.1. CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES

La tècnica de FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoides s'ha utilitzat àmpliament en estudis citogenètics d'espermatozoides (Martin 2005). Aquesta metodologia s'ha aplicat principalment en estudis de segregació en portadors de reorganitzacions cromosòmiques (Anton et al. 2007) i com a eina per valorar la freqüència d'aneuploïdies en pacients infèrtils (Sarrate et al. 2009). Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren la validesa de la metodologia per valorar la freqüència dels productes de la NAHR quan s'aplica un disseny experimental adequat. Aquest disseny ha d'incloure la descripció de criteris de valoració estrictes que permetin identificar inequívocament els diferents genotips que es volen analitzar.

6.1.1. ESTUDIS DE DELECCIONS I DUPLICACIONS

Per a la detecció de delecions i duplicacions es van utilitzar dues sondes marcades diferencialment i localitzades en el cromosoma implicat en la reorganització. Una sonda específica de locus que reconeixia la regió crítica i una altra com a control d'hibridació. La presència de la sonda utilitzada com a control d'hibridació i l'absència de la sonda que marca la regió crítica van ser identificades com a delecions. Per altra banda, la presència de la sonda utilitzada com a control d'hibridació i dos senyals d'hibridació per la sonda que marca la regió crítica van ser identificades com a duplicacions. Tenint en compte criteris de valoració estàndard en espermatozoides (Blanco et al. 1996), dos senyals es consideren independents quan es troben separats per una distància superior al seu diàmetre i presenten la mateixa intensitat. En aquest sentit, és important destacar que la resolució de la FISH sobre nuclis interfàsics és de 100 Kb (Tkachuk et al. 1990). Considerant les duplicacions majoritàries de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 (apartat 1.5) i els locus reconeguts per les sondes utilitzades, la distància estimada a la que es trobaran les regions crítiques duplicades es de 3 Mb, 10 Mb i 6 Mb per les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 respectivament, molt superiors al límit de resolució de la FISH. Així doncs, el disseny experimental utilitzat permet distingir clarament els dos senyals de les sondes específiques i identificar la presència de duplicacions per aquestes regions.

Els resultats obtinguts en la població control van mostrar un error estàndard molt baix en relació a la mitjana (taules 4.1, 4.2 i 4.3). L'elevada homogeneïtat dels resultats indica la consistència de la metodologia emprada que es manifesta mitjançant eficiències d'hibridació òptimes en espermatozoides i l'adequació dels criteris de valoració aplicats per a la valoració de delecions i duplicacions.

6.1.2. ESTUDIS D'INVERSIONS DE LA REGIÓ 15q11-q13

En general, en els estudis de FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoides s'infereix la constitució cromosòmica mitjançant la valoració de la presència o absència dels senyals d'hibridació. Els resultats obtinguts en aquesta tesi també posen de manifest la seva fiabilitat per l'anàlisi de variants estructurals equilibrades, com són les inversions.

Altres autors han identificat inversions mitjançant FISH interfàsica (Gimelli et al. 2003; Osborne et al. 2001). Aquests estudis s'han realitzat en limfòcits humans i es basen en l'ordre dels senyals d'hibridació en el nucli per discriminar entre haplotips normals i invertits. A diferència dels estudis anteriors, el nostre disseny experimental s'ha basat en la relació que existeix entre la distància genètica i la distància física dels senyals d'hibridació per discriminar haplotips. L'aplicació de la nostra metodologia sobre nuclis d'espermatozoides va mostrar tres distribucions diferents de senyals de FISH: Distribucions de 2 senyals associats més un senyal independent (distribucions 2+1), associacions de tres senyals i tres senyals separats.

Les associacions de tres senyals o la presència de tres senyals separats poden ser la conseqüència de la presència de *loops* de cromatina resultants de l'empaquetament del DNA en el nucli interfàsic (Vorsanova et al. 2010). Per aquest motiu, els nuclis que presentaven aquestes distribucions varen ser considerats com a nuclis no informatius i van ser descartats de l'anàlisi.

Pel que fa a les distribucions 2+1, aquestes es van assignar a tres haplotips diferents: normals, inversió de tipus 1 i inversió de tipus 2. En les tres distribucions 2+1 identificades, els dos senyals associats es troben a una distància inferior a 1 Mb, mentre que el senyal independent resta separat per una distància superior a 5 Mb. Si tenim en compte que la separació dels senyals d'hibridació en un nucli interfàsic incrementa a mesura que la distància genètica de dos sondes és més gran i que aquesta relació és vàlida fins a distàncies genètiques de 2 Mb (van den Engh et al. 1992) podem concloure que les sondes utilitzades ens permeten discriminar clarament els diferents haplotips 2+1.

6.2. SUSCEPTIBILITAT A LA NAHR

6.2.1. FREQUÈNCIA BASAL DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES

Les freqüències basals de delecions i duplicacions per les regions analitzades (7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2) no varen mostrar diferències significatives entre elles. Alguns autors han suggerit que algunes característiques dels LCR, com són la mida, l'homologia o la distància entre les

còpies paràlogues, tenen un efecte directe sobre la freqüència de NAHR (Gu et al. 2008; Inoue i Lupski 2002; Lupski 1998). En les tres regions que varem estudiar, els LCRs no presenten diferències pel que fa a la seva homologia, sent en tots els casos superior al 99%. Per altra banda, si que existeixen diferències en la distància que separa els LCRs en cada regió: els LCRs que es troben implicats més freqüentment en els fenòmens de NAHR en les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 es troben separats per 1.5 Mb, 5.4 Mb i 3 Mb, respectivament (Figures 1.5, 1.6 i 1.7). La mida d'aquests LCRs també presenta diferències: 320 Kb en la regió 7q11.23 (Cusco et al. 2008), 500 Kb en la regió 15q11-q13 (Makoff i Flomen 2008) i 240 Kb en la regió 22q11.2 (McDermid i Morrow 2002). L'absència de diferències en les freqüències d'anomalies cromosòmiques en les regions analitzades, indiquen que al menys per aquestes regions no existeix una relació entre la freqüència de NAHR i la mida i la distància dels LCR (Molina et al. 2010a).

Altres autors han comparat les freqüències de NAHR en espermatozoides en diferents regions i com nosaltres, han relacionat els resultats amb homologia, distància i mida dels LCRs (Turner et al. 2008). Entre els diferents LCRs analitzats en el treball de Turner et al. (2008) (WBS-LCR de la regió 7q11.23, CMT1-REP de la regió 17p11.2, LCR17p de la regió 17p11.2 i AZFa-HERV de la regió Yq11.21), es va observar que la freqüència més baixa de delecions i duplicacions en espermatozoides es donava entre els LCR que es trobaven separats per més distància, concretament els LCR 17p (5 Mb). Tot i això, per la resta de regions no van observar cap relació entre les freqüències de NAHR i els factors anomenats anteriorment. Recentment, Liu i col·laboradors (Liu et al. 2011) acoten l'efecte en les freqüències de NAHR únicament a la mida dels LCR de la regió 17p11.2.

En conjunt, les dades actuals no ens permeten determinar l'efecte d'aquestes variables sobre la freqüència de NAHR. En aquest sentit, caldria estendre els estudis a altres regions d'arquitectura genòmica particular.

Els nostres resultats van mostrar una freqüència equivalent de delecions i duplicacions en espermatozoides per les tres regions. No obstant, la incidència dels trastorns genòmics relacionats amb aquestes anomalies en la població és diferent (Taula 1.2). A més, les freqüències de delecions i duplicacions observades en espermatozoides van ser un grau de magnitud més elevades que la incidència de les síndromes relacionades en la població general. Aquests resultats suggereixen una selecció negativa sobre aquestes anomalies cromosòmiques durant el desenvolupament embrionari. De fet, s'han descrit duplicacions de la regió 15q11-q13 (Schaeffer et al. 2004) i delecions de la regió 22q11.2 (Chen et al. 2006; Le Caignec et al. 2005; Patel et al. 2006) en fetus (diagnòstic prenatal) o avortaments espontanis de primer trimestre.

Assumint que no hi ha diferències en la capacitat de fecundar entre els espermatozoides portadors d'aquestes anomalies, els resultats indiquen que el grau de viabilitat depèn de la regió afectada. A partir de la comparació de les freqüències de delecions en espermatozoides i de la incidència de les síndromes associades en la població (Taula 6.1), sembla que les delecions de la regió 22q11.2 serien més viables que les delecions de les regions 7q11.23 i 15q11-q13 (quocient espermatozoides/població = 6.8, 28.4 i 45.8, respectivament). Aquestes diferències podrien venir donades pel número i l'expressió dels gens que es troben en aquestes regions (Enkhmandakh et al. 2004; Enkhmandakh et al. 2009).

Regió	Freqüència poblacional	Freqüència en espermatozoides*	Quocient espermatozoides/població
7q11.23	7.4×10^{-5}	2.1×10^{-3}	28.4
15q11-q13	4.8×10^{-5}	2.2×10^{-3}	45.8
22q11.2	2.5×10^{-4}	1.7×10^{-3}	6.8

*Freqüència mitjana establerta en la població general

TAULA 6.1: Diferències en les freqüències de delecions observades entre espermatozoides i la població general.

