Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 75-78 (2019)

ANÀLISI DE LA FREQÜÈNCIA DE DELECIONS I DUPLICACIONS EN ESPERMATOZOIDES DE PROGENITORS D'INDIVIDUS AFECTES PER LA SÍNDROME DE LA DELECIÓ 22q11.2

Mireia Ramos-Muntada[1], Laia Vergés[1], Antonio Martínez-Monseny[2], Núria Capdevila[3], Joan Blanco[1*], Francesca Vidal[1*]

[1] Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08103 Bellaterra. francesca.vidal@uab.cat, joan.blanco@uab.cat

[2] Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. 08950 Esplugues de Llobregat

[3] Corporació Sanitària Parc Taulí. 08208 Sabadell

* Corresponding authors: joan.blanco@uab.cat / francesca.vidal@uab.cat

Resum

La regió 22q11.2 presenta una elevada densitat de low-copy repeats (LCRs). La presència de LCRs promou la recombinació homòloga no al·lèlica durant la meiosi que resulta en delecions cromosòmiques que es poden transmetre a la descendència i causar la síndrome de la deleció 22q11.2 (SD22q11.2). Aquest treball té l'objectiu de determinar el risc de recurrència de la SD22q11.2 en pares d'individus afectats per la SD22q11.2. Mitjançant la tècnica d'hibridació in situ fluorescent s'ha determinat la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides procedents de mostres de semen de 9 pares amb descendència afectada per la SD22q11.2 d'origen patern. Els resultats no mostren un increment de delecions i duplicacions en el conjunt de la població estudiada respecte la població control (0,32%±0,10 i 0,27%±0,05, respectivament). En canvi, a nivell individual, els individus DG2, DG6 i F14 mostren increment de delecions i duplicacions (0,77%, 0,64% i 1,18%, respectivament). Aquests tres individus han de ser considerats individus amb risc de transmissió de delecions o duplicacions de la regió 22q11.2 als seus descendents i, conseqüentment, seguir un procés d'assessorament genètic.

Paraules clau: LCR, NAHR, deleció, 22q11.2, espermatozoides.

Abstract

The 22q11.2 region shows a high density low-copy repeats (LCRs). The presence of LCRs promotes non-allelic homologous recombination during meiosis resulting in chromosomal deletions that can be transmitted to the offspring and cause the 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS). This study aims to determine the risk of recurrence of 22q11.2DS in parents of individuals affected of 22q11.2DS. Fluorescence in situ hybridization has been used to determine the frequency of deletions and duplications of the 22q11.2 region in spermatozoa from 9 fathers with offspring affected by 22q11.2DS resulting from paternal origin. The results do not show an increase in deletions and duplications in the studied population when compared to the control population (0.32% ± 0.10 and 0.27% ± 0.05, respectively). On the other hand, individuals DG2, DG6 and F14 show an increase in the presence of deletions and duplications (0.77%, 0.64% and 1.18%, respectively). These three individuals should be considered individuals at risk for the transmission of deletions or duplications of the 22q11.2 region to their offspring and, subsequently, genetic counselling should be recommended.

Key words: LCR, NAHR, deletion, 22q11.2, spermatozoa.

INTRODUCCIÓ

Els low copy-repeats (LCRs) són repeticions de blocs de seqüències de DNA amb una homologia superior al 90% (Bailey et al., 2006). El cromosoma 22 presenta una elevada proporció de LCRs localitzats a la regió 22q11.2 (She et al., 2004). S'han descrit vuit LCRs que representen el 11% d'aquesta regió: LCR22-2, LCR22-3a, LCR22-3b, LCR22-4, LCR22-5, LCR22-6, LCR22-7 i LCR22-8 (Babcock et al., 2007; Stankiewicz et al., 2002; Vergés et al., 2014). L'elevada homologia entre els LCRs promou la recombinació homòloga no al-

lèlica (NAHR) durant la meiosi. Els productes de la NAHR resulten en reorganitzacions cromosòmiques i condueixen a la formació de gàmetes portadores de delecions (Dittwald et al., 2013; Ou et al., 2011).

