

INCIDÈNCIA DE DELECIONS I DUPLICACIONS DE LA REGIÓ 15q11q13 EN ESPERMATOZOIDES DE PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Òscar Molina, Joan Blanco i Francesca Vidal

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.
francesca.vidal@uab.cat.

Resum

La síndrome de Prader-Willi (SPW) és un trastorn genòmic causat majoritàriament per delecions de la regió 15q11q13 (70-80 %), i el risc de recurrència s'ha establert com a inferior al 0,5 %. S'ha observat que l'arquitectura genòmica d'aquesta regió la predispesa a la recombinació al·lèlica no homòloga en la meiosi, de manera que dona lloc a delecions. L'objectiu d'aquest treball és avaluar la incidència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SPW. S'han estudiat, mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (FISH) amb sondes de DNA específiques, espermatozoides provinents de mostres de semen de 16 individus amb descendència afectada i 10 individus control. S'han observat diferències significatives en la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 entre els pares de SPW i els controls ($P = 0,002$). Les comparacions individuals mostren un increment significatiu en 10 dels 16 individus analitzats ($P < 0,01$). No s'ha observat correlació entre l'increment de reorganitzacions en espermatozoides i l'origen genètic de la SPW. Els resultats suggereixen que l'increment de delecions i duplicacions observat és un reflex de la inestabilitat de la regió 15q11q13.

Paraules clau: delecions, duplicacions, FISH en espermatozoides, síndrome de Prader-Willi.

Abstract

Prader-Willi Syndrome (PWS) is a genomic disorder mostly caused by deletions of the 15q11q13 region (70-80%) and the recurrence risk has been established in less than 0.5%. It has been observed that the genomic architecture of this region make it prone to Non-Allelic Homologous Recombination during meiosis giving rise to deletions. The aim of this study was to assess the incidence of deletions and duplications of the 15q11q13 region in spermatozoa from fathers of PWS patient. Sperm samples from 16 PWS fathers and 10 control donors were analysed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using specific DNA probes. Significant differences were observed in the frequency of deletions and duplications of the 15q11q13 region between PWS fathers and control donors ($P = 0.002$). Individual comparisons showed moderate increases in ten out of 16 PWS ($P < 0.01$). No correlation was observed between the frequency of reorganization in spermatozoa and the genetic origin of the syndrome. Results suggest that the frequency of deletions and duplications is a reflection of the instability of the 15q11q13 region.

Key words: deletions, duplications, Prader-Willi syndrome, sperm FISH, 15q11q13 region.

INTRODUCCIÓ

La síndrome de Prader-Willi (PWS) és un trastorn genòmic que presenta una incidència d'un de cada 15.000 naixements. La causa genètica majoritària són delecions de la regió 15q11q13 (70-80 %) (Cassidy *et al.*, 2000). La regió 15q11q13 està flanquejada per tres duplicacions segmentàries (*low copy repeats*, LCR), que es corresponen amb els punts de trencament de la majoria de delecions causants de la SPW (vegeu la figura 1). Els LCR de la regió

15q11q13 estan formats per duplicacions del gen/pseudogèn *HERC2*, i formen blocs anomenats *END-repeats*. Aquests blocs presenten una homologia superior al 98 % i actuen com a punts calents de recombinació. Aquestes característiques afavoreixen la recombinació al·lèlica no homòloga (*non allelic homologous recombination*, NAHR) entre diferents còpies dels *END-repeats*, i això produeix diferents reorganitzacions de la regió crítica (Inoue, 2002). L'orientació dels LCR és important, ja que determina l'aparellament de les regions implicades i