Tot i que no varem observar diferències poblacionals en les freqüències de delecions i duplicacions entre les tres regions analitzades, l'anàlisi de conglomerats jeràrquics va permetre agrupar els individus en funció dels patrons observats en les tres regions (Figura 4.1). En aquest sentit, és important destacar que s'han descrit diferents haplotips de predisposició a la NAHR en individus control (Taula 1.3) que podrien explicar les diferències interindividuais.

Per altra banda, també es va estudiar la freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13 en aquests individus control. Es van observar dos tipus d'inversions (inversions de tipus 1 i tipus 2), que es corresponen amb els segments implicats en les delecions de classe I i de classe II. Mentre que les inversions de tipus 2 havien estat descrites prèviament (Gimelli et al. 2003), el nostre disseny experimental va permetre identificar també les inversions de tipus 1.

Com en el cas de les delecions, les inversions més freqüents són les de tipus 2. Aquests resultats indiquen que els fenòmens de NAHR en la regió 15q11-q13 tenen lloc preferentment entre el LCR15-2 i 3. Aquesta situació es pot explicar per la presència de seqüències paràlogues més llargues entre aquests dos LCRs (Liu et al. 2011; Makoff i Flomen 2008) o bé que el LCR15-2 presenti una freqüència de DSBs superior en relació al LCR15-1 (implicat en les delecions i

inversions de tipus 1), ja sigui perquè aquest presenta una major densitat de *hotspots* de recombinació o una conformació del DNA que el fa més susceptible a trencaments.

Els nostres resultats van indicar una freqüència d'inversions en espermatozoides d'individus control sorprenentment elevada (13.1%; Taula 4.12). Dues evidències indiquen que les inversions detectades es generen *de novo*:

- La segregació meiótica d'un portador heterozigot per aquesta inversió generaria un 50% de gàmetes portadors de l'al·lel normal i un 50% de gàmetes portadors de la inversió. Com que la freqüència d'inversions no va ser del 50% en cap dels individus analitzats, vam excloure la possibilitat de la presència de portadors constitucionals d'aquestes inversions en heterozigosi.
- La presència d'un mosaïcisme en la línia germinal per aquestes inversions seria una altra possibilitat. No obstant, la presència d'un mosaïcisme germinal generaria freqüències d'inversions molt variables, ja que el grau de mosaïcisme no té perquè ser el mateix entre individus. Els nostres resultats mostren una elevada homogeneïtat, descartant així aquesta possibilitat.

L'elevada freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13 observada en espermatozoides suggereix que un percentatge important de la població general podria ser portador en heterozigosi d'aquestes inversions. Si tenim en compte la freqüència total d'inversions en espermatozoides (inversions de tipus 1 i inversions de tipus 2=13.1%) i assumint que la freqüència d'aquestes reorganitzacions és equivalent en oòcits, vam aplicar la llei de Hardy-Weinberg per inferir les freqüències al·lèliques. Així doncs, la freqüència de portadors heterozigots seria del 22.6% ($2 \times 13/100 \times 87/100$), la freqüència de portadors homozigots per l'al·lel normal seria del 75.7% ($87/100 \times 87/100$) i la freqüència d'homozigots per la inversió seria del 1.7% ($13/100 \times 13/100$) (Figura 6.1).

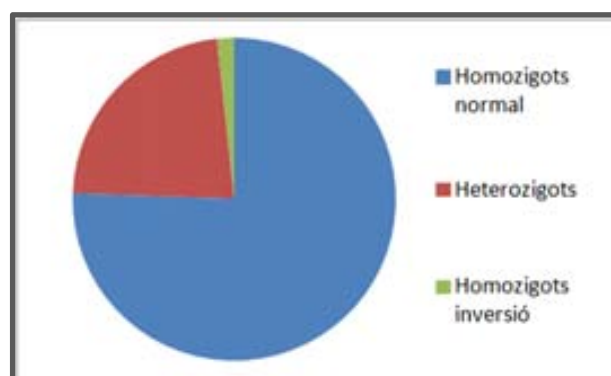


FIGURA 6.1: Freqüències esperades d'homozigots i heterozigots pels al·lells normals i d'inversió de la regió 15q11-q13 en la població general.

És important destacar que només en els portadors de la inversió en heterozigosi el risc de NAHR estaria incrementat, ja que aquests generarien una regió asinàptica que afavoriria la NAHR a meiosi (apartat 1.6). Aquests resultats coincideixen amb l'elevada freqüència de portadors d'inversions de la regió 15q11-q13 en heterozigosi observats per altres autors en població control (9%; Gimelli et al. 2003) i amb dades publicades per altres regions amb característiques similars. Per exemple, s'han descrit incidències de portadors heterozigots d'inversions de les regions 7q11.23 i 8p23.1 del 5.4% i 79% respectivament (Bosch et al. 2009; Hobart et al. 2010). En general, aquestes dades reforcen la hipòtesi que les freqüències d'inversions en la població estan subestimades entre la totalitat de variacions estructurals del genoma humà degut a la dificultat metodològica per a la seva detecció (Feuk 2010).

6.2.2. FREQUÈNCIA DE NAHR EN INDIVIDUS DE RISC

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

En termes poblacionals, els pares d'individus amb descendència afectada per la SPW van mostrar un increment significatiu de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 (Molina et al. 2010b). En aquest increment poblacional hi van contribuir 10 dels 16 pares analitzats. S'ha suggerit que algunes variacions estructurals, com inversions de la regió crítica (Gimelli et al. 2003; Osborne et al. 2001) o variacions en el número de repeticions dels LCRs (Amos-Landgraf et al. 1999; Cusco et al. 2008; Sharp et al. 2007) podrien actuar com a factors de predisposició a la transmissió de delecions causants de trastorns genòmics a la descendència. Els nostres resultats suggereixen una relació entre l'aparició de la SPW en la descendència i un increment de la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11-q13 en espermatozoides.

L'increment de delecions i duplicacions en espermatozoides no és exclusiu dels pares amb descendència afectada per la SPW originada per delecio. Dos dels individus que mostren increments significatius són pares amb fills afectats per la SPW causada per DUP maternes (PW-1 i PW-10; Taula 4.4), entre els quals hi ha el cas amb la freqüència de delecions més elevada de tota la sèrie analitzada (PW-10: 2.76%).

Les DUP es consideren anomalies de segregació que es generen de forma independent als fenòmens de NAHR. No obstant, podem relacionar la DUP amb fenòmens de NAHR en el cas de les DUP parcials. S'han descrit casos de SPW causats per DUP parcials (Gregory et al. 1991; Nazarenko et al. 2004; Salavoura et al. 2008) així com casos de DUP parcials implicades en altres patologies (Kotzot 2008). Els casos de DUP parcials de la regió 15q11-q13 poden ser explicats mitjançant una doble recombinació (Nazarenko et al. 2004). Aquests autors van suggerir que la

DUP parcial s'havia produït com a conseqüència d'un procés en tres fases (Figura 6.2a): 1) trisomia del cromosoma 15 en el zigot com a conseqüència d'una no disjunció a la meiosi materna, 2) doble HR postzigòtica entre un cromosoma d'origen matern i un patern i 3) rescat del trisòmic amb pèrdua del cromosoma matern reorganitzat. Per altra banda, les DUP parcials també es poden produir mitjançant fenòmens de conversió gènica que poden donar-se per diferents mecanismes de la via de reparació homòloga (Figura 6.2b), com SDSA (*Synthesis Dependent Strand Annealing*) o el model de la doble unió *Holliday*.