La síndrome de la deleció 22q11.2 (SD22q11.2, OMIM 611867), també coneguda com a síndrome de DiGeorge (SDG, OMIM 188400) o Velocardiofacial (SVCF, OMIM 192430), és un dels trastorns genòmics més freqüents en humans amb una incidència de 1 cada 4.000 nounats (Botto et al., 2003). La causa d'aquesta síndrome és deguda a una deleció en heterozigosi de la regió 22q11.2. La deleció majoritària es produeix en més del 85% dels casos, i comprèn els LCR22-2 i LCR22-4. Aquesta pèrdua representa 3Mb del cromosoma 22 on es localitza, entre d'altres, el gen TBX1 (OMIM 602054). Al voltant del 7% dels casos s'originen per una deleció menor, de 1,5Mb, produïda entre els LCR22-2 i LCR22-3a. La haploinsuficiència dels gens localitzats en la regió delecionada ocasiona el fenotip de la SD22q11.2 (Carlson et al., 1997).

Estudis epidemiològics han determinat que el risc de recurrència de la SD22q11.2 és el mateix que el de la població general, tot i que l'estudi d'aquest risc és complex de determinar per certs factors, com la baixa incidència de la síndrome (Röthlisberger et al., 2007). Una alternativa als estudis poblacionals són els estudis en gàmetes. En aquest sentit, l'estudi d'espermatozoides permet analitzar un elevat nombre de cèl·lules i establir les freqüències de les reorganitzacions cromosòmiques produïdes per la NAHR de forma individual. Per aquest motiu és convenient l'estudi en gàmetes (Molina et al., 2011).

L'objectiu d'aquest treball és determinar la freqüència de delecions i duplicacions en espermatozoides de progenitors asimptomàtics amb descendència afectada per la SD22q11.2, els quals es coneix que són transmissors de la deleció, per tal de conèixer el risc de recurrència d'aquesta síndrome.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques

Es van recollir 9 mostres de semen de pares d'individus afectes de la SD22q11.2, els quals es coneixia que l'origen de transmissió de la deleció era patern. Les mostres procedien de l'Hospital Sant Joan de Déu (n=7) i de la Corporació Sanitària Parc Taulí (n=2).

Obtenció d'extensions d'espermatozoides

Les mostres de semen es van transferir a tubs de 15ml i es van centrifugar a 1.000g durant 8 minuts. La fracció cel·lular obtinguda es va tractar amb una solució hipotònica (KCl 0,075M) temperada a 37ºC. Després d'una incubació a 37ºC durant 25 minuts i una altra centrifugació, es va decantar el sobrenedant i es va resuspendre la mostra amb Carnoy (3:1 metanol:àcid acètid). Es van realitzar 3 rentats amb Carnoy abans de preparar les extensions cel·lulars.

Les extensions cel·lulars, es van processar segons el protocol d'hibridació in situ fluorescent descrit al nostre laboratori (Sarrate et al., 2009). Es va realitzar una mescla de diferents sondes comercials (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, Estats Units): una sonda locus específica per la regió 22q11.2 (LSI TUPLE1, Spectrum Orange, Vysis), una sonda locus específica pel cromosoma 22 (LSI ARSA, Spectrum Green, Vysis) i una sonda centromèrica pel cromosoma 6 (CEP6, Spectrum Aqua, Vysis). Les sondes LSI ARSA i CEP6 van ser utilitzades com a controls d'hibridació i ploïdia, respectivament.

Anàlisi microscòpica

Els portaobjectes es van analitzar amb un microscopi de fluorescència Olympus BX60 (Olympus, Barcelona, Espanya) que disposa d'un multifiltre per DAPI/Spectrum Orange/Conjugat de isotiocianat fluorescent (FITC) i de tres filtres específics pels fluorocroms Spectrum Orange, Spectrum Green i Spectrum Aqua. Es van analitzar 10.000 espermatozoides per mostra seguint els criteris de valoració descrits prèviament pel nostre grup de recerca (Molina et al., 2011).