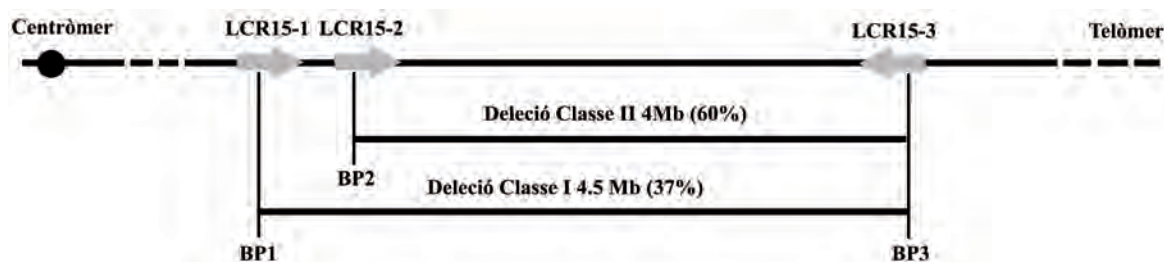


Figura 1. Esquema de la regió 15q11q13. Amb fletxes s'assenyalen els LCR que flanquegen la regió crítica de la SPW. Es mostren els dos tipus de delecions majoritàries, la seva mida i la localització dels punts de trencament (*break points*, BP).

de les reorganitzacions que en resulten (vegeu la figura 2).

Es considera que les reorganitzacions causants de la SPW, com les d'altres trastorns genòmics, són produïdes *de novo* amb un risc de recurrència similar al de la població general, establert a partir d'estudis poblacionals com a inferior al 0,5 % (Gardner i Sutherland, 2004). No obstant això, alguns autors han descrit haplotips de regions crítiques que s'han relacionat amb un increment de la predisposició a generar delecions en línia germinal (Gimelli *et al.*, 2003; Cusco *et al.*, 2008).

Els estudis en gàmetes, i molt especialment, en espermatozoides, per l'avantatge quant al nombre i la facilitat d'obtenció de les mostres, ens ofereixen una alternativa per estudiar la freqüència en què es donen aquestes reorganitzacions i estimar riscos de recurrència. Aquest treball té com a objectius avaluar la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en espermatozoides de parets d'individus amb la síndrome de Prader-Willi, per estimar el risc de recurrència de la síndrome.