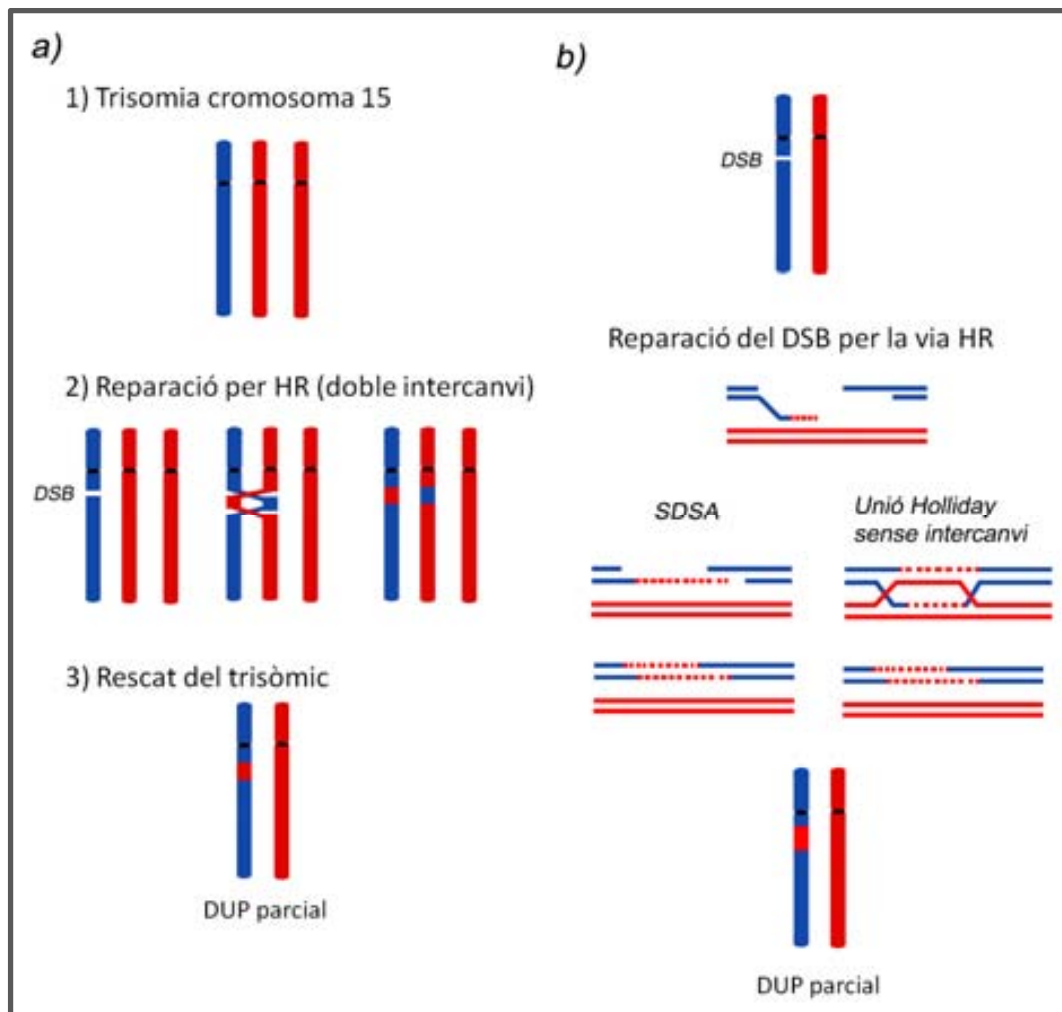


FIGURA 6.2: Formació de DUP parcials: **a)** Model de Nazarenko et al. (2004), doble HR amb intercanvi, **b)** Conversió gènica produïda mitjançant mecanismes de la via de reparació homòloga (*Synthesis Dependent Strand Annealing*, SDSA i doble unió de Holliday sense intercanvi). El cromosoma patern està representat en blau i el matern en vermell.

L'origen genètic de la SPW en el nostre estudi es va establir analitzant marcadors interns per la regió 15q11-q13, aquest fet va impossibilitar la discriminació entre DUP totals i parcials.

En qualsevol cas, els nostres resultats indiquen que els increments en la freqüència de delecions i duplicacions en espermatozoides són un reflex de la inestabilitat de la regió 15q11-q13 que la predispone a diferents tipus de reorganitzacions cromosòmiques: com són delecions, duplicacions, inversions i probablement DUP parcials.

En relació a la freqüència d'inversions de la regió 15q11-q13 aquesta no va ser més elevada que la observada en la població control. Malgrat això, varem observar increments significatius d'inversions en 4 dels 16 pares analitzats (Taula 4.13). És important destacar que aquests quatre individus van ser classificats prèviament com a individus de risc per presentar increments significatius de delecions de la regió 15q11-q13.

PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LES SÍNDROMES DE WILLIAMS-BEUREN I DIGEORGE/VELOCARDIOFACIAL

En termes poblacionals, no varem observar increments significatius de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 22q11.2 en els pares amb descendència afectada per la SWB i la SDG respectivament. Les comparacions individuals van mostrar increments significatius de delecions i duplicacions de la regió 7q11.23 en 3 dels 15 individus amb descendència afectada per la SWB, i increments significatius d'anomalies de la regió 22q11.2 en 2 dels 10 individus amb descendència afectada per la SDG. L'origen parental de les delecions en la descendència només va poder ser establert en dos dels cinc individus que presentaven increments (WS-11 i DG-2). L'increment significatiu de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides del individu DG-2 es va poder relacionar directament amb la delecio d'origen patern causant de la SDG en la descendència. En canvi, el cas WS-11 va resultar tenir descendència afectada per la SWB d'origen matern. S'han descrit casos d'individus portadors d'haplotips de predisposició que tenen descendència afectada per la SWB causada per delecions amb un origen parental diferent (Frohauer et al. 2010; Hobart et al. 2010). Si es té en compte que aquests haplotips de predisposició incrementen la susceptibilitat a la NAHR, aquesta situació podria explicar un increment de delecions i duplicacions en espermatozoides de la regió 7q11.23 en un pare amb descendència afectada per la SWB d'origen matern.

INESTABILITAT GENERAL A LA NAHR

L'anàlisi de les diferents poblacions de pares amb descendència afectada per trastorns genòmics ha demostrat que alguns individus presenten un increment en la susceptibilitat a la NAHR que

incrementa la generació d'espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques. Aquesta situació es pot explicar per diferents raons:

- La presència d'haplotips de risc específics per a una regió determinada.
- L'alteració dels mecanismes que eviten la NAHR. Existeixen dades a la literatura que indiquen que les cèl·lules presenten mecanismes específics per evitar la NAHR i reduir la generació d'anomalies cromosòmiques (Sasaki et al. 2010). Aquests mecanismes consisteixen en l'activació de proteïnes de reparació de nucleòtids desaparellats (*mismatch repair proteins*), o l'activació d'helicases que dificulten l'acció de proteïnes com la RAD51 i la formació de les unions de *Holliday* per evitar els entrecreuaments.

En aquest sentit, per estudiar la causa dels increments d'anomalies cromosòmiques observats, varem analitzar en aquests individus la freqüència de delecions i duplicacions d'altres regions amb característiques similars (apartat 3.1.5). Els resultats van mostrar un increment poblacional en la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SPW en relació als valors control, suggerint que efectivament altres factors a banda dels haplotips de predisposició a la NAHR, podrien estar implicats en l'increment d'anomalies observats.

En la població de pares amb descendència afectada per la SPW es varen analitzar tots els individus per les tres regions. És important destacar que els individus que presentaven increments d'anomalies per altres regions varen ser prèviament classificats com individus de risc, per presentar increments de delecions i duplicacions per la regió 15q11-q13. A més, es van trobar correlacions significatives entre la freqüència d'anomalies de la regió 15q11-q13 i les freqüències observades en les regions 7q11.23 i 22q11.2. L'anàlisi detallada de les dades suggereix que existeixen diferents causes que expliquen aquests increments (Figura 6.3):

1. NAHR esporàdica: individus que no mostren increments d'anomalies en espermatozoides per cap regió però que tenen un fill afectat per la SPW causada per delecio (6/16 casos, 38%).
2. Haplotips de predisposició: individus que presenten increments d'anomalies en espermatozoides només per la regió 15q11-q13 (4/16 casos, 25%).
3. Increment de la susceptibilitat a la NAHR: individus on es van observar increments significatius d'anomalies en espermatozoides per la regió 15q11-q13 i per alguna o les dues regions amb característiques similars (6/16 casos; 38%).

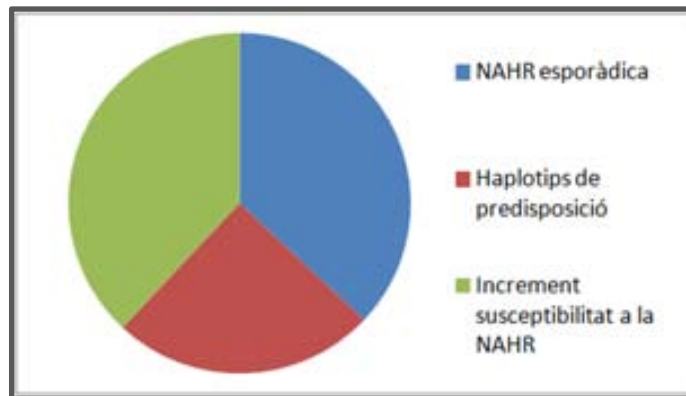


FIGURA 6.3: Freqüències dels diferents tipus d'individus en relació a les causes que poden generar increments d'anomalies cromosòmiques mitjançant NAHR.

Els resultats obtinguts en els individus amb descendència afectada per la SWB i la SDG que presentaven un increment en la susceptibilitat a la NAHR van mostrar que un dels cinc individus (WS-12) només presentava increments de la regió 7q11.23, suggerint la presència d'un haplotip de risc en aquesta regió. Per altra banda, quatre dels cinc individus mostraven increments d'anomalies per altres regions (WS-1, WS-11, DG-2 i DG-6), suggerint que aquests individus presentaven un increment generalitzat de fenòmens de NAHR, possiblement relacionat amb alteracions en els mecanismes cel·lulars que eviten la seva acció.

