

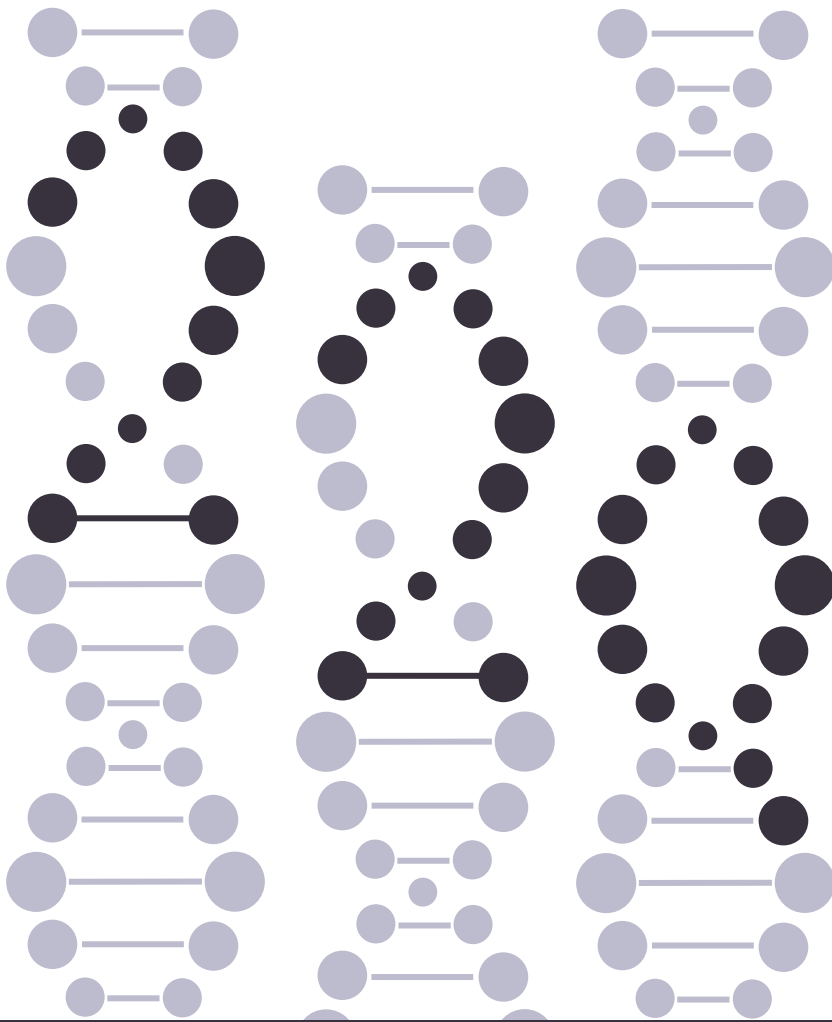


Universitat Autònoma de Barcelona

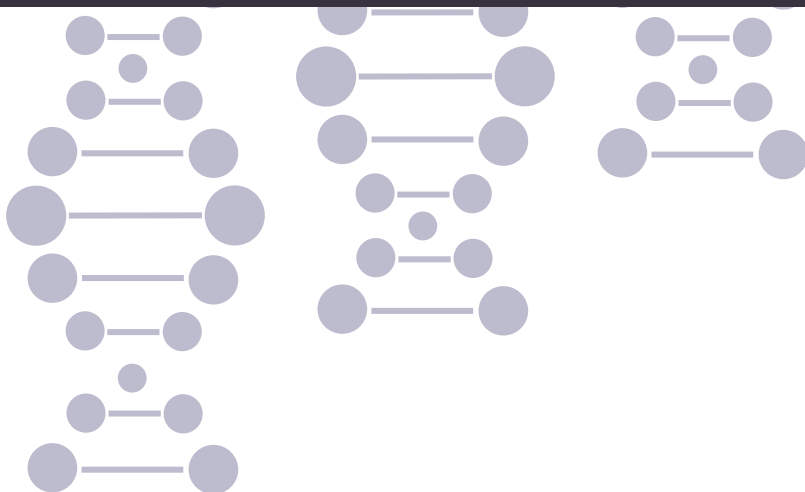
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



La síndrome de la delecció 22q11.2 com a model d'estudi
per a l'anàlisi integral de factors genètics que
predisposen a trastorns genòmics



Mireia Ramos Muntada

Tesi doctoral · 2021

La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

Mireia Ramos Muntada

Memòria presentada per optar al Grau de Doctora en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi doctoral inscrita en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Bellaterra · 2021

El Dr. Joan Blanco Rodríguez, professor agregat del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

I la Dra. Francesca Vidal Domínguez, catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que Mireia Ramos Muntada ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics" per optar al grau de Doctora 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.

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Mireia Ramos Muntada

Bellaterra, 29 d'abril de 2021

La present tesi doctoral s'ha desenvolupat amb el finançament del projecte:

- SAF2016-77165-P. Ministerio de Ciencia e Innovación

ÍNDEX

Resum	13
Summary	15
1. Introducció	17
1.1. Trastorns genòmics.....	19
1.1.1. Arquitectura genòmica de les regions implicades en trastorns genòmics recurrents.....	19
1.1.2. Causa dels trastorns genòmics recurrents	20
1.1.3. Risc de recurrència	24
1.1.4. Factors de predisposició.....	26
1.1.4.1. Edat.....	26
1.1.4.2. Inversió de la regió crítica	27
1.1.4.3. Variacions dels LCR	27
1.1.4.4. Variants gèniques	28
1.2. La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi	29
2. Hipòtesi i objectius	33
2.1. Hipòtesi de treball	35
2.2. Objectius	35
2.2.1. Objectiu general	35
2.2.2. Objectius específics.....	35
3. Materials i mètodes	37
3.1. Mostres biològiques i processament.....	39
3.1.1. Semen	40
3.1.1.1. Extensions cel·lulars d'espermatozoides.....	40
3.1.2. Sang perifèrica	40
3.1.2.1. Extracció de DNA genòmic	41
3.1.2.2. Extensions cel·lulars de limfòcits.....	41
3.2. Tècniques d'anàlisi.....	42
3.2.1. FISH en espermatozoides.....	42
3.2.1.1. Selecció de les sondes.....	43



3.2.1.2. Descondensació de la cromatina espermàtica.....	43
3.2.1.3. FISH	44
3.2.1.4. Anàlisi microscòpica	44
3.2.1.5. Anàlisi estadística.....	45
3.2.2. FISH en nuclis interfàsics de limfòcits	47
3.2.2.1. Selecció de les sondes per a l'anàlisi de la freqüència d'inversions. 47	
3.2.2.1.1. Obtenció d'estoc dels clons bacterians	48
3.2.2.1.2. Cultiu i selecció dels clons bacterians	48
3.2.2.1.3. Extracció de plasmidis	48
3.2.2.1.4. Marcatge de les sondes	49
3.2.2.2. Selecció de les sondes per a l'anàlisi del mosaïcisme somàtic parental	50
3.2.2.3. FISH	50
3.2.2.4. Anàlisi microscòpica	51
3.2.2.5. Anàlisi estadística.....	52
3.2.3. PCR.....	53
3.2.3.1. Anàlisi de les mostres	55
3.2.4. Seqüenciació de l'exoma	55
3.2.4.1. Elaboració d'un panel de gens implicats en HR	56
3.2.4.2. Anàlisi de l'exoma.....	56
4. Resultats	59
4.1. Mida i origen parental de la deleció 22q11.2	61
4.2. Deleccions i duplicacions en espermatozoides.....	62
4.2.1. Deleccions i duplicacions de la regió 22q11.2.....	62
4.2.2 Deleccions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 15q11-q13	65
4.3. Inversió LCR22-A/LCR22-D.....	67
4.4. Mosaïcisme	70
4.5. Seqüenciació de l'exoma	73
5. Discussió	77

5.1. Mida, origen parental de la deleció i mosaïcisme	79
5.1.1. Mida i origen parental de la deleció.....	79
5.1.2. Mosaïcisme somàtic parental.....	81
5.2. FISH en espermatozoides.....	82
5.2.1. Risc de transmissió.....	82
5.2.2. Tipus de NAHR	83
5.2.3. Avaluació dels factors de predisposició.....	83
5.2.3.1. Inversions	83
5.2.3.2. Edat.....	84
5.2.3.3. Presència de variants gèniques patogèniques.....	85
6. Conclusions.....	93
Annex.....	97
Llistat d'acrònims	107
Llistat de gens.....	109
Bibliografia	111

RESUM

Els trastorns genòmics són malalties causades per alteracions en regions inestables del genoma que afecten a gens sensibles a dosi. L'arquitectura genòmica d'aquestes regions es caracteritza per la presència de regions de còpia única flanquejada per *low-copy repeats*.