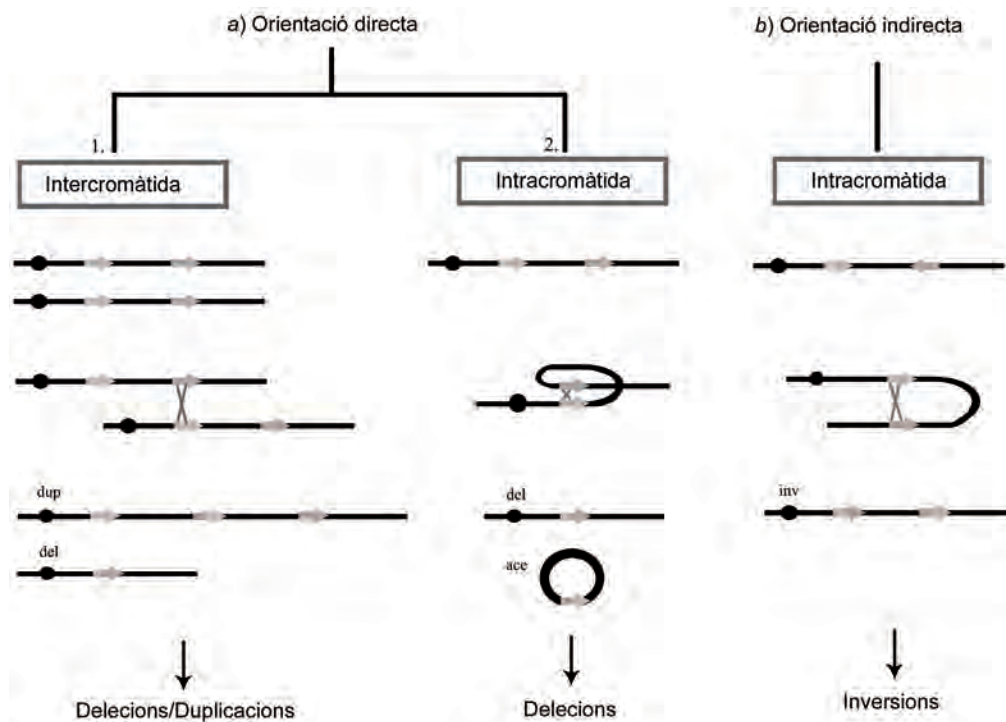


Figura 2. Recombinaçió al·lèlica no homòloga en funció de l'orientació dels LCR. a1) NAHR entre LCR directes de dues cromàtides. a2) NAHR entre LCR directes d'una cromàtida. b) NAHR entre LCR indirectes. A la part inferior de la figura s'indiquen els productes estables per a cadascuna de les possibilitats.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques

Es van obtenir mostres de semen de 16 parets d'individus amb la SPW d'edats compreses entre 32 i 60 anys i 10 individus control entre 20 i 50 anys. Tots els individus participants van ser informats de l'estudi i van manifestar la seva voluntat de participar-hi amb la signatura del consentiment corresponent.

Hibridació in situ fluorescent (FISH)

El procediment de fixació, descondensació i hibridació de les mostres es va realitzar seguint el protocol estandarditzat al nostre laboratori.

Es va utilitzar una sonda específica de locus per a la regió 15q11q13 (LSI 15q11q13 *spectrum orange*; Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA), una sonda centromèrica per al cromosoma 15 (Locus D15Z4, *spectrum green*, Vysis Inc.) com a control d'hibridació, i una sonda centromèrica per al cromosoma 6 (Locus D6Z1, *spectrum aqua*, Vysis Inc.) com a control de ploïdia.

Les valoracions es van realitzar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 equipat amb un filtre de triple banda i filtres específics per a FITC, Cy3 i Aqua. La combinació de sondes utilitza-

da va permetre identificar diferents genotips, que van ser classificats en funció del nombre i distribució dels senyals d'hibridació.

Van ser analitzats un mínim de 10.000 espermatozoides per individu. L'assignació de genotips es va realitzar d'acord amb els següents criteris: *a*) espermatozoides normals: presentaven els tres senyals d'hibridació, *b*) delecions 15q11q13: espermatozoides que no presentaven el senyal específic de la regió 15q11q13 i eren portadors del senyal centromèric del cromosoma 15 i del control de ploïdia i *c*) duplicacions 15q11q13: espermatozoides que presentaven dos senyals d'hibridació de la regió 15q11q13 d'acord amb els criteris estàndard pel que fa a mida, intensitat i distància (Blanco *et al.*, 1996), i que eren portadors d'un senyal centromèric del cromosoma 15 i d'un senyal per al control de ploïdia.

L'anàlisi de FISH en espermatozoides es va realitzar a cegues respecte a l'origen genètic de la síndrome (delecció, disomia uniparental, defectes del centre d'impressió genètica), que va ser facilitat pel centre de diagnòstic UDIAT del Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell) un cop finalitzat l'estudi en gèmetes.