6.3. EFECTE DE L'EDAT EN LES FREQUÈNCIES DE NAHR EN ESPERMATOZOIDES

No hi ha dades concloents a la literatura en relació a l'efecte de l'edat paterna i la freqüència d'anomalies cromosòmiques. Mentre que alguns autors descriuen un increment d'anomalies cromosòmiques numèriques (Asada et al. 2000; Bosch et al. 2003) o estructurals (Bosch et al. 2003; Slotter et al. 2007) a mesura que s'incrementa l'edat dels pares, altres autors afirmen que l'edat té un efecte negligible (Kurahashi i Emanuel 2001; Plastira et al. 2007). En general, les dades suggereixen que podrien existir anomalies cromosòmiques dependents i altres independents de l'edat.

En relació al fenomen de la NAHR que condueix a la formació de delecions, duplicacions i inversions, els nostres resultats mostren que en les tres regions analitzades no hi ha una correlació positiva significativa entre les freqüències d'aquestes reorganitzacions cromosòmiques i l'edat.

6.4. MECANISMES DE NAHR IMPLICATS EN LA FORMACIÓ D'ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN ESPERMATOZOIDES

Existeixen diferents dades a la literatura respecte els mecanismes que originen anomalies cromosòmiques derivades de la NAHR en espermatozoides. Alguns autors han inferit el mecanisme mitjançant la comparació de les freqüències de delecions i duplicacions observades en espermatozoides: les freqüències equivalents de delecions i duplicacions indiquen un predomini de la NAHR intercromàtide, mentre que un increment en la freqüència de delecions indicaria la participació de la NAHR intracromàtide (Figura 6.4).

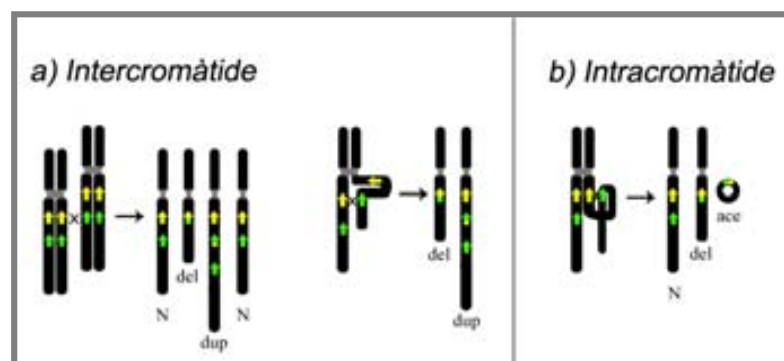


FIGURA 6.4: Mecanismes de NAHR que generen delecions i duplicacions.

En l'estudi de Lam i Jeffreys (2007) es van comparar les freqüències d'aquestes dues anomalies en dos individus. Mentre en un d'ells van observar freqüències equivalents de delecions i duplicacions (suggerint la NAHR intercromàtide), l'altre individu mostrava una freqüència de duplicacions superior. En aquest sentit, els autors varen suggerir que l'increment en la freqüència de duplicacions podria estar relacionat amb una NAHR premeiòtica, que generaria un mosaïcisme a la línia germinal causant l'increment de la freqüència de duplicacions (Lam i Jeffreys, 2007). Per altra banda, Turner i col·laboradors van analitzar les freqüències de delecions i duplicacions en espermatozoides mitjançant QF-PCR (PCR quantitativa) en quatre regions, en totes elles van observar freqüències de delecions més elevades que les freqüències de duplicacions (Turner et al., 2008). Aquests autors varen concloure que la NAHR intracromàtide és el mecanisme predominant en les quatre regions estudiades.

La comparació entre les freqüències de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 15q11-q13 en la població control no va mostrar diferències significatives a nivell poblacional ni a nivell individual, suggerint que la NAHR intercromàtide és el mecanisme majoritari de formació d'aquestes anomalies. A la regió 22q11.2 es va observar un increment en la freqüència de delecions a nivell poblacional. Malgrat això, les comparacions individuals no van mostrar increments significatius de delecions en cap dels 10 individus, indicant que la NAHR intercromàtide seria, també en aquesta regió, el principal mecanisme implicat en la generació de delecions i duplicacions. Les diferències observades entre el nostre estudi i els resultats obtinguts per Turner i col. (2008) podrien ser degudes al disseny experimental utilitzat. Com s'ha esmentat anteriorment (apartat 1.7.2), aquests autors van mesurar les freqüències de NAHR en *hot spots* específics dintre dels LCRs, mentre que en el nostre estudi i en el de Lam i Jeffreys (2007) es mesuren les freqüències d'anomalies de les regions crítiques, fent possible l'anàlisi de fenòmens de NAHR que es puguin produir en qualsevol *hot spot* dins dels LCR que flanquegen aquestes regions.

Tot i això, els resultats obtinguts a partir de l'estudi de les freqüències d'inversions de la regió 15q11-q13 mostren freqüències d'inversions molt més elevades que les freqüències de delecions i duplicacions. Aquests resultats indiquen que globalment, la NAHR intracromàtide és el mecanisme majoritari i a la vegada, que els segments que conformen els LCRs que flanquegen la regió 15q11-q13 es troben orientats majoritàriament de forma indirecta. Així doncs, existiria una freqüència basal de NAHR intercromàtide que genera delecions i duplicacions complementàries i un nivell més elevat de NAHR intracromàtide que generaria inversions amb una incidència molt superior degut a l'arquitectura genòmica que conforma els LCRs.

Per altra banda, en individus de risc – pares que mostren increments d'anomalies espermàtiques respecte la sèrie control, van mostrar increments significatius en les freqüències de delecions comparades amb les duplicacions. Aquests resultats suggereixen un increment en la participació de la NAHR intracromàtide. A més, en alguns individus també es van observar increments significatius d'inversions. És important destacar, que aquests increments d'inversions només es van observar en aquells individus que de forma individual presentaven increments significatius de delecions. Tenint en compte que les anomalies cromosòmiques que mostren increments significatius en espermatozoides són delecions i inversions, els nostres resultats indiquen que els individus de risc presenten algun tipus d'alteració en el mecanisme de NAHR intracromàtide. És ben sabut que durant l'espermogènesi es produeixen DSBs programats per facilitar la remodelació de la cromatina en espermàtides elongades (Leduc et al. 2008). Alguns autors han descrit la presència de proteïnes implicades en la maquinària de reparació per HR durant l'estadi

de l'espermioogènesi (Srivastava i Raman 2007). En aquest sentit, una possibilitat és que les anomalies produïdes per NAHR intracromàtide es produeixin durant el procés de l'espermioogènesi, on només hi ha una sola cromàtide disponible per reparar el DSBs.

6.5. APLICACIÓ DE LA METODOLOGIA DE FIBER-FISH PER L'ANÀLISI DE L'ARQUITECTURA GENÒMICA DE LCRs

Els resultats obtinguts en les anàlisis de *Fiber-FISH* posen de manifest la fiabilitat d'aquesta metodologia per estudiar LCRs complexes. Aquesta tècnica permet fer valoracions fiables de variacions del número de còpies i estructurals equilibrades quan s'utilitza un disseny consistent en: 1) la selecció de fòsmids o altres clons de mida similar que cobreixin els gens i pseudogens que formen el LCR, 2) la selecció de marcadors cromosòmics que permetin identificar de forma específica el LCR i 3) el desenvolupament i aplicació de criteris de valoració estrictes per valorar i analitzar els senyals de FISH. A més, com en altres tècniques de FISH, la visualització directa de les seqüències que es volen estudiar permet realitzar quantificacions de les diferents variacions estructurals observades i dels haplotips observats. En aquest sentit, haplotips en heterozigosi o mosaïcismes poden ser identificats més fàcilment mitjançant *Fiber-FISH* que amb altres tècniques utilitzades per l'anàlisi de la variabilitat estructural del genoma (Aten et al. 2008). La principal limitació d'aquesta tècnica, com per altres tècniques de FISH, és que aquesta és una tècnica dirigida, és a dir que només permet obtenir informació de la regió cromosòmica que reconeixen les sondes utilitzades.

Pel que fa a l'arquitectura genòmica del LCR22-2, els resultats obtinguts van mostrar una elevada variabilitat estructural. Es varen detectar tant variacions interindividuals com intraindividuals. És important destacar que es va identificar una organització diferent dels gens i pseudogens de la que es troba descrita en la base de dades del genoma humà actual (GRCh37/hg19). Aquestes diferències consisteixen principalment en diferents números de còpia i diferent posició relativa dels gens i pseudogens que formen aquest LCR: cinc còpies del gen *USP18*, cinc còpies del pseudogen de *GGT AC008132* i dos o tres còpies del pseudogen *GGT3P*. A més, també es va observar una inversió que prèviament no estava descrita que implica gairebé la totalitat del LCR22-2, variant la posició relativa dels gens *PRODH* i *DGCR6* respecte al control de còpia única més centromèric RP11-66F9. En aquest sentit, els nostres resultats indiquen que la tècnica de *Fiber-FISH* permet estudiar amb una elevada fiabilitat regions complexes com els LCR.