Els risc de recurrència dels trastorns genòmics es considera negligible en famílies on ambdós progenitors presenten un cariotip normal i no expressen trets fenotípics compatibles amb el trastorn que afecta a la seva descendència. No obstant, aquesta consideració es basa en estudis epidemiològics que presenten limitacions relacionades principalment amb un poder estadístic reduït degut a l'anàlisi de cohorts formades per poques famílies. A més, les aproximacions epidemiològiques no aprofundeixen en l'estudi dels mecanismes moleculars que causen les delecions (recombinació homòloga no al·lèlica, NAHR), ni determinen si existeixen factors genètics que predisposen a la NAHR.

En aquesta Tesi Doctoral s'ha utilitzat la síndrome de la deleción 22q11.2 com a model d'estudi, per a identificar si, en progenitors amb descendència afecta per trastorns genòmics originats per deleción, existeixen factors que afecten els mecanismes que originen les delecions i que, per tant, incrementen el risc de recurrència i transmissió.

Els resultats obtinguts permeten assegurar que una de cada quatre famílies analitzades presenta un risc de transmissió superior a la mitja poblacional. En concret, en un 4% dels progenitors analitzats vàrem identificar la deleción 22q11.2 en mosaic, fet que incrementa notablement el risc de transmissió en aquests individus. A més, vàrem detectar que un 20% dels pares produeixen més delecions 22q11.2 en espermatozoides, la qual cosa s'ha estimat que incrementa el risc de transmissió entre 3 i 5 vegades respecte al risc basal.

Per altra banda, vàrem investigar, en els progenitors transmissors de la deleción, les causes que poguessin incrementar la susceptibilitat al fenomen de NAHR i incrementar la generació de delecions. Els nostres resultats han posat de manifest que ni l'edat paterna ni la inversió en heterozigosi de la regió 22q11.2 són factors de predisposició. No obstant, vàrem identificar variants de gens implicats en el procés de recombinació meiótica (*BRIP1*, *LIG3*, *PRDM9*, *RECQL5*, *SHOC1*, *TEX19*) que mitjançant anàlisis *in silico* s'han pogut relacionar amb alteracions que predisposen a la NAHR i generen delecions.

En conjunt, l'avaluació dels factors de predisposició a la inestabilitat genòmica de la regió 22q11.2 suggereixen que el risc a la NAHR és complex i atribuïble a la confluència de diferents característiques genètiques. Pel que fa a la projecció clínica



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

dels resultats, les nostres dades indiquen que la valoració del risc de recurrència mitjançant l'anàlisi del grau de mosaïcisme i l'anàlisi de delecions en espermatozoides, aportaria una informació rellevant en l'assessorament genètic reproductiu que reben les famílies amb descendència afectada per trastorns genòmics.



SUMMARY

Genomic disorders are diseases caused by alterations in unstable regions of the genome that affect dose-sensitive genes. The genomic architecture of these regions is characterized by the presence of single-copy regions flanked by low-copy repeats.

The risk of recurrence of genomic disorders is considered negligible in families where both parents present a normal karyotype and do not express phenotypic features compatible with the disorder affecting their offspring. However, this consideration is based on epidemiological studies that present several limitations related to reduced statistical power due to the analysis of cohorts formed by a reduced number of families. In addition, epidemiological approaches do not delve into the study of the molecular mechanisms that cause deletions (nonallelic homologous recombination, NAHR), nor do they determine whether genetic factors predispose to NAHR.

In this Doctoral Thesis, the 22q11.2 deletion syndrome has been used as a study model, to identify whether, in parents with offspring affected by genomic disorders caused by deletion, there are factors that affect the mechanisms which give rise to deletions and which therefore increase the risk of recurrence and transmission.

The results obtained allow us to ensure that one in four families analyzed has a risk of transmission higher than the population average. Specifically, in 4% of the parents analyzed we identified the 22q11.2 deletion in mosaic, which significantly increases the risk of transmission in these individuals. In addition, we found that 20% of parents produce more 22q11.2 deletions in spermatozoa, which has been estimated to increase the risk of transmission by 3 to 5 times the baseline risk.

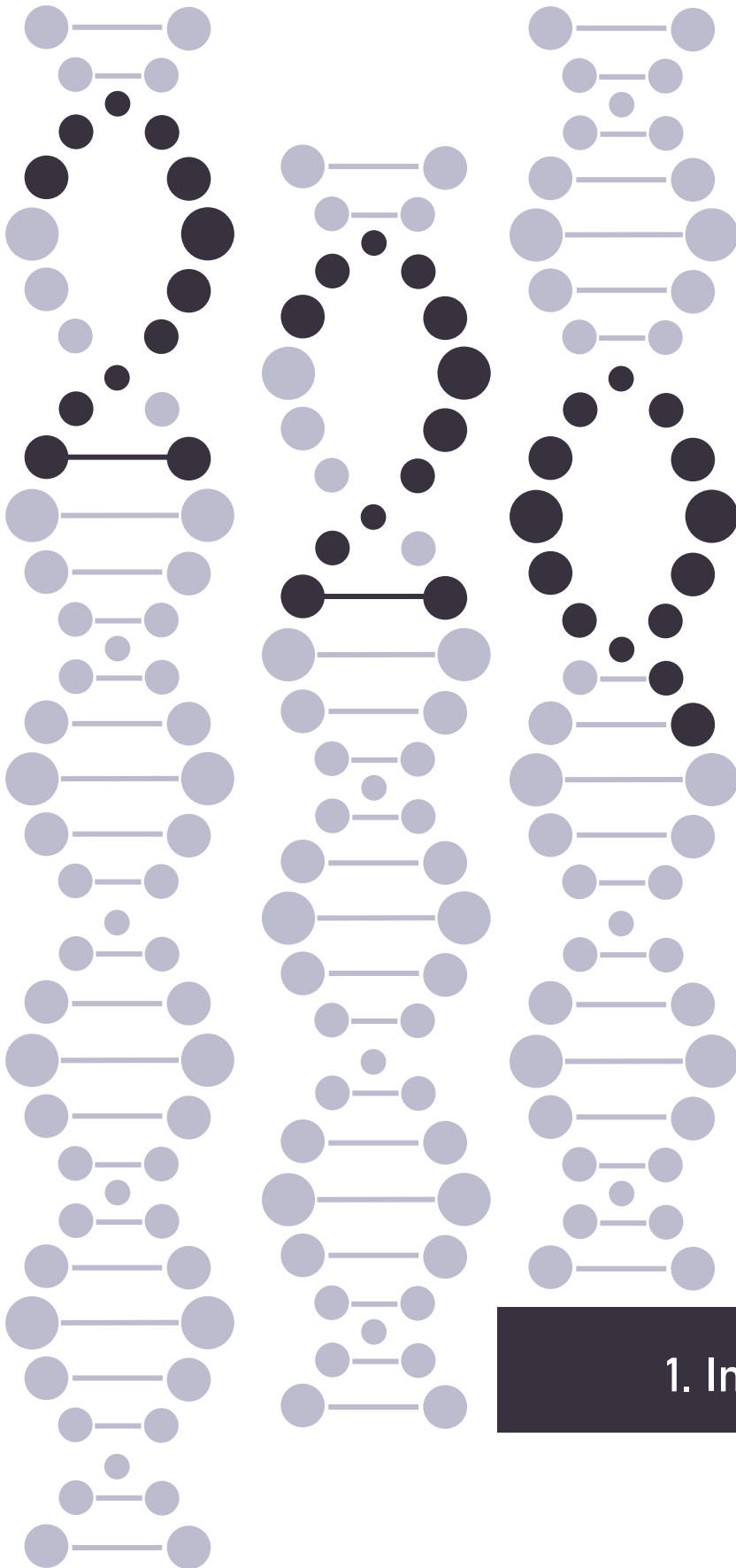
On the other hand, we investigated, in the parents transmitting the deletion, the causes that could increase the susceptibility to the NAHR phenomenon and increase the generation of deletions. Our results have shown that neither paternal age nor inversion in heterozygosity of the 22q11.2 region are predisposing factors. Nevertheless, we identified variants of genes involved in the meiotic recombination process (*BRIP1*, *LIG3*, *PRDM9*, *RECQL5*, *SHOC1*, *TEX19*) that by in silico analysis could be related to alterations that predispose to NAHR and generate deletions.