Anàlisi estadística

Es va dur a terme utilitzant el paquet estadístic SPSS

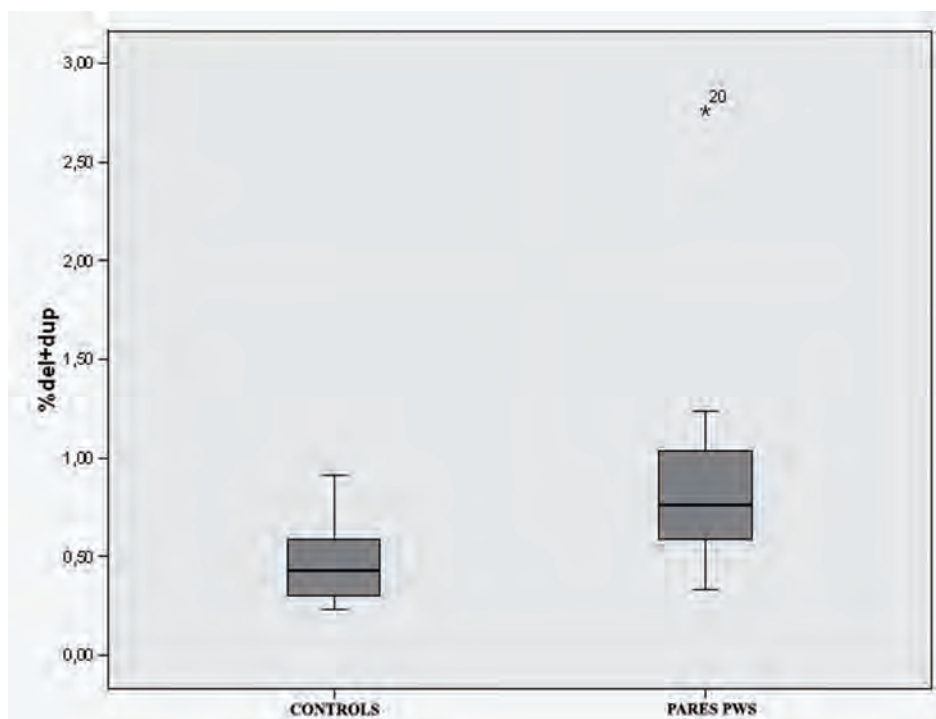


Figura 3. Diferències observades per a la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en les dues poblacions analitzades.

Taula 1. Resultats d'individus amb descendència afectada per la SPW

Casos	Normals	del15q11q13	dup15q11q13	del/dup1	Totals	Etiologia
PW-1	10.027 (98,17)	54 (0,53)	32 (0,32)	86 (0,84)*	10.214	DUP
PW-2	9.873 (98,42)	79 (0,79)	45 (0,45)	124 (1,24)*	10.032	Deleció
PW-3	10.554 (98,96)	32 (0,30)	27 (0,25)	59 (0,55)	10.665	Deleció
PW-4	10.037 (99,47)	18 (0,18)	15 (0,15)	33 (0,33)	10.090	Deleció
PW-5	9.948 (98,57)	80 (0,80)	23 (0,23)	103 (1,02)*	10.092	Deleció
PW-6	10.120 (98,77)	42 (0,41)	36 (0,35)	78 (0,76)*	10.246	Deleció
PW-7	10.061 (99,08)	43 (0,42)	28 (0,28)	71 (0,70)*	10.154	Desconegut
PW-8	10.164 (99,07)	32 (0,31)	27 (0,26)	59 (0,58)	10.259	Deleció
PW-9	10.049 (99,16)	28 (0,28)	32 (0,32)	60 (0,59)	10.134	Deleció
PW-10	9.867 (96,56)	239 (2,34)	43 (0,42)	282 (2,76)*	10.219	DUP
PW-11	10.549 (99,04)	37 (0,35)	30 (0,28)	67 (0,63)	10.651	DUP
PW-13	9.986 (98,32)	81 (0,80)	26 (0,26)	107 (1,05)*	10.157	Deleció
PW-14	10.031 (99,22)	47 (0,46)	12 (0,12)	59 (0,58)	10.130	DUP
PW-15	9.918 (98,28)	51 (0,51)	26 (0,26)	77 (0,76)*	10.092	Deleció
PW-16	10.177 (98,85)	46 (0,45)	39 (0,39)	85 (0,83)*	10.295	Deleció
PW-17	10.020 (98,12)	59 (0,58)	57 (0,56)	116 (0,14)*	10.212	Desconegut
% ± SEM	98,63 % ± 0,17	0,59 % ± 0,12	0,31 % ± 0,03	0,90 % ± 0,14		
Controls	99,17 % ± 0,07	0,22 % ± 0,03	0,24 % ± 0,04	0,47 % ± 0,07		

Es mostra l'etiologia de la SPW. Al peu de la taula es mostren els resultats obtinguts per a la població control.