La presència de variacions estructurals en els LCR que flanquegen regions crítiques s'ha relacionat amb un increment de la susceptibilitat a la NAHR en alguns individus (Antonacci et al. 2010; Cusco et al. 2008). La optimització d'aquesta metodologia permetrà l'anàlisi de l'arquitectura genòmica dels LCR que flanquegen les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 i permetrà en establir una relació directa entre haplotips de predisposició i increments en les freqüències d'anomalies cromosòmiques produïdes per NAHR en espermatozoides.

6.6. CONSEQÜÈNCIES CLÍNiques I CONSELL GENÈTIC

Una característica comuna dels individus que van mostrar increments d'anomalies en espermatozoides és la seva qualitat de moderats. El rang de percentatges incrementats es va situar entre el 0.64 % i el 2.76 % amb una mitjana de 1.02 %. S'han descrit situacions similars a la literatura, és a dir increments moderats d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides de pares amb descendència afectada per diferents síndromes: disomies del cromosoma 21 en pares amb descendència afectada per la síndrome de Down (Blanco et al. 1998) o disomies dels cromosomes sexuals en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la síndrome de Turner (Martínez-Pasarell et al. 1999) i la síndrome de Klinefelter (Arnedo et al. 2006).

Els resultats obtinguts en el nostre estudi mostren que en un percentatge significatiu de famílies hi ha una relació entre la presència d'un trastorn genòmic en la descendència i un increment d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides. En aquest sentit, els increments d'anomalies cromosòmiques observats en espermatozoides poden tenir repercussions clíniques i aquests individus s'han de considerar com individus de risc.

Considerem que els estudis de FISH en espermatozoides qualifiquen si un individu té un risc incrementat de transmetre algun trastorn genòmic a la descendència i que aquests s'haurien d'incorporar com a eina per oferir un consell genètic reproductiu més acurat en aquests individus.

7. CONCLUSIONS

CONCLUSIÓ GENERAL

Alguns pares d'individus afectes per trastorns genòmics mostren un increment en la freqüència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides. Com a conseqüència, aquests individus s'han de considerar individus de risc per presentar una predisposició a transmetre trastorns genòmics a la descendència.

Primera

La freqüència de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 en espermatozoides d'individus control és equivalent. La mida i la distància dels LCRs, així com l'edat dels individus, no afecten les freqüències de NAHR de les regions analitzades.

Segona

Les delecions i duplicacions de les regions 7q11.23, 15q11-q13 i 22q11.2 en espermatozoides d'individus control s'originen per NAHR intercromàtide.

Les inversions de la regió 15q11-q13 es generen amb un ordre de magnitud superior a la suma de delecions i duplicacions. Aquests resultats indiquen que la NAHR intracromàtide és el mecanisme majoritari en la generació d'anomalies, i que els LCRs que flanquegen la regió 15q11-q13 presenten majoritàriament blocs d'homologia amb orientació indirecta.

Tercera

La incidència d'inversions de la regió 15q11q13 observades en espermatozoides ens ha permès inferir en un 22% la freqüència de portadors heterozigots d'aquestes inversions en la població general. Tenint en compte que aquesta inversió s'ha definit com un haplotip de predisposició a la NAHR, un percentatge significatiu de la població presenta un risc incrementat de transmetre delecions a la descendència.

Quarta

S'han observat increments significatius d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus amb descendència afecta per trastorns genòmics:

- En la població de pares amb descendència afecta per la SPW, 4 dels 16 individus van mostrar increments de delecions i inversions, mentre que 6 dels individus presentaven increments de delecions. Els increments d'anomalies en espermatozoides són

independents de l'origen genètic de la SPW en la descendència. Aquests increments són un reflex de la inestabilitat que presenta la regió 15q11-q13 que la predisposa a diferents tipus de reorganitzacions cromosòmiques.

- En la població de pares amb descendència afectada per la SWB, 3 dels 15 individus mostraven increments significatius de delecions, mentre que en la població de pares amb descendència afectada per la SDG es van observar increments en 2 dels 10 individus analitzats.

Aquests individus s'han de considerar de risc, en el sentit que presenten un risc incrementat de transmetre una anomalia cromosòmica a la descendència.

Cinquena

Els increments significatius de delecions i inversions en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per trastorns genòmics indiquen un increment de la freqüència del fenomen de NAHR intracromàtide.

Sisena

Els increments d'anomalies cromosòmiques observats en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per trastorns genòmics poden tenir el seu origen en fenòmens esporàdics de NAHR, presència d'haplotips de predisposició o en un increment generalitzat de la susceptibilitat a la NAHR.

Setena

La tècnica de *Fiber-FISH* permet mapar LCR complexos i avaluar la presència de diferents haplotips.

Vuitena

Els estudis de FISH en espermatozoides, dirigits a determinar la incidència de delecions i duplicacions, aporten una informació valuosa en el consell genètic reproductiu en pares amb descendència afectada per trastorns genòmics. Un resultat de FISH en espermatozoides alterat, independentment del valor numèric, s'interpretarà com l'evidència d'anomalies en el procés de recombinació i és indicatiu d'un factor de risc.

8. BIBLIOGRAFIA

A

- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhargal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT (2006) Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 439: 851-5
- Alkalay AA, Guo T, Montagna C, Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B, Morrow B (2011) Genetic dosage compensation in a family with velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 155A: 548-54
- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65: 370-86
- Anton E, Vidal F, Blanco J (2007) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22: 2088-92
- Antonacci F, Kidd JM, Marques-Bonet T, Teague B, Ventura M, Girirajan S, Alkan C, Campbell CD, Vives L, Malig M, Rosenfeld JA, Ballif BC, Shaffer LG, Graves TA, Wilson RK, Schwartz DC, Eichler EE (2010) A large and complex structural polymorphism at 16p12.1 underlies microdeletion disease risk. *Nat Genet* 42: 745-50
- Antonacci F, Kidd JM, Marques-Bonet T, Ventura M, Siswara P, Jiang Z, Eichler EE (2009) Characterization of six human disease-associated inversion polymorphisms. *Hum Mol Genet* 18: 2555-66
- Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA (2005) Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res* 15: 1179-88
- Arnedo N, Templado C, Sanchez-Blanque Y, Rajmil O, Nogues C (2006) Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y. *Hum Reprod* 21: 524-8
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17: 51-9

Aten E, White SJ, Kalf ME, Vossen RH, Thygesen HH, Ruivenkamp CA, Kriek M, Breuning MH, den Dunnen JT (2008) Methods to detect CNVs in the human genome. *Cytogenet Genome Res* 123: 313-21

B

Babcock M, Pavlicek A, Spiteri E, Kashork CD, Ioshikhes I, Shaffer LG, Jurka J, Morrow BE (2003) Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution. *Genome Res* 13: 2519-32

Babcock M, Yatsenko S, Hopkins J, Brenton M, Cao Q, de Jong P, Stankiewicz P, Lupski JR, Sikela JM, Morrow BE (2007) Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 16: 2560-71

Bacolla A, Larson JE, Collins JR, Li J, Milosavljevic A, Stenson PD, Cooper DN, Wells RD (2008) Abundance and length of simple repeats in vertebrate genomes are determined by their structural properties. *Genome Res* 18: 1545-53

Bailey JA, Eichler EE (2006) Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet* 7: 552-64

Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297: 1003-7

Barbouti A, Stankiewicz P, Nusbaum C, Cuomo C, Cook A, Hoglund M, Johansson B, Hagemeyer A, Park SS, Mitelman F, Lupski JR, Fioretos T (2004) The breakpoint region of the most common isochromosome, i(17q), in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large, palindromic, low-copy repeats. *Am J Hum Genet* 74: 1-10

Battaglia A (2005) The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev* 27: 365-9

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: 887-94

Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA (2003) Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73: 131-51

Beunders G, van de Kamp JM, Veenhoven RH, van Hagen JM, Nieuwint AW, Sistermans EA (2010) A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental

- retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms. *J Med Genet* 47: 271-5
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11: 722-6
- Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63: 1067-72
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C (2003) Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11: 754-9
- Bosch N, Morell M, Ponsa I, Mercader JM, Armengol L, Estivill X (2009) Nucleotide, cytogenetic and expression impact of the human chromosome 8p23.1 inversion polymorphism. *PLoS One* 4: e8269
- Bruder CE, Piotrowski A, Gijbbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Stahl T, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP (2008) Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 82: 763-71
- Buchanan JA, Scherer SW (2008) Contemplating effects of genomic structural variation. *Genet Med* 10: 639-47
- Butler MG, Fischer W, Kibiryeveva N, Bittel DC (2008) Array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 146: 854-60

C

- Calounova G, Hedvicakova P, Silhanova E, Kreckova G, Sedlacek Z (2008) Molecular and clinical characterization of two patients with Prader-Willi syndrome and atypical deletions of proximal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 146A: 1955-62
- Carvalho CM, Lupski JR (2008) Copy number variation at the breakpoint region of isochromosome 17q. *Genome Res* 18: 1724-32
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA (2000) Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* 97: 136-46

- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L (2005) Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 21: 673-82
- Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA (2008) Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res* 18: 683-94
- Chen M, Hwu WL, Kuo SJ, Chen CP, Yin PL, Chang SP, Lee DJ, Chen TH, Wang BT, Lin CC (2006) Subtelomeric rearrangements and 22q11.2 deletion syndrome in anomalous growth-restricted fetuses with normal or balanced G-banded karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* 28: 939-43