Taken together, the assessment of predisposing factors for genomic instability in the 22q11.2 region suggests that the risk in NAHR is complex and attributable to the confluence of different genetic traits. Regarding the clinical projection of the results, our data indicate that the assessment of the risk of recurrence by the analysis of the degree of mosaicism and the analysis of sperm deletions would provide relevant



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

information in the reproductive genetic counseling received by families with offspring affected by genomic disorders.



1. Introducció



1.1. TRASTORNS GENÒMICS

Els trastorns genòmics són malalties causades per reorganitzacions cromosòmiques que resulten de la inestabilitat de regions genòmiques específiques (Lupski, 1998, 2009). Compleixen els següents trets generals: (i) s'originen per reordenaments del genoma i no per canvis en la seqüència de nucleòtids, (ii) les regions crítiques presenten una arquitectura genòmica particular, caracteritzada per presentar regions de còpia única flanquejada per *low-copy repeats* (LCR) o duplicacions segmentals (SD), i (iii) afecten a la dosificació de gens i a la variació del número de còpia (CNV).

Majoritàriament s'originen com a conseqüència de delecions o duplicacions de regions concretes del genoma. Segons la seva mida i localització s'identifiquen dos tipus de trastorns genòmics. Els trastorns genòmics recurrents presenten punts de trencaments fixes o agrupats en una posició específica, amb una mida de la reorganització estable (Taula 1). En canvi, en els trastorns genòmics no recurrents la mida de la reorganització no és sempre la mateixa ja que els punts de trencament són variables (Gu et al., 2008).

1.1.1. ARQUITECTURA GENÒMICA DE LES REGIONS IMPLICADES EN TRASTORNS GENÒMICS RECURRENTS

La presència de LCR a la part proximal i distal de les regions crítiques és la característica arquitectònica comuna de les regions implicades en trastorns genòmics recurrents.

Els LCR són blocs de seqüències repetitives de DNA d'entre 1 i 500 Kb que es localitzen en dues o més regions del genoma i tenen una homologia superior al 90%. Es poden orientar de forma directa o invertida i segons la seva localització es diferencien els LCR pericentromèrics, subtelomèrics i intersticials. En quant a la seva composició, poden contenir gens, pseudogens, motius de recombinació i seqüències de DNA repetitiu (Bailey et al., 2002; Bailey et al., 2006; Dittwald et al., 2013a). La presència de motius de recombinació i l'elevat grau d'homologia entre les còpies paràlogues facilita el procés de recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR) que promou la inestabilitat cromosòmica de les regions riques en LCR (Lupski, 2004; Myers et al., 2008).



Taula 1. Trastorns genòmics recurrents més freqüents (llistat adaptat de Harel & Lupski, 2018).
Incidència obtinguda de la base de dades Orphanet (<https://www.orpha.net>)

Síndrome	Causa	Locus	OMIM ^a	Incidència
Síndrome de la deleció 1p36	deleció	1p36	607872	1:5.000
Síndrome de TAR ^b	deleció	1p21.1	274000	1:100.000
Síndrome de Wolf-Hirschhorn	deleció	4p16.3	194190	1:50.000
Síndrome de Cri du Chat	deleció	5p15	123450	1:15.000
Síndrome de Sotos	deleció	5q35	117550	1:14.000
Síndrome de Williams-Beuren	deleció	7q11.23	194050	1:20.000
Síndrome de Jacobsen	deleció	11q	147791	1:50.000
Síndrome de Prader-Willi	deleció	15q11-q13	176270	1:15.000
Síndrome d'Angelman	deleció	15q11-q13	105830	1:10.000
Síndrome de la microdeleció proximal 16p11.2	deleció	16p11.2	611913	1:5.000
Síndrome de Rubinstein-Taybi	deleció	16p13.3	180849	1:100.000
Síndrome de Smith-Magenis	deleció	17p11.2	182290	1:15.000
Síndrome de Potocki-Lupski	duplicació	17p11.2	610883	1:25.000
Síndrome de HNPP ^c	deleció	17p12	162500	1:6.250
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A	duplicació	17p12	118220	1:5.000
Síndrome de Miller-Dieker	deleció	17p13.3	247200	1:100.000
Síndrome de la microdeleció NF1 ^d	deleció	17q11.2	613675	-
Síndrome de Koolen-De-Vries	deleció	17q21.31	610443	1:55.000
Síndrome de la deleció 22q11.2	deleció	22q11.2	192430	1:4.000

^a Codi del trastorn genòmic a la base de dades OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*)

^b TAR: trombocitopènia-aplàsia radial

^c HNPP: neuropatia hereditària amb susceptibilitat a la paràlisi per pressió

^d NF1: neurofibromatosi tipus 1

1.1.2. CAUSA DELS TRASTORNS GENÒMICS RECURRENTS

Els trastorns genòmics recurrents s'originen majoritàriament per fenòmens de NAHR quan els trencaments de doble cadena (DSB) es reparen mitjançant el model de reparació de la doble unió de *Holliday*. S'estima que la NAHR contribueix a la formació del 22% de les variacions estructurals presents en el genoma humà (Kidd et al., 2010). Quan aquest fenomen es produeix a meïosi, origina gàmetes portadors



d'alteracions cromosòmiques que poden ser transmeses a la descendència i causar un trastorn genòmic (Liu et al., 2011; Sasaki et al., 2010).

El model de la doble unió de *Holliday* requereix la presència de regions homòlogues que actuïn com a motlle per a restaurar la seqüència original de DNA quan es produeix un DSB generat per SPO11 (Figura 1A). Una vegada s'elimina SPO11 dels extrems del DNA, s'inicia el reconeixement del DSB per part del complex MRN, que conté les proteïnes MRE11, RAD50 i NBS1 (Figura 1B). Aquest complex participa en el processament inicial dels DSB degut a la seva activitat exonucleasa i a la seva capacitat d'unió al DNA. (Uziel et al., 2003). L'acció del complex MRN origina extrems 3'OH protuberants de DNA monocatenari (ssDNA) al qual s'uneixen les recombinases i proteïnes d'intercanvi de cadena de DNA, RAD51 i DMC1 (Figura 1C). Aquestes s'uneixen al ssDNA i cerquen DNA de doble cadena (dsDNA) complementari a la molècula de DNA homòloga. Les recombinases promouen la invasió del ssDNA, es separen les cadenes de la seqüència donadora i es genera una estructura intermediària anomenada *D-loop* o llaç de desplaçament. Posteriorment, es sintetitza el DNA utilitzant aquesta cadena com a motlle (Figura 1D) (Sansam et al., 2015; Sasaki et al., 2010).