Les diferents combinacions de senyals van permetre classificar els espermatozoides en quatre categories diferents: genotip haploide (espermatozoides amb un senyal vermell, un de verd i un de blau), genotip deleció regió crítica 22q11.2 (espermatozoides amb cap senyal vermell i un de verd i un de blau), genotip duplicació regió crítica 22q11.2 (espermatozoides amb dos senyals vermells i un de verd i un de blau), altres genotips (espermatozoides amb altres combinacions de senyals).

Anàlisi estadística

Es va realitzar una comparació global de la població estudiada respecte la població control (Molina et al., 2011) mitjançant el test Mann-Whitney. La freqüència de delecions i duplicacions de cada individu es va comparar de manera individual amb el conjunt de la població control mitjançant el test exacte de Fisher. Ambdós tests es van aplicar amb un nivell de significança de $p<0,01$. Les dades es van analitzar utilitzant el programa R i386 3.3.2 (R Core Team, 2013).

RESULTATS

La freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 va ser analitzades en un total de 80.779 espermatozoides.

La freqüència mitjana de delecions (±SEM) va ser de 0,23% (±0,08) amb un rang de 0,13 a 0,92%. La freqüència mitjana de duplicacions (±SEM) va ser de 0,13% (±0,02) amb un rang de 0 a 0,25%. La freqüència mitjana de delecions i duplicacions (±SEM) va ser de 0,32% (±0,10) amb un rang de 0,12 a 1,18% (Taula 1).

Es van detectar increments significatius de delecions i duplicacions en 3 dels 9 pares SD22q11.2 analitzats (Test exacte de Fisher, p<0,01) (Taula 1). Els tres casos van mostrar un increment del percentatge de delecions i del sumatori de delecions i duplicacions. En canvi, només en l'individu F14 el percentatge de duplicacions es trobava fora del rang de normalitat de la població control.

Taula 1. Freqüències de delecions i duplicacions en espermatozoides.

Població		Delecions (%)	Duplicacions (%)	Delecions+duplicacions (%)
Estudi	DG1	0,24	0,11	0,35
	DG2	0,57*	0,20	0,77*
	DG3	0,19	0,13	0,32
	DG6	0,52*	0,12	0,64*
	DG8	0,18	0,07	0,25
	DG10	0,13	0,10	0,23
	F14	0,92*	0,25*	1,18*
	F15	0.12	0.00	0.12
	% SEM	0,23 ± 0,08	0,13 ± 0,02	0,32 ± 0,10
Control	% SEM	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,27 ± 0,05
	IC 99%	0,10 – 0,24	0,05 – 0,20	0,15 – 0,43

* Increments significatius respecte la població control (p<0,01) (Molina et al., 2011)

DISCUSSIÓ

Existeixen individus amb increment de la freqüència de delecions i duplicacions, fet que incrementa el risc de recurrència a transmetre la síndrome. Tot i que la població analitzada és limitada, l'increment de delecions podria ser rellevant en l'avaluació del risc de transmissió. És per aquest motiu que aquests individus han de ser considerats individus de risc de transmetre la SD22q11.2 als seus descendents i, conseqüentment, seguir un procés d'assessorament genètic particular.

En altres estudis sobre aquesta síndrome i altres síndromes amb una arquitectura genòmica similar (presència de LCR que flanquegen la regió crítica), com la síndrome de Prader-Willi (SPW, OMIM 176270), s'ha observat increment d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides d'un nombre significatiu de pares transmissors (Molina et al., 2010; Vergés et al., 2014).

En aquests estudis, l'increment s'ha relacionat amb un increment de la inestabilitat focalitzat en la regió 22q11.2, causat per la presència de certs factors de predisposició, com poden ser inversions de la regió crítica (Osborne et al., 2001) o modificacions de l'arquitectura genòmica dels LCR22 involucrats en la deleció (Cusco et al., 2008; Vergés et al., 2014). Aquests factors podrien resultar en l'augment de la formació d'aparellaments no al·lèlics o incrementar la freqüència de trencaments de doble cadena en les regions crítiques. Aquest fet ocasionaria, en última instància, la deleció de la regió crítica (Baumer et al., 1998; Vergés et al., 2017).

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament del projecte SAF2016-77165-P del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Agraïm a les famílies la seva col·laboració i als centres Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) i Corporació Sanitària Parc Taulí (Sabadell) el subministrament de les mostres.