D

- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA (2005) Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 77: 606-16
- Demczuk S, Levy A, Aubry M, Croquette MF, Philip N, Prieur M, Sauer U, Bouvagnet P, Rouleau GA, Thomas G, et al. (1995) Excess of deletions of maternal origin in the DiGeorge/velo-cardio-facial syndromes. A study of 22 new patients and review of the literature. *Hum Genet* 96: 9-13
- Dennis NR, Veltman MW, Thompson R, Craig E, Bolton PF, Thomas NS (2006) Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11-q13. *Am J Med Genet A* 140: 434-41
- Depienne C, Heron D, Betancur C, Benyahia B, Trouillard O, Bouteiller D, Verloes A, LeGuern E, Leboyer M, Brice A (2007) Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication. *J Med Genet* 44: 452-8
- Doornbos M, Sikkema-Raddatz B, Ruijvenkamp CA, Dijkhuizen T, Bijlsma EK, Gijsbers AC, Hilhorst-Hofstee Y, Hordijk R, Verbruggen KT, Kerstjens-Frederikse WS, van Essen T, Kok K, van Silfhout AT, Breuning M, van Ravenswaaij-Arts CM (2009) Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *Eur J Med Genet* 52: 108-15
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3: 585-98

Duba HC, Doll A, Neyer M, Erdel M, Mann C, Hammerer I, Utermann G, Grzeschik KH (2002) The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet* 10: 351-61

E

Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3: 441-52

Eichler EE, Nickerson DA, Altshuler D, Bowcock AM, Brooks LD, Carter NP, Church DM, Felsenfeld A, Guyer M, Lee C, Lupski JR, Mullikin JC, Pritchard JK, Sebat J, Sherry ST, Smith D, Valle D, Waterston RH (2007) Completing the map of human genetic variation. *Nature* 447: 161-5

Emanuel BS, Shaikh TH (2001) Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2: 791-800

Enkmandakh B, Bitchevaia N, Ruddle F, Bayarsaihan D (2004) The early embryonic expression of TFII-I during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 4: 25-8

Enkmandakh B, Makeyev AV, Erdenechimeg L, Ruddle FH, Chimgé NO, Tussie-Luna MI, Roy AL, Bayarsaihan D (2009) Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 181-6

Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73: 1027-40

Erdel M, Hubalek M, Lingenhel A, Kofler K, Duba HC, Utermann G (1999) Counting the repetitive kringle-IV repeats in the gene encoding human apolipoprotein(a) by fibre-FISH. *Nat Genet* 21: 357-8

F

Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF (2006) A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79: 439-48

- Fernandez-Novoa MC, Vargas MT, Vizmanos JL, Garnacho C, Martinez JJ, Sanz P, Lluch D (2001) [Prader-Willi syndrome large deletion on two brothers. Is this the exception that confirm the rule?]. *Rev Neurol* 32: 935-8
- Feuk L (2010) Inversion variants in the human genome: role in disease and genome architecture. *Genome Med* 2: 11
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7: 85-97
- Fidlerova H, Senger G, Kost M, Sanseau P, Sheer D (1994) Two simple procedures for releasing chromatin from routinely fixed cells for fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 65: 203-5
- Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Dominguez-Vidana R, Zepeda C, Yanez O, Gutierrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC, Blanco D, Medina-Ruiz S, Meza K, Ayala E, Garcia D, Bustos P, Gonzalez V, Girard L, Tusie-Luna T, Davila G, Palacios R (2007) Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6099-106
- Frohnauer J, Caliebe A, Gesk S, Partsch CJ, Siebert R, Pankau R, Jenderny J (2010) No significantly increased frequency of the inversion polymorphism at the WBS-critical region 7q11.23 in German parents of patients with Williams-Beuren syndrome as compared to a population control. *Mol Cytogenet* 3: 21

G

- Gardner R, Sutherland G (2004) Chromosomal abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press.
- Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X, Zuffardi O (2003) Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 12: 849-58
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell R J, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307: 1434-40
- Gregory CA, Schwartz J, Kirkilionis AJ, Rudd N, Hamerton JL (1991) Somatic recombination rather than uniparental disomy suggested as another mechanism by which genetic

imprinting may play a role in the etiology of Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 88: 42-8

Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1: 4

H

Hatchwell E, Long F, Wilde J, Crolla J, Temple K (1998) Molecular confirmation of germ line mosaicism for a submicroscopic deletion of chromosome 22q11. *Am J Med Genet* 78: 103-6

Heiskanen M, Kallioniemi O, Palotie A (1996) Fiber-FISH: experiences and a refined protocol. *Genet Anal* 12: 179-84

Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6: 923-35

Heng HH, Tsui LC (1998) High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent in situ hybridization. *J Chromatogr A* 806: 219-29

Hill AS, Foot NJ, Chaplin TL, Young BD (2000) The most frequent constitutional translocation in humans, the t(11;22)(q23;q11) is due to a highly specific alu-mediated recombination. *Hum Mol Genet* 9: 1525-32

Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, Pani AM, Kistler DJ, Rios CM, Kimberley KW, Gregg RG, Bray-Ward P (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: 220-8

I

Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36: 949-51

Inkster B, Rao AW, Ridler K, Filippini N, Witcher B, Nichols TE, Wetten S, Gibson RA, Borrie M, Kertesz A, Guzman DA, Loy-English I, Williams J, Saemann PG, Auer DP, Holsboer F, Tozzi F, Muglia P, Merlo-Pich E, Matthews PM (2010) Genetic variation in GOLM1 and prefrontal cortical volume in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*

Inoue K, Lupski JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 199-242

I

- Jefferson A, Volpi EV (2010) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for genomic investigations in rat. *Methods Mol Biol* 659: 409-26
- Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD (2000) Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res* 10: 319-29

K

- Kara-Mostefa A, Raoul O, Lyonnet S, Amiel J, Munnich A, Vekemans M, Magnier S, Ossareh B, Bonnefont JP (1999) Recurrent Williams-Beuren syndrome in a sibship suggestive of maternal germ-line mosaicism. *Am J Hum Genet* 64: 1475-8
- Kokkonen H, Leisti J (2000) An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germ-line mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family. *Hum Genet* 107: 83-5
- Kotzot D (2008) Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* 45: 545-56
- Kurahashi H, Emanuel BS (2001) Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet* 29: 139-40

L

- Lam KW, Jeffreys AJ (2006) Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8921-7
- Lam KW, Jeffreys AJ (2007) Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10950-5
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42: 121-8
- Leana-Cox J, Pangkanon S, Eanet KR, Curtin MS, Wulfsberg EA (1996) Familial DiGeorge/velocardiofacial syndrome with deletions of chromosome area 22q11.2: report of five families with a review of the literature. *Am J Med Genet* 65: 309-16
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 78: 324-32
- Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P, Scherer G (2007) Two novel translocation breakpoints

- upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia. *Clin Genet* 71: 67-75
- Lichtenbelt KD, Hochstenbach R, van Dam WM, Eleveld MJ, Poot M, Beemer FA (2005) Supernumerary ring chromosome 7 mosaicism: case report, investigation of the gene content, and delineation of the phenotype. *Am J Med Genet A* 132A: 93-100
- Liu P, Lacaria M, Zhang F, Withers M, Hastings PJ, Lupski JR (2011) Frequency of Nonallelic Homologous Recombination Is Correlated with Length of Homology: Evidence that Ectopic Synapsis Precedes Ectopic Crossing-Over. *Am J Hum Genet* 89: 580-8
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14: 417-22
- Lupski JR (2004) Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome Biol* 5: 242

M

- Makoff AJ, Flomen RH (2008) Detailed analysis of 15q11-q14 sequence corrects errors and gaps in the public access sequence to fully reveal large segmental duplications at breakpoints for Prader-Willi, Angelman, and inv dup(15) syndromes. *Genome Biol* 8: R114
- Martin R (2005) *Cytogenetics of human germ cells*. Basel: S. Karger AG.
- Martin RH (2008) Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 14: 379-90
- Martinez-Pasarell O, Nogues C, Bosch M, Egozcue J, Templado C (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104: 345-9
- McDermid HE, Morrow BE (2002) Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet* 70: 1077-88
- Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C (2010) Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet* 128: 3-26
- Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, Garcia-Linares C, Cooper DN, Lázaro C, Kehrer-Sawatzki H (2011) Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat* 32: 213-9
- Michalet X, Ekong R, Fougèrouse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277: 1518-23
- Molina O, Anton E, Vidal F, Blanco J (2010a) Sperm rates of 7q11.23, 15q11q13 and 22q11.2 deletions and duplications: a FISH approach. *Hum Genet* 129: 35-44

Molina O, Blanco J, Vidal F (2010b) Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers. *Mol Hum Reprod* 16: 320-8

Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G (2008) A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet* 40: 1124-9

N

Nazarenko S, Sazhenova E, Baumer A, Schinzel A (2004) Segmental maternal heterodisomy of the proximal part of chromosome 15 in an infant with Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 12: 411-4