Així doncs, seguint la via de reparació canònica, la captura del segon extrem 3', la síntesi i la lligació del DNA generen unions *Holliday* (HJ) que flanquegen el lloc on s'ha produït el DSB (Figura 1E). Les estructures en forma de creu de les HJ es poden resoldre tallant i reunint les monocadenes externes (no es creuen) o les cadenes internes (es creuen) (Figura 1F). Quan les HJ es resolen en orientacions oposades origina molècules recombinants (CO) (Figura 1G); en canvi, quan la resolució d'ambdues HJ es produeix en la mateixa orientació es formen molècules no recombinants (NCO) (Figura 1H) (Heyer, 2004; Sasaki et al., 2010).



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

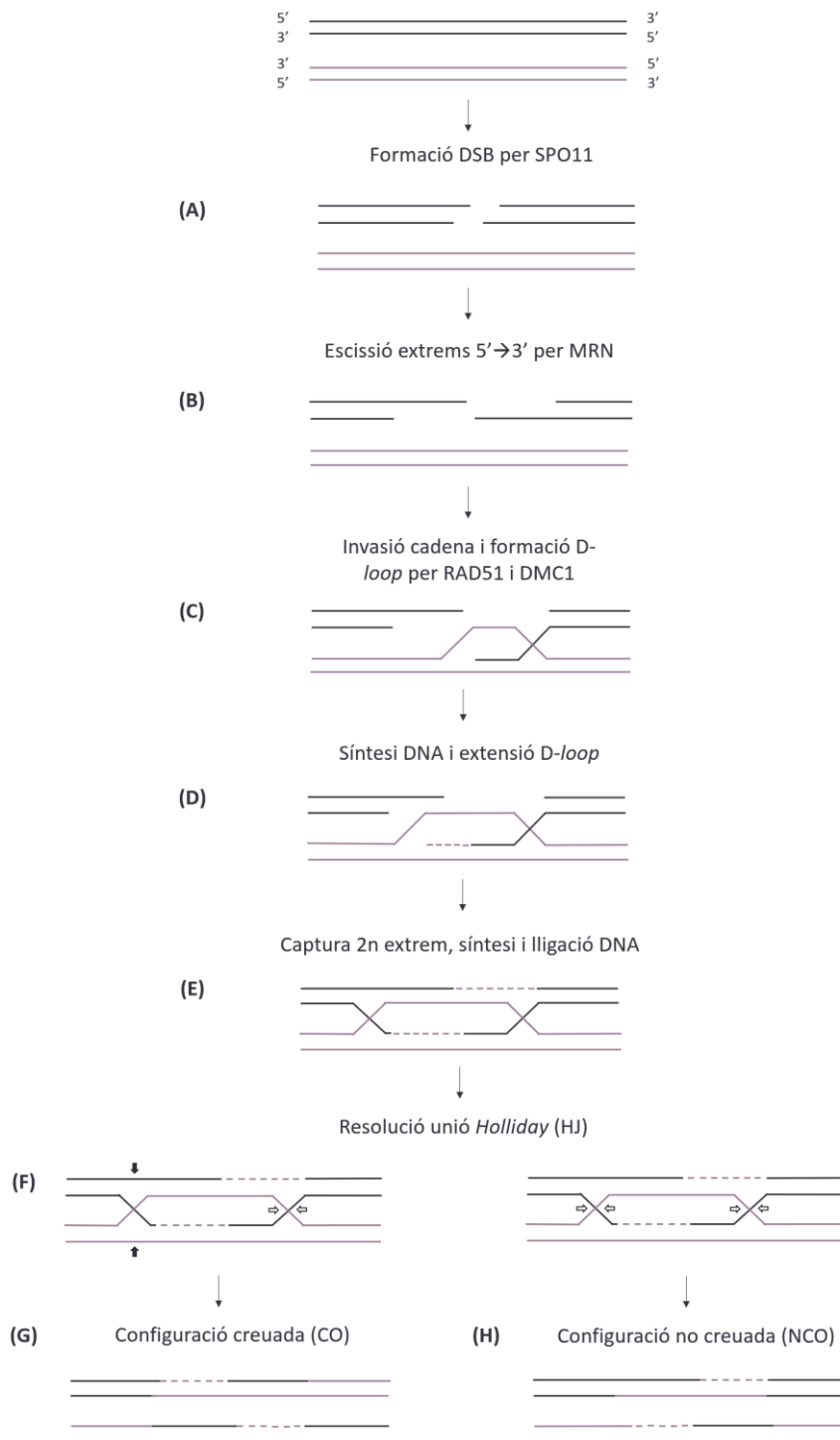


Figura 1. Via de reparació de trencaments de doble cadena mitjançant el model de la doble unió Holliday. Adaptació de Sasaki et al., 2010

Convé ressaltar que si aquestes estructures no es processen correctament, les cèl·lules mostren alts nivells de dany en el DNA i inestabilitat cromosòmica (Sarbjana & West, 2014). En aquest sentit, quan els DSB es produeixen en LCR la cerca d'homologia pot realitzar-se en còpies homòlogues o paràlogues. La reparació amb còpies homòlogues produeix molècules recombinants sense alteracions. En canvi, la utilització de còpies paràlogues pot conduir a una reparació no al·lèlica i produir productes recombinants portadors d'anomalies cromosòmiques (Figura 2).

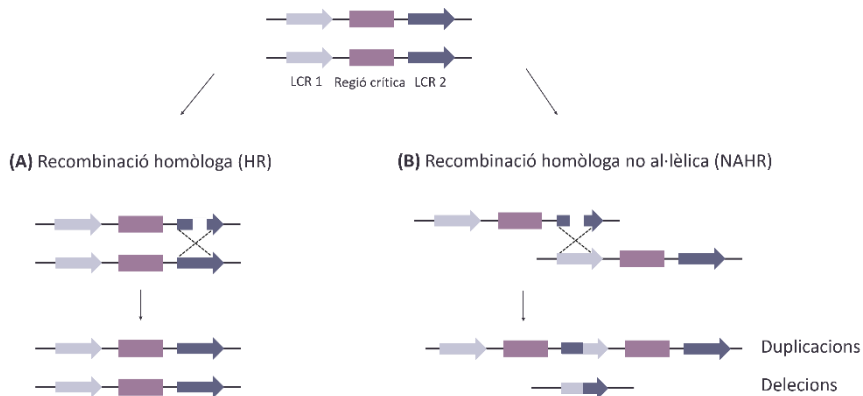


Figura 2. Reparació mitjançant el model de la doble unió *Holliday* d'un DSB produït en un LCR que flanqueja una regió de còpia única. (A) La HR no genera molècules amb alteracions. (B) La NAHR genera molècules amb segments de còpia única duplicats o deletionats

En aquest sentit, en funció de l'orientació dels LCR implicats i de la seva localització cromosòmica, els processos de NAHR entre LCR originen diferents tipus de reorganitzacions estructurals (Figura 3).

En el cas que la NAHR es produeixi entre LCR orientats de forma directa entre cromàtides homòlogues o cromàtides germanes es generaran deleccions i duplicacions complementàries. En canvi, si es produeix entre cromosomes no homòlegs es generaran translocacions. Per altra banda, la NAHR entre LCR localitzats en la mateixa cromàtide generarà deleccions i anells acèntrics. En el cas que la NAHR es produeixi entre LCR orientats de forma indirecta entre dues cromàtides homòlogues, el resultat seran cromosomes dicèntrics i fragments acèntrics portadors de deleccions i duplicacions. Però si es produeix entre cromàtides no homòlogues, es generaran translocacions dicèntriques i acèntriques. Altrament, si els LCR es localitzen en la mateixa cromàtide, els productes resultants seran inversions (Figura 3) (Dittwald et al., 2013a; Gu et al., 2008; Liu et al., 2012; Ou et al., 2011).