* Incrementos significatius respecte a la població control ($P < 0,01$).

versió 14 (SPSS Inc., Wacker Drive, Chicago, IL, EUA).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Es van analitzar un total de 101.505 espermatozoides d'individus control (vegeu la taula 1) i 163.542 espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SPW (vegeu la taula 1). En termes poblacionals, els pares d'individus amb la SPW presentaven un increment significatiu de 15q11q13del+dup (0,90 % ± 0,14) respecte a la població control (0,47 % ± 0,07) ($P = 0,002$) (vegeu la figura 3). En aquest increment poblacional hi van contribuir deu dels setze individus analitzats, els quals van mostrar, de manera individual, increments significatius (vegeu la taula 1). S'ha suggerit que variacions estructurals, com inversions de la regió crítica (Gimelli *et al.*, 2003) o variacions en el nombre de repeticions dels LCR (Cusco *et al.*, 2008) podrien ser factors que predisposin a l'aparició de delecions en la descendència. Els canvis numèrics i estructurals podrien dificultar l'aparellament homòleg durant el procés de recombinació i afavorir l'aparellament heteròleg amb segments cromosòmics propers que comparteixen un grau d'homologia molt elevat, com els LCR. Així, individus portadors de canvis d'aquest tipus podrien ser susceptibles en diferents graus a fenòmens de NAHR, amb el conseqüent increment de reorganitzacions de la regió implicada.

Pel que fa a la comparació dels resultats obtinguts en espermatozoides amb l'etiologia de la SPW en la descendència, no s'ha observat una relació entre un increment de 15q11q13del+dup i descendència afectada per la SPW causada per deleció. A més, alguns dels individus que presenten increments de 15q11q13 del+dup en espermatozoides són pares amb descendència afectada per la SPW causada per DUP materna (vegeu la figura 3). La utilització únicament de marcadors interns de la regió 15q11q13 per a l'anàlisi de l'origen genètic de la SPW va impedir diferenciar entre DUP i DUP parcials. Així doncs, els nostres resultats indiquen que la freqüència de delecions en espermatozoides és un reflex de la inestabilitat de la regió 15q11q13, que la predisposa a diferents tipus de reorganitzacions: duplicacions, inversions i probablement DUP parcials. Aquesta última reorganització cromosòmica explicaria l'increment de 15q11q13del+dup observat en els individus amb un fill afectat de la SPW causat per DUP materna, i això reforça la necessitat d'estudiar l'origen parental, tant de la regió crítica com de les regions externes del cromosoma, per discriminar DUP de DUP parcials.

Tot i que els increments observats són moderats (rang: 0,70-2,76 %), aquests individus s'haurien de considerar com a individus de risc per transmetre la SPW a la descendència. Situacions similars s'han observat en altres poblacions analitzades, en què s'han trobat increments moderats d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides de pares amb des-

condència afecta per diferents síndromes (Blanco *et al.*, 1998; Martínez-Pasarell *et al.*, 1999; Arnedo *et al.*, 2006).

AGRAÏMENTS

Centre de diagnòstic UDIAT (Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell). Associacions Catalana i Madrilenya per a la SPW. Beca PIF2007 de la Universitat Autònoma de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

- 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: 524-528.
- 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: 722-726.
- 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: 1067-1072.
- CASSIDY, S. B.; DYKENS, E.; WILLIAMS, C. A. (2000). «Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders». *Am. J. Med. Genet.*, 97: 136-146.
- CUSCO, I.; COROMINAS, R.; BAYES, M.; FLORES, R.; RIVERA-BRUGUES, N.; CAMPUZANO, V.; PEREZ-JURADO, L. A. (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.
- GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. (2003). *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. Nova York: Oxford University Press.
- GIMELLI, G.; PUJANA, M. A.; PATRICELLI, M. G.; RUSSO, S.; GIARDINO, D.; LARIZZA, L.; CHEUNG, J.; ARMENGOL, L.; SCHINZEL, A.; ESTIVILL, X.; ZUFARDI, 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.
- INOUE, K. (2002). «Molecular mechanisms for genomic disorders». *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 3: 199-242.
- 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: 345-349.