O

Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC, Scherer SW (2001) A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet* 29: 321-5

P

Parra I, Windle B (1993) High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat Genet* 5: 17-21

Patel ZM, Gawde HM, Khatkhatay MI (2006) 22q11 microdeletion studies in the heart tissue of an abortus involving a familial form of congenital heart disease. *J Clin Lab Anal* 20: 160-3

Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C, Stone AC (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 39: 1256-60

Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T, Murphy C, Fitzgerald T, Lee AS, Hyland C, Stone AC, Hurles ME, Tyler-Smith C, Eichler EE, Carter NP, Lee C, Redon R (2008) Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. *Genome Res* 18: 1698-710

Plastira K, Angelopoulou R, Mantas D, Msaouel P, Lyrakou S, Plastiras A, Bolaris S, Baka S, Papanisteidis N (2007) The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *Int J Androl* 30: 65-72

- Portera G, Venturin M, Patrizi A, Martinoli E, Riva P, Dalpra L (2006) Characterisation of a non-recurrent familial translocation t(7;9)(q11.23;p24.3) points to a recurrent involvement of the Williams-Beuren syndrome region in chromosomal rearrangements. *J Hum Genet* 51: 68-75
- Portnoi MF (2009) Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* 52: 88-93
- Protopopov A, Kashuba V, Zabarovska VI, Muravenko OV, Lerman MI, Klein G, Zabarovsky ER (2003) An integrated physical and gene map of the 3.5-Mb chromosome 3p21.3 (AP20) region implicated in major human epithelial malignancies. *Cancer Res* 63: 404-12

R

- Raap AK, Florijn RJ, Blonden LAJ, Wiegant J, Vaandrager JW, Vrolijk H, den Dunnen J, Tanke HJ, van Ommen GJ (1996) Fiber FISH as a DNA Mapping Tool. *Methods* 9: 67-73
- Rao PN, Li W, Vissers LE, Veltman JA, Ophoff RA (2010) Recurrent inversion events at 17q21.31 microdeletion locus are linked to the MAPT H2 haplotype. *Cytogenet Genome Res* 129: 275-9
- Repetto GM, White LM, Bader PJ, Johnson D, Knoll JH (1998) Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* 79: 82-9
- Roberts SE, Dennis NR, Browne CE, Willatt L, Woods G, Cross I, Jacobs PA, Thomas S (2002) Characterisation of interstitial duplications and triplications of chromosome 15q11-q13. *Hum Genet* 110: 227-34
- Roehl AC, Vogt J, Mussotter T, Zickler AN, Spoti H, Hogel J, Chuzhanova NA, Wimmer K, Kluwe L, Mautner VF, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H (2010) Intrachromosomal mitotic nonallelic homologous recombination is the major molecular mechanism underlying type-2 NF1 deletions. *Hum Mutat* 31: 1163-73
- Rothlisberger B, Kotzot D (2007) Recurrence risk in de novo structural chromosomal rearrangements. *Am J Med Genet A* 143A: 1708-14

S

- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Chakraborty PK, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS (2004) Aberrant

- interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet* 13: 417-28
- Salavoura K, Kolialexi A, Sofocleous C, Kalaitzidaki M, Pampanos A, Kitsiou S, Mavrou A (2008) Complex rearrangements of chromosome 15 in two patients with mild/atypical Prader Willi syndrome. *Genet Couns* 19: 219-24
- Sallinen R, Vihola A, Bachinski LL, Huoponen K, Haapasalo H, Hackman P, Zhang S, Sirito M, Kalimo H, Meola G, Horelli-Kuitunen N, Wessman M, Krahe R, Udd B (2004) New methods for molecular diagnosis and demonstration of the (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2). *Neuromuscul Disord* 14: 274-83
- Sandrin-Garcia P, Macedo C, Martelli LR, Ramos ES, Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, Passos GA (2002) Recurrent 22q11.2 deletion in a sibship suggestive of parental germline mosaicism in velocardiofacial syndrome. *Clin Genet* 61: 380-3
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J (2009) Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 93: 1892-902
- Sasaki M, Lange J, Keeney S (2010) Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 182-95
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lese Martin C (2004) Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* 74: 1168-74
- Scherer SW, Gripp KW, Lucena J, Nicholson L, Bonnefont JP, Perez-Jurado LA, Osborne LR (2005) Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Hum Genet* 117: 383-8
- Schubert C (2009) The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66: 1178-97
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimaki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316: 445-9
- Sha BY, Yang TL, Zhao LJ, Chen XD, Guo Y, Chen Y, Pan F, Zhang ZX, Dong SS, Xu XH, Deng HW (2009) Genome-wide association study suggested copy number variation may be associated with body mass index in the Chinese population. *J Hum Genet* 54: 199-202
- Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE (2006a) Structural variation of the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 407-42

- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Seagraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE (2006b) Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 38: 1038-42
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 40: 322-8
- Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV, Eis PS, Brunner HG, Hennekam RC, Knight SJ, de Vries BB, Zuffardi O, Eichler EE (2007) Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet* 16: 567-72
- She X, Jiang Z, Clark RA, Liu G, Cheng Z, Tuzun E, Church DM, Sutton G, Halpern AL, Eichler EE (2004) Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. *Nature* 431: 927-30
- Sloter ED, Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, Nath J, Cabrerros D, Wyrobek AJ (2007) Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril* 87: 1077-86
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR (2005) Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med* 353: 1694-701
- Srivastava N, Raman MJ (2007) Homologous recombination-mediated double-strand break repair in mouse testicular extracts and comparison with different germ cell stages. *Cell Biochem Funct* 25: 75-86
- Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K (2005) A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet* 37: 129-37

Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N (2003) Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 82: 238-44

T

Tam E, Young EJ, Morris CA, Marshall CR, Loo W, Scherer SW, Mervis CB, Osborne LR (2008) The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *Am J Med Genet A* 146A: 1797-806

Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, Leventer RJ, Pope K, Forbes R, Crolla JA, Ganesamoorthy D, Burgess T, Bruno DL, Slater HR, Farlie PG, Amor DJ (2011) Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet A* 155A: 1623-33

Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, Jacobs P (2006) Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119: 444-50

Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D (1990) Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* 250: 559-62

Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet*

U

Ungaro P, Christian SL, Fantes JA, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH (2001) Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* 38: 26-34

Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A, Donis-Keller H, Boyd CD (1996) 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* 59: 958-62

Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22: 5612-21

V

- van den Engh G, Sachs R, Trask BJ (1992) Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. *Science* 257: 1410-2
- Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, Destree A, Maystadt I, Mannik K, Kurg A, Reimand T, McMullan D, Oley C, Brueton L, Bongers EM, van Bon BW, Pfund R, Jacquemont S, Ferrarini A, Martinet D, Schrandt-Stumpel C, Stegmann AP, Frints SG, de Vries BB, Ceulemans B, Kooy RF (2009) Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet* 52: 94-100
- Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N (2005) 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* 76: 52-67
- Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY (2010) Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet* 3: 1

Z

- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR (2009) Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 451-81
- Zhang L, Lu HH, Chung WY, Yang J, Li WH (2005) Patterns of segmental duplication in the human genome. *Mol Biol Evol* 22: 135-41

Annex: RESULTATS ANÀLISIS DE MICROSATÈL·LITS

I.1. POBLACIÓ SWB

CASOS		D7S2437	D7S485	D7S691	D7S516	D7S634	D7S613	D71870
WS-2	P	243/245	243/245	143/135	257/257	139/139	111/115	113/121
	M	243/249	243/249	126/135	253/262	137/138	114/106	113/117
	F	243/245	243/245	135/143	257/262	138/139	106	117
WS-3	P	243/243	243/243	137/137	256/262	135/139	106/110	121/121
	M	245/247	247/245	137/140	255/255	135/148	110/110	119/123
	F	243/247	243/247	137/140	255/256	135/135	106	121
WS-4	P	243/244	243/243	128/136	251/256	138/131	111/111	113/123
	M	245/249	245/249	138/141	255/256	135/137	115/115	113/119
	F	243/249	243/249	136/141	251/256	131/137	111	113
WS-5	P	244/250	243/249	134/140	250/255	130/138	110/110	119/119
	M	244/244	243/243	134/137	251/251	135/138	110/110	119/123
	F	244/244	243/243	134/140	250/251	135/138	110	119
WS-8	P	229/233	250/250	137/140	253/253	140/140	171/173	114/120
	M	202/227	244/250	140/140	253/253	135/135	172/173	114/120
	F	227/233	250/250	137/140	253/253	140/135	173	120
WS-9	P	227/229	244/248	136/140	251/257	141/141	109/109	111/124
	M	202/231	244/246	135/140	257/262	120/137	101/109	118/118
	F	229/231	244/248	135/140	257/262	137/141	109	111
WS-11	P	225/229	242/244	137/143	251/262	129/139	101/109	120/120
	M	202/225	246/250	135/143	251/258	139/139	113/113	111/120
	F	225/225	244/246	143/143	258/262	129/139	101	120
WS-13	P	231/233	248/248	136/140	250/250	131/139	109/110	104/115
	M	223/231	244/250	124/136	253/256	139/139	109/109	121/121
	F	223/233	248/250	124/140	250/253	131/139	109	121

TAULA I.1: Resultats anàlisi de microsatèl·lits de les famílies amb descendència afectada per la SWB (P: pare, M: mare, F: fill afecte).