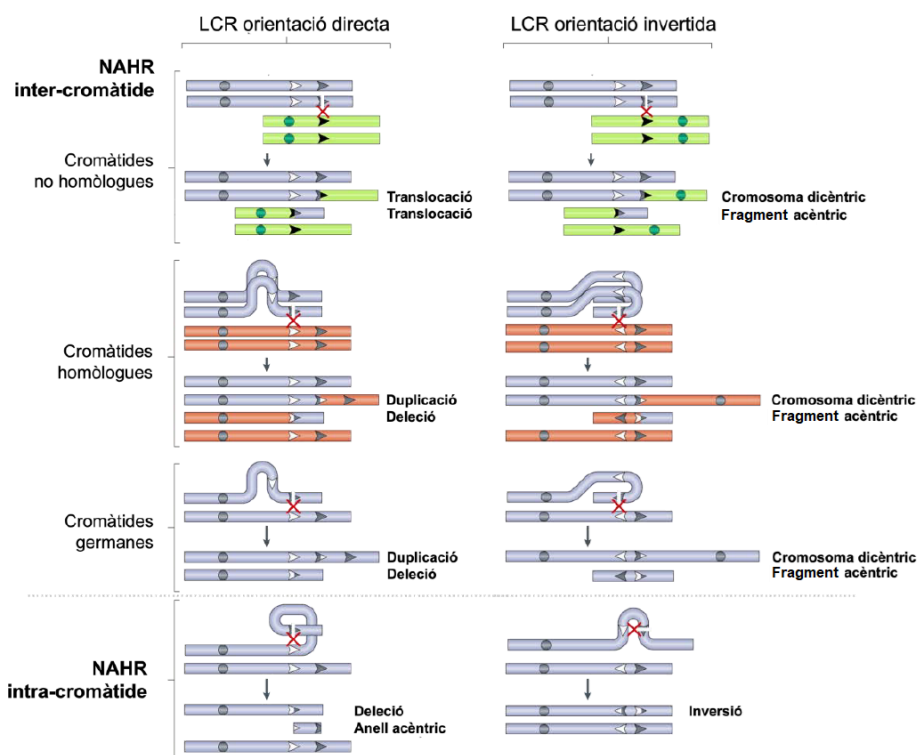


Figura 3. Diferents productes de la NAHR segons la localització i orientació dels LCR (Vergés Torrella, 2016)

1.1.3. RISC DE RECURRÈNCIA

Estudis epidemiològics estableixen que el risc de recurrència dels trastorns genòmics en parelles amb un fill/a afecte/a és equivalent al de la població general, i s'estableix en un 0,5% en els casos en què ambdós progenitors presenten fenotip i cariotip normal (McKinlay Gardner et al., 2011). Aquests estudis, però, tenen certes limitacions com les mides mostrals limitades degudes a la baixa incidència de les síndromes, i el fet que les famílies amb un fill/a afecte/a poden decidir no tenir més descendència (Röthlisberger & Kotzot, 2007).

Una alternativa per a valorar el risc de recurrència de trastorns genòmics són els estudis en gàmetes en progenitors d'individus afectes. La determinació de la freqüència d'anomalies cromosòmiques en gàmetes permetria analitzar la freqüència en què es produeixen les reorganitzacions cromosòmiques originades per NAHR i, per tant, inferir el risc de transmissió. Aquests tipus d'estudis són difícils d'abordar en oòcits per raons metodològiques i de mostreig (nombre de cèl·lules que poden ser analitzades, limitacions legals i aspectes ètics). En canvi, l'estudi dels espermatozoides no planteja aquestes limitacions i permet analitzar un elevat



nombre de cèl·lules i establir les freqüències de les reorganitzacions cromosòmiques produïdes per la NAHR de forma individual (Molina et al., 2011).

La quantificació dels fenòmens de NAHR en espermatozoides humans, amb la finalitat de determinar la freqüència de delecions i duplicacions de les regions implicades en trastorns genòmics, s'ha realitzat mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa a temps real (qPCR) i la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH).

Per un costat, amb la tècnica de qPCR es realitza d'un disseny de *primers* situats a banda i banda dels punts calents de recombinació descrits als LCR que flanquegen la regió crítica. L'anàlisi de les seqüències resultants permet diferenciar entre haplotips normals i haplotips portadors de delecions o duplicacions. Aquesta tècnica s'ha aplicat satisfactòriament en la determinació de la freqüència basal de NAHR per a les regions 7q11.23, corresponent a la síndrome de Williams-Beuren, o 17p12, corresponent a la síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A, entre d'altres (Turner et al., 2008). El fet que el disseny de *primers* es basi en punts calents de recombinació específics limita la identificació dels productes de NAHR als generats únicament per aquestes regions. Com s'ha mencionat anteriorment, l'elevada homologia entre les còpies paràlogues dels LCR i la presència de motius de recombinació en els LCR fomenta la inestabilitat cromosòmica i la generació dels diferents punts calents de recombinació. Això provoca que la posició dels punts de trencaments que originen les reorganitzacions cromosòmiques variï.

La tècnica de FISH es basa en la utilització d'una sonda de DNA que permet avaluar la presència o absència de la regió crítica, objecte d'estudi, a partir del recompte del nombre de senyals d'hibridació en el nucli interfàsic. És a dir, permet la identificació de la presència o absència de la regió implicada en les reorganitzacions cromosòmiques, independentment de la localització del punt de trencament que les ha originat. A més, permet l'anàlisi de les mostres de forma individual i assolir mides mostrals prou elevades que garanteixen la validesa dels resultats. Aquesta tècnica s'ha aplicat en l'estudi de poblacions control per a determinar la freqüència basal de reorganitzacions cromosòmiques originades per NAHR (Molina et al., 2010), però també ha permès observar freqüències incrementades d'espermatozoides portadors de delecions i duplicacions de la regió crítica en progenitors transmissors de la síndrome de Prader-Willi (Molina et al., 2011) o de la deleción 22q11.2 (Vergés et al., 2014). És a dir, aquests estudis han permès determinar que la recurrència dels trastorns genòmics podria no ser aleatòria i, per tant, superior al 0,5% en alguns progenitors.

El risc de recurrència també es pot veure incrementat en casos mosaïcisme en el progenitor transmissor per a la reorganització que origina el trastorn genòmic a la descendència (Driscoll et al., 1993). La presència de cèl·lules germinals portadores d'anomalies en heterozigosi incrementaria el risc de recurrència de forma



proporcional al grau de mosaïcisme identificat. Segons un estudi de Campbell, el 4% dels progenitors amb descendència afectada per trastorns genòmics recurrents presenten mosaïcisme per la reorganització transmesa (Campbell et al., 2014).

S'ha descrit mosaïcisme parental en casos de recurrència familiar de la síndrome de la deleció 14q11-q22 (Liu et al., 2018), de la deleció 22q11.2 (Chen et al., 2019; Demaerel et al., 2016; Kasprzak et al., 1998; Sandrin-Garcia et al., 2002), d'Angelman (Sánchez et al., 2014), de Smith-Magenis (Campbell et al., 2014) o de Koolen-de Vries (Koolen et al., 2012).

1.1.4. FACTORS DE PREDISPOSICIÓ

En diferents trastorns genòmics s'han identificat factors que poden fomentar la formació d'aparellaments no al·lèlics i promoure la NAHR. Aquests factors poden actuar sobre locus específics produint un efecte local (efecte en *cis*), o presentar variacions constitucionals amb un efecte global sobre la recombinació (efecte en *trans*). La presència de reorganitzacions cromosòmiques en gàmetes degut a factors de predisposició de la NAHR incrementaria el risc de recurrència en famílies amb descendència afectada per un trastorn genòmic.