BIBLIOGRAFIA

BABCOCK, M., YATSENKO, S., HOPKINS, J., BRENTON, M., CAO, Q., DE JONG, P., ... MORROW, B. E. (2007). Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome. Human Molecular Genetics, 16(21), 2560–2571. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm197

BAILEY, J. A., & EICHLER, E. E. (2006). Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. Nature Reviews. Genetics, 7(7), 552–564. https://doi.org/10.1038/nrg1895

BAUMER, A., DUTLY, F., BALMER, D., RIEGEL, M., TÜKEL, T., KRAJEWSKA-WALASEK, M., & SCHINZEL, A. A. (1998). High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. Human Molecular Genetics, 7(5), 887–894. https://doi.org/10.1093/hmg/7.5.887

BOTTO, L. D., MAY, K., FERNHOFF, P. M., CORREA, A., COLEMAN, K., RASMUSSEN, S. a, ... Objectives, A. (2003). A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population, 112(1), 101–108.

CARLSON, C., SIROTKIN, H., PANDITA, R., GOLDBERG, R., MCKIE, J., WADEY, R., ... MORROW, B. E. (1997). Molecular Definition of 22q11 Deletions in 151 Velo-Cardio-Facial Syndrome Patients. The American Journal of Human Genetics, 61(3), 620–629. https://doi.org/10.1086/515508

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 Research, 18(5), 683–694. https://doi.org/10.1101/gr.073197.107

DITTWALD, P., GAMBIN, T., GONZAGA-JAUREGUI, C., CARVALHO, C. M. B., LUPSKI, J. R., STANKIEWICZ, P., & GAMBIN, A. (2013). Inverted Low-Copy Repeats and Genome Instability-A Genome-Wide Analysis. Human Mutation, 34(1), 210–220. https://doi.org/10.1002/humu.22217

MOLINA, O., ANTON, E., VIDAL, F., & BLANCO, J. (2011). Sperm rates of 7q11.23, 15q11q13 and 22q11.2 deletions and duplications: a FISH approach. Human Genetics, 129(1), 35–44. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0894-4

MOLINA, O., BLANCO, J., & VIDAL, F. (2010). Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers. Molecular Human Reproduction, 16(5), 320–328. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq005

OSBORNE, L. R., LI, M., POBER, B., CHITAYAT, D., BODURTHA, J., MANDEL, A., ... SCHERER, S. W. (2001). A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. Nature Genetics, 29(3), 321–325. https://doi.org/10.1038/ng753

OU, Z., STANKIEWICZ, P., XIA, Z., BREMAN, A. M., DAWSON, B., WISZNIEWSKA, J., ... CHEUNG, S. W. (2011). Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes, 2, 33–46. https://doi.org/10.1101/gr.111609.110.

RÖTHLISBERGER, B., & KOTZOT, D. (2007). Recurrence risk in de novo structural chromosomal rearrangements. American Journal of Medical Genetics Part A, 143A(15), 1708–1714. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31826

SARRATE, Z., & ANTON, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm. Journal of Visualized Experiments, (31). https://doi.org/10.3791/1405

SHE, X., JIANG, Z., CLARK, R. A., LIU, G., CHENG, Z., TUZUN, E., ... EICHLER, E. E. (2004). Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. Nature, 431(7011), 927–930. https://doi.org/10.1038/nature03062

STANKIEWICZ, P., & LUPSKI, J. R. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends in Genetics : TIG, 18(2), 74–82. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02592-1

VERGÉS, L., MOLINA, O., GEÁN, E., VIDAL, F., & BLANCO, J. (2014). Deletions and duplications of the 22q11.2 region in spermatozoa from DiGeorge/velocardiofacial fathers. Molecular Cytogenetics, 7(1), 86. https://doi.org/10.1186/s13039-014-0086-3

VERGÉS, L., VIDAL, F., GEÁN, E., ALEMANY-SCHMIDT, A., OLIVER-BONET, M., & BLANCO, J. (2017). An exploratory study of predisposing genetic factors for DiGeorge/velocardiofacial syndrome. Scientific Reports, 7, 40031. https://doi.org/10.1038/srep40031