CASOS		D7S2518	D7S3196	ORIGEN PARENTAL
WS-2	P			PATERN
	M			
	F			
WS-3	P			MATERN
	M			
	F			
WS-4	P			MATERN
	M			
	F			
WS-5	P	135/145		PATERN
	M	134/147		
	F	134		
WS-8	P	135/143	208/219	PATERN
	M	134/147	207/219	
	F	134	219	
WS-9	P			MATERN
	M			
	F			
WS-11	P	135/140	208/208	MATERN
	M	137/137	208/208	
	F	140	208	
WS-13	P			PATERN
	M			
	F			

TAULA I.2: Resultats anàlisi de microsatèl·lits addicionals de les famílies amb descendència afectada per la SWB i determinació de l'origen parental de la deleció (P: pare, M: mare, F: fill afecte).

I.2. POBLACIÓ SWB

CASOS		D22S1638	D22S1648	D22S264	D22S311	D22S303	ORIGEN PARENTAL
DG-1	P	114/116	174/174	185/195	251/251	220/222	PATERN
	M	116/116	174/174	195/195	250/256	222/223	
	F	116	174	195	256	220/223	
DG-2	P	116/116	170/172	195/203	250/250	212/222	PATERN
	M	116/116	172/172	201/201	250/257	212/222	
	F	116	172	201	257	222/222	
DG-3	P	99/105	174/178	193/199	256/256	220/223	PATERN
	M	116/116	174/174	193/199	256/259	222/224	
	F	116	174	193	259	220/224	
DG-5	P	116/105	174/174	195/195	250/256	212/222	MATERN
	M	109/105	174/174	195/195	250/256	223/223	
	F	116	174	195	256	212/223	
DG-7	P	105/116	174/174	187/191	250/250	222/222	MATERN
	M	109/109	173/178	185/193	250/254	222/222	
	F	116	174	191	250	222/222	
DG-8	P	109/120	174/174	185/199	250/250	222/224	PATERN
	M	116/114	174/174	199/205	254/257	212/224	
	F	116	174	199	254	212/224	
DG-10	P	114/114	174/174	187/199	252/256	213/223	PATERN
	M	109/116	174/174	199/201	250/256	223/225	
	F	116	174	199	256	223/223	
DG-11	P	116/116	174/174	199/201	250/256	212/222	MATERN
	M	111/122	170/171	187/191	250/254	222/222	
	F	116	174	201	256	212/222	

TAULA I.3: Resultats anàlisi de microsatèl·lits addicionals de les famílies amb descendència afectada per la SDG i determinació de l'origen parental de la deleció (P: pare, M: mare, F: fill afecte).

AGRAÏMENTS

Després de cinc anys i mig de feineda puc dir que AIXÒ JA ESTÀ. Però abans d'acabar del tot, vull donar les gràcies a molta gent que d'alguna manera o una altra han estat implicats en la realització d'aquesta tesi.

Primer de tot, vull agrair al Joan Blanco i a la Fanny Vidal, per donar-me la oportunitat de fer la tesi i aprendre a fer recerca amb ells. Sense cap dubte, he tingut molta sort de poder treballar i formar-me amb aquests *jefes*, que a banda d'ensenyar-me citogenètica m'han donat l'empenta i la confiança necessàries per tirar endavant el projecte. Cal dir que també han sabut dir "no t'embalis" unes quantes vegades, i sort, perquè si no encara estaria fent experiments... Moltes gràcies per tractar-me com ho heu fet tots aquests anys i com ho seguieu fent amb el recolzament que em doneu ara que haig de continuar el meu camí "fora de casa". Joan, no t'amoïnis perquè no penso deixar la citogenètica. Tu tens la culpa que no pugui deixar els cromosomes de banda des de ben al principi, quan encara era estudiant de biologia i em donaves classes de citogenètica, fins ara al final de la tesi i després de moltes discussions sobre resultats i experiments, que encara tinc més ganes de seguir per aquest camí.

No voldria acabar la tesi sense agrair a la gent amb qui he tingut la gran sort de treballar i compartir hores de laboratori, despatx i una bona amistat. A la Marta Pladevall (Tinika), per tots els pitis que hem fet junts suportant amb il·lusió aquells moments tan durs de la ciència quan creus que mai t'en sortiràs (això no s'aguanta eh). A la Irene que només ha tingut paraules d'ànim des de que va arribar a la unitat fins ara que està lluny. Ánimos Nene! Que tu eres la próxima! *Eskerrik asko* por todo. Al Nuno, pel seu recolzament i els seus bons consells, ets el millor! *Muito obrigado* Nuninho. A l'Eli, per estar sempre disposada a escoltar i ajudar-me amb totes les males passades que em feia el word, el power-point, l'excel, etc. A la Cristina, la *joya* de la corona, pero corona real eh!. Muchas gràcies por todos los buenos momentos, la alegría que has traído de los madriles y por hacerme reír todo el día. Vales mucho Cristi!

Moltes gràcies a tota la resta de gent de la Unitat de Biologia Cel·lular, especialment a la Lydia, que ha compartit gairebé tots aquests anys de tesi amb mi, compartint solucions, sondes, poiata i moltes converses al laboratori, als microscopis i al despatx. Ànims Lydia, que ja falta poc!. A l'Ester i la Zaida, pel tracte sempre proper i amable. A l'Anna Godó i la Laia, que em prenen el relleu com a *contazoides*, molta sort i bones FISH a les dues!. A tots els companys de la Unitat de Biologia Cel·lular amb qui he compartit moltes hores i riures aquests anys: Al Leo, per les converses de citogenètica i com no, per posar el títol al meu primer article "*Spot-counting to*

stop counting?". A la Laura Tusell, encara recordo com et vam enganyar el dia del meu aniversari, però va ser divertit. A tots els companys *matxaques* i no *matxaques* de la unitat: Sílvia (que faríem tots nosaltres sense tu), Cristina C, David, Jonathan, Judit, Sergi, Tània, Nerea, Assumpta, Marta M, Marta F, Dani, Laia, Andreu, Maria Jesús, Albert, etc etc... a tots! Moltes gràcies.

No em podria oblidar d'agrair l'ajut que he rebut de molta altra gent de fora de la universitat. A l'Ester Gean del Hospital Sant Joan de Déu, per col·laborar amb nosaltres i per ensenyar-me com és fa genètica a un hospital. Moltes gràcies per tractar-me sempre tan bé i per fer-me riure cada cop que anava a l'hospital i ens fumàvem un *ventolín*. Moltes gràcies també per fer-me costat al Congrés Europeu de Genètica Humana a Gotemburg, vas aconseguir que em trobés molt còmode i segur per la meva xerrada. Al Joan Aurich pels bons consells i l'ajuda amb els BACs i els marcatges. Ja ho tinc Joan!

I could not forget to thank Dr. Emanuela Volpi from the Wellcome Trust Center for Human Genetics in Oxford. Thank you very much for treating me so well during my three months stay in your lab and specially for encouraging me to pursue my career in research. I would be very pleased to have the opportunity to collaborate with you again in the future during my postdoc research, we could add to the project the Cytogenetics that it needs!. Honestly, thank you for supporting me so much. I also want to thank the staff of the Molecular Cytogenetics lab for making this stay in Oxford a fantastic experience: Ghazala, Yusuf, Keith and Daniela. Thank you very much guys!!

A tots els meus amics fora dels laboratoris (o en altres laboratoris). A la Dàlia (alma hippie), per estar sempre al meu costat, al Felipe, per ensenyar-me que darrera del negre també hi ha blanc, a l'Òscar, el Dani, la Laura, la Marta, el Cesc, l'Eloi, la Montse i el Jordi, que em va fer la portada de la tesi (Yorik, ha quedado de PM!). I molt especialment al Siro, per fer-me veure les coses amb uns altres ulls i compartir amb mi tants bons moments. És impossible oblidar-me de la Montserrat i la Maria Dolors Benejam, per omplir la meva vida de música. Moltes gràcies a tots!

Finalment, però no menys important, vull agrair el recolzament incondicional de la meva família. Als meus germans, el Daniel i el Rubén, per estar disposats a animar-me en qualsevol moment i demostrar-me què és el que de veritat importa. A la Mònica i al Pol (el meu minimolina) que sempre està observant i aprenent, de ben segur serà un bon científic. Als meus pares, per ser un exemple a seguir en tots els sentits i per tot el que han fet per mi durant tots aquests anys.

Sense cap dubte, ells són també autors d'aquesta tesi, sense el seu recolzament això no hagués estat possible. Gràcies per donar-me les respostes més importants i fer-me creure en mi mateix.

Bé, ja vaig acabant, potser he fet uns agraïments massa llargs, però això em fa veure la gran sort que tinc de poder agrair a tantes persones la seva ajuda.

MOLTES GRÀCIES A TOTS!