1.1.4.1. EDAT

En humans, la inestabilitat genòmica associada amb l'edat es relaciona preferentment a homes, atès l'elevada taxa de proliferació mitòtica que presenten els espermatogonis en l'home adult. Tot i que és difícil determinar un punt de tall, alguns estudis suggereixen que a partir dels 40 anys comencen a ser més pronunciats els riscos genètics reproductius (Colasante et al., 2018; Du Fossé et al., 2020; Ramasamy et al., 2015; Rosiak-Gill et al., 2019; Sartorius & Nieschlag, 2009).

Des de l'entrada a la pubertat, les cèl·lules mare espermatogèniques es divideixen constantment, fet que pot ocasionar un augment de la probabilitat d'errors de replicació del DNA i resultar en una acumulació de mutacions *de novo* (Crow, 2000; Kong et al., 2012), que es pot veure agreujat pel deteriorament dels mecanismes de reparació del DNA a mesura que s'incrementa l'edat (Wiener-Megnazi et al., 2012). A més a més, s'ha demostrat que homes més grans presenten majors nivells de fragmentació del DNA dels espermatozoides en comparació amb homes més joves (Plastira et al., 2007; Schmid et al., 2013; Wyrobek et al., 2006) i que poden ser més susceptibles a l'atac oxidatiu i més propensos a errors durant l'espermatogènesi (Rosiak-Gill et al., 2019).

Pel que fa a la relació entre anomalies cromosòmiques espermatiques i edat, els resultats són contradictoris. Alguns estudis indiquen una relació entre ambdues variables (Asada et al., 2000; Bosch et al., 2003; Slotter et al., 2007). Slotter suggereix



que l'acumulació d'alteracions estructurals que succeeixin en la línia germinal al llarg de l'edat reproductiva de l'home incrementaria la probabilitat de generar espermatozoides amb delecions i/o duplicacions en homes d'edat avançada (Sloter et al., 2007). No obstant, altres autors consideren que l'edat no té un pes important per manca d'indicis consistents (Brandt et al., 2019; Buizer-Voskamp et al., 2013; Delio et al., 2013; Kurahashi & Emanuel, 2001; Plastira et al., 2007; Rivera et al., 2013; Sibbons et al., 2011). En el cas concret del fenomen de la NAHR, no s'ha trobat una associació entre l'edat i la generació de delecions i duplicacions espermàtiques causades per aquest mecanisme (MacArthur et al., 2014; Vergés et al., 2014).

1.1.4.2. INVERSIÓ DE LA REGIÓ CRÍTICA

S'ha observat una major incidència d'inversions en heterozigosi de les regions crítiques en progenitors de descendència afecta per alguns trastorns genòmics causats per microdelecions. Una bona mostra són la síndrome de Williams-Beuren (Hobart et al., 2010; Osborne et al., 2001; Scherer et al., 2005), d'Angelman (Gimelli et al., 2003), de Smith-Magenis (Yang, Bidichandani, et al., 1997) i de la delecio 17q21.31 (Rao et al., 2010; Vlckova et al., 2014), entre d'altres (Antonacci et al., 2010).

L'explicació a aquest fenomen seria que la presència d'una inversió en heterozigosi produiria una regió desaparellada entre el cromosoma portador de la inversió i el seu homòleg normal durant l'etapa de paquitè. Aquest fet incrementaria la probabilitat d'un aparellament no al·lèlic dels LCR flanquejants de la regió crítica, per la qual cosa es fomentarien els esdeveniments de la NAHR. El resultat final seria la formació de gàmetes amb reorganitzacions secundàries, com delecions i duplicacions (Feuk, 2010). A més, la susceptibilitat de la regió invertida per generar aquestes reorganitzacions vindria determinada per la mida de la inversió, la densitat de punts calents de recombinació i la presència de regions repetitives flanquejants (Torgasheva & Borodin, 2010).

En la SD22q11.2 no s'ha descrit la presència de la inversió entre els LCR implicats en la delecio majoritària (Gebhardt et al., 2003; Saitta et al., 2004; Vergés et al., 2017; Vervoort et al., 2019). No obstant, sí que s'han descrit altres inversions que predisposaven una inestabilitat del genoma, generant reorganitzacions secundàries (translocacions) (Gotter et al., 2007) i delecions 22q11.2 atípiques (Vervoort et al., 2019).

1.1.4.3. VARIACIONS DELS LCR

S'ha descrit que un dels factors que condiciona la freqüència de la NAHR està relacionat amb la longitud dels LCR, el seu grau d'homologia i la densitat de motius de recombinació que presenten (Dittwald et al., 2013b; Peng et al., 2015). Segons



Liu, les variacions en la longitud dels LCR poden afavorir contactes presinàptics entre regions pròximes que presenten una alta homologia, actuant com a precursors de la NAHR (Liu et al., 2011).

En alguns trastorns genòmics s'ha observat CNV dels LCR flanquejants de la regió crítica. En el cas de la síndrome de Williams-Beuren, causada per una deleció a la regió 7q11.23, Cusco va descriure un percentatge superior de delecions i duplicacions del gen *NCF1* que es localitza al bloc B dels LCR del cromosoma 7, suggerint que els CNV induïen la NAHR. Per consegüent, els progenitors portadors d'aquests CNV tenien major risc de transmetre la deleció 7q11.23 a la seva descendència (Cusco et al., 2008).

En la síndrome de Smith-Magenis, causada per una deleció de la regió 17p11.2, també s'ha descrit CNV dels LCR REPA i REPB. Carvalho i Lupski van apuntar que la susceptibilitat de les reorganitzacions on el punt de trencament es localitza a la regió crítica es troba influïda per l'arquitectura genòmica dels LCR REPA i REPB (Carvalho & Lupski, 2008).

Un altre exemple són els LCR S1 i S2 implicats en la síndrome de la deleció 16p12.1. Aquests mostraven dues arquitectures genòmiques diferents en orientació i repetició de blocs de LCR. Per una banda, el LCR S1 tenia una configuració protectora de la deleció de la regió crítica. En canvi, la configuració de S2 predisposava a les delecions de 16p12.1 (Antonacci et al., 2010).

En la SD22q11.2 s'han observat variacions del número de còpies dels gens *AK129567* i *AK302545*, localitzats entre els LCR22-A i LCR22-D, en pares transmissors que presentaven un increment d'espermatozoides portadors de delecions de la regió crítica (Vergés et al., 2017). Per consegüent, es va postular que els DSB produïts en seqüències contigües tindrien una probabilitat més elevada de generar esdeveniments de NAHR i originar gàmetes portadors de reorganitzacions.

1.1.4.4. VARIANTS GÈNIQUES

La presència de variants gèniques que afectin a la recombinació homòloga (HR) podria alterar aquest procés i afavorir esdeveniments de NAHR. En un estudi, Sasaki apuntava que la presència de variants gèniques podria produir la fallada dels mecanismes que eviten la NAHR. Per exemple, variants de *RAD51* o *DMC1* podrien alterar l'activitat de les helicasas que participen en les HJ, o variants de *PMS1* o *MSH2* podrien comprometre la reparació de nucleòtids desparellats (Sasaki et al., 2010).

Un gen clau en la regulació de la recombinació meiótica és *PRDM9*, ja que determina el patró de recombinació meiótica a través del reconeixement de seqüències motiu i del reclutament de la maquinària de generació dels DSB. Aquest



gen és altament polimòrfic i alguns autors han indicat que la presència de diferents al·lels modularia la recombinació meiótica esdevenint un factor de predisposició per a trastorns genòmics. És el cas de la síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A (Berg et al., 2010), la síndrome de Williams-Beuren (Borel et al., 2012), o la SD22q11.2 (Vergés et al., 2017), on s'han observat variants de *PRDM9* que podrien predisposar a generar gàmetes portadors de les reorganitzacions causants d'aquestes síndromes. No obstant, no en totes les variants gèniques de *PRDM9* s'ha descrit aquest efecte, ja que en altres síndromes, com la síndrome de Prader-Willi, no s'ha observat aquest factor de predisposició (Borel et al., 2012).

Per altra banda, altres autors han apuntat que les variants gèniques de *RNF212* podrien influir en les taxes de recombinació (Chowdhury et al., 2009; Fledel-Alon et al., 2011; Kong et al., 2008). Aquest gen participa en la localització dels punts de recombinació i estabilitza els factors de recombinació específics de la meiosi. També és necessari per acoblar la sinapsi cromosòmica a la formació de complexos de recombinació específics del creuament.

1.2. LA SÍNDROME DE LA DELECCIÓ 22q11.2 COM A MODEL D'ESTUDI

Els LCR no es troben distribuïts de manera uniforme per tot el genoma, és a dir, no tots els cromosomes presenten el mateix percentatge de LCR. El cromosoma Y presenta la proporció més elevada (50,4%), seguit del cromosoma 22 (11,9%), i a la cua es situa el cromosoma 3 amb el percentatge més baix (1,7%). En general, els cromosomes 7, 9, 10, 15, 16, 17, 22, X i Y presenten una densitat superior de LCR (>5%). En canvi, els cromosomes 3, 6, 8, 12 i 14 són els que presenten una densitat més baixa (<2%) (Zhang et al., 2005).

Així doncs, el cromosoma 22 és el segon cromosoma amb una proporció més elevada de LCR. Concretament, se n'han descrit 8, localitzats a la regió 22q11.2: LCR22-A, LCR22-B, LCR22-C, LCR22-D, LCR22-E, LCR22-F, LCR22-G i LCR22-H (Figura 4) (Babcock et al., 2007; She et al., 2004; Stankiewicz & Lupski, 2002).



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

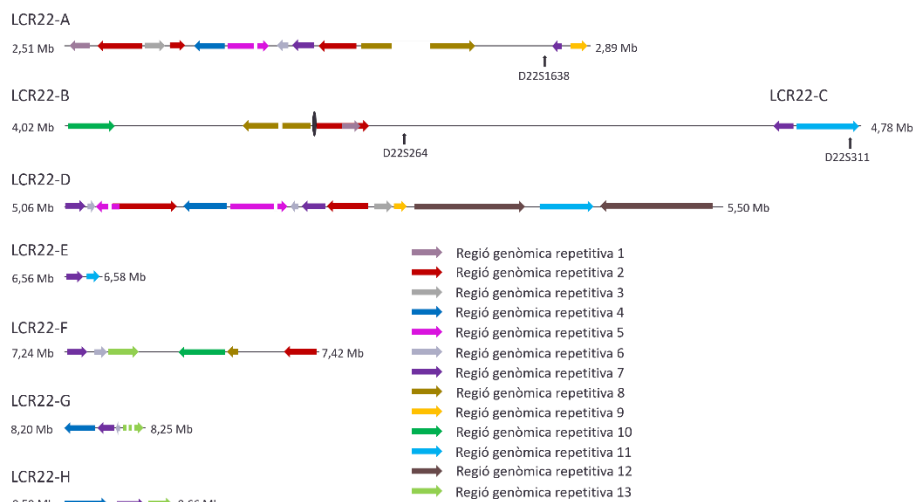


Figura 4. Mida, sentit i homologia dels LCR de la regió 22q11.2. Adaptació de Dunham et al., 1999

L'elevat nombre de LCR22 fa que la regió pericentromèrica del cromosoma 22 sigui especialment susceptible a diferents reorganitzacions cromosòmiques recurrents. Aquestes reorganitzacions poden produir l'alteració de gens sensibles a dosi i originar diverses síndromes com la síndrome de la deleció 22q11.2, la síndrome de l'ull de gat o la síndrome d'Emanuel (Emanuel, 2008; Gotter et al., 2007).

La síndrome de la deleció 22q11.2 (SD22q11.2), és un dels trastorns genòmics més freqüents en humans. Els individus afectes presenten una deleció en heterozigosi de la regió 22q11.2 i presenta una incidència de 1 de cada 4.000 nounats (Botto et al., 2003; Devriendt et al., 1998; Goodship et al., 1998) i 1 de cada 1.000 fetus (Grati et al., 2015; Wapner et al., 2012).

La deleció majoritària comprèn una regió de còpia única de 3 Mb situada entre els LCR22-A i LCR22-D i es produeix en aproximadament el 85% dels casos. La similitud entre aquests LCR és major respecte la resta de LCR22 (Figura 4), ja que comparteixen gairebé la mateixa estructura de blocs de SD i mostren una identitat del 97-98% (Babcock et al., 2003; Shaikh et al., 2000).

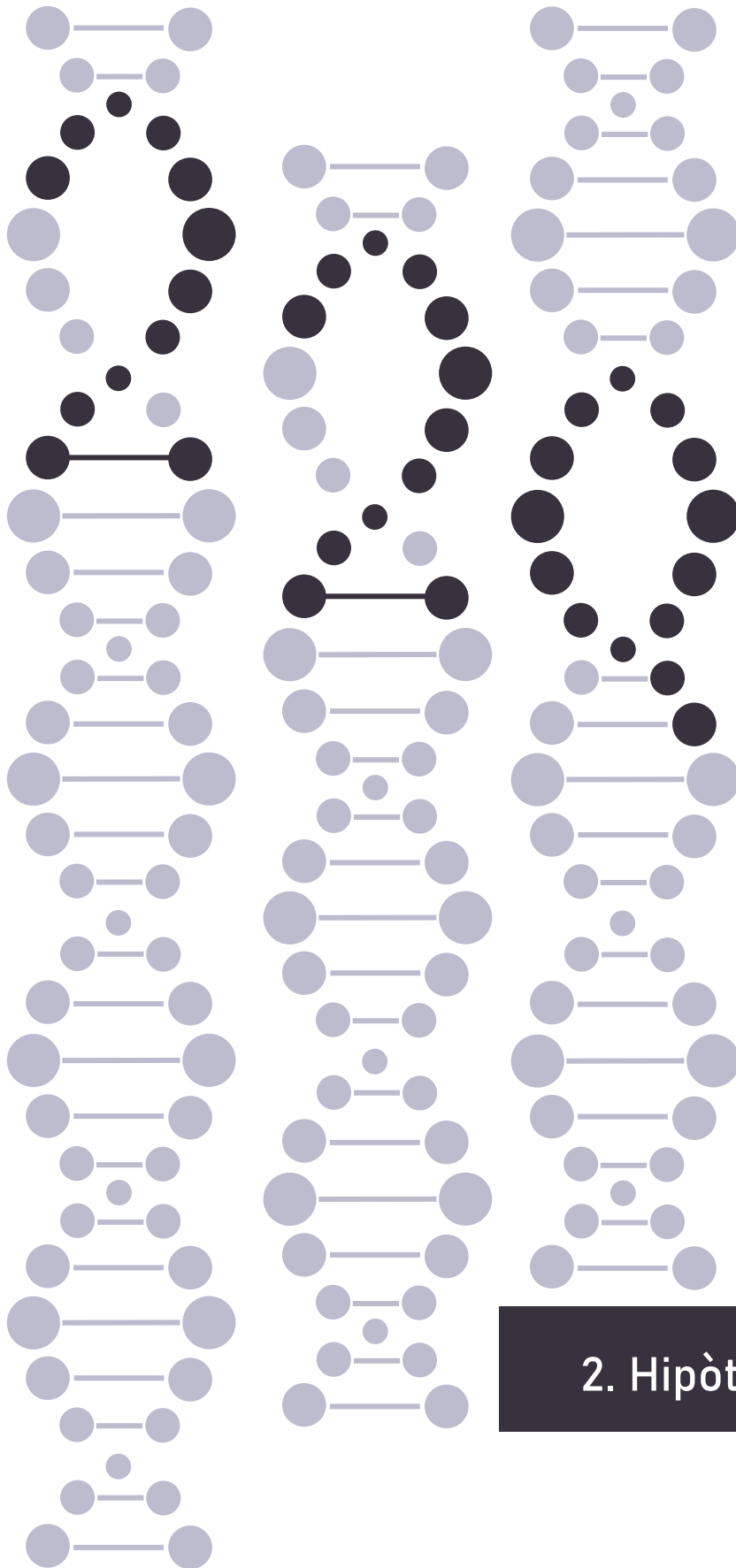
Al voltant del 7% dels casos s'originen per una deleció menor, de 1,5 Mb, produïda entre els LCR22-A i LCR22-B (Carlson et al., 1997). En la resta de casos es produeixen delecions minoritàries entre els LCR22 més distals (Garcia-Miñaur et al., 2002; Tan et al., 2011; Verhagen et al., 2012).

Les delecions en heterozigosi de la regió 22q11.2 comporten la pèrdua d'una còpia del gen *TBX1* (factor de transcripció implicat en la regulació de diferents processos del desenvolupament) i del gen *TUPLE1* o *HIRA* (xaperona d'histones que



participa en el posicionament de la variant d'histona H3.3 en els nucleosomes). L'haploinsuficiència d'aquests gens s'associa amb un fenotip amb anomalies del paladar, defectes cardíacs congènits, trets craniofacials distintius, dificultat d'aprenentatge, dèficit cognitiu i morbiditat psiquiàtrica (McDonald-McGinn et al., 2015). En un primer moment, es van descriure diferents síndromes, com la síndrome de DiGeorge, Velocardiofacial o CATCH-22. No obstant, degut a les diferents delecions que hi ha, totes aquestes síndromes es consideren part de l'espectre de la mateixa condició i es coneixen per la seva etiologia cromosòmica, la delecio de la regió 22q11.2 (Garcia-Miñaur et al., 2002; McDonald-McGinn & Zackai, 2008).

La riquesa de LCR de la regió 22q11.2 i l'elevada incidència de la SD22q11.2, la fan ideal per a utilitzar-la com a model d'estudi en l'anàlisi de diferents factors de predisposició en progenitors transmissors de la delecio.



2. Hipòtesi i objectius



2.1. HIPÒTESI DE TREBALL

Els progenitors d'individus afectes de la síndrome de la deleció 22q11.2 presenten elements reguladors de la recombinació homòloga no al·lèlica en *cis* o en *trans* sobre la regió 22q11.2 que incrementen la susceptibilitat a generar delecions durant la gametogènesi.

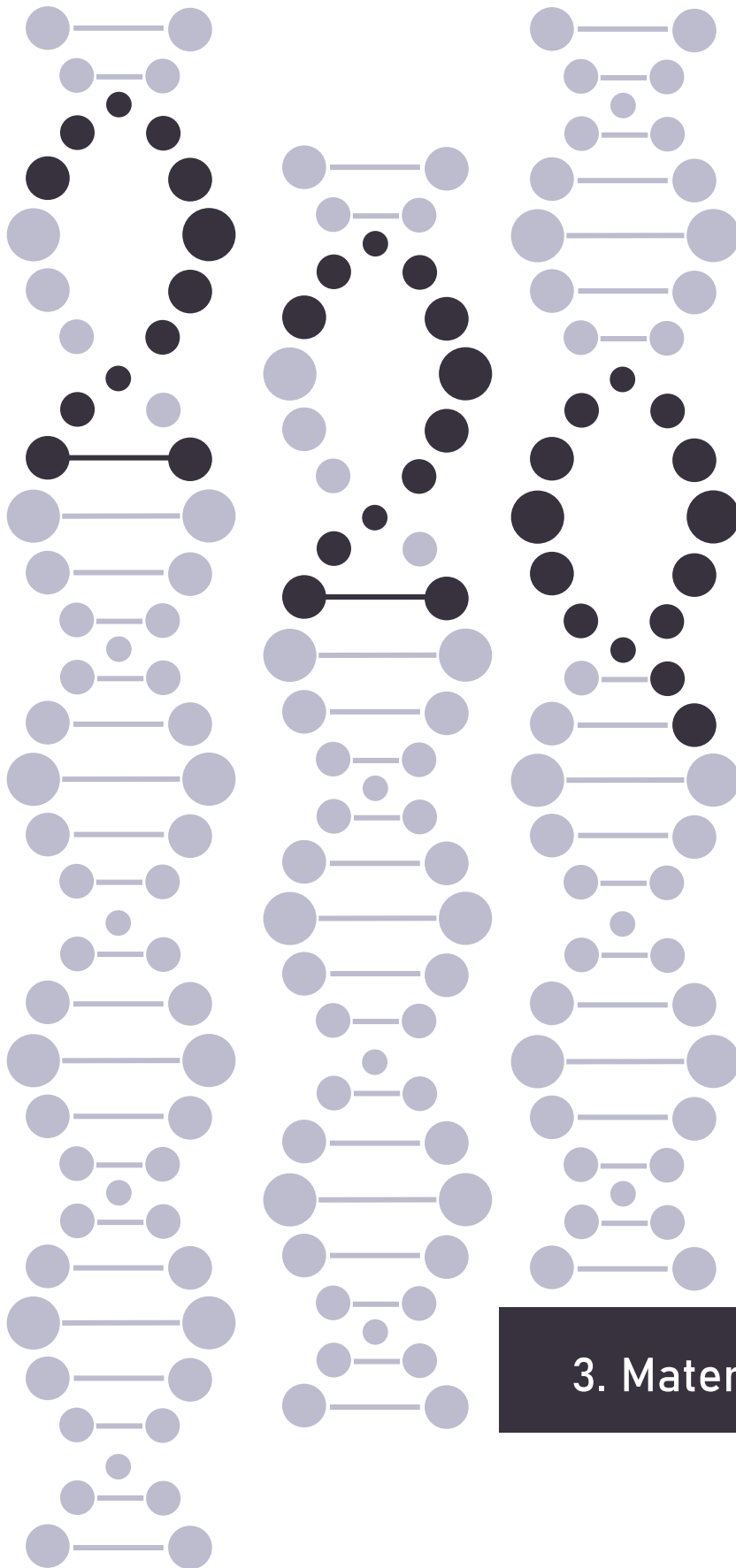
2.2. OBJECTIUS

2.2.1. OBJECTIU GENERAL

Identificar els factors genètics que incrementen el risc de recombinació homòloga no al·lèlica de la regió 22q11.2 i les seves conseqüències sobre el risc de transmissió de la síndrome de la deleció 22q11.2.

2.2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Determinar l'origen parental de la deleció 22q11.2 en la descendència afectada i avaluar l'existència de diferències en la taxa de transmissió entre progenitors.
2. Caracteritzar el grau de mosaïcisme somàtic per la deleció de la regió 22q11.2 en progenitors d'individus afectes de la síndrome de la deleció 22q11.2.
3. Determinar la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides de progenitors d'individus afectes de la síndrome de la deleció 22q11.2.
4. Determinar la freqüència d'haplotips amb inversió 22q11.2 en limfòcits de progenitors d'individus afectes de la síndrome de la deleció 22q11.2.
5. Determinar l'efecte de l'edat paterna en la formació de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2.
6. Identificar variants de gens implicats en el procés de recombinació en progenitors d'individus afectes de la síndrome de la deleció 22q11.2 i avaluar la seva associació amb processos de recombinació homòloga no al·lèlica.



3. Materials i mètodes

3.1. MOSTRES BIOLÒGQUES I PROCESSAMENT

En el desenvolupament d'aquest projecte de tesi es van analitzar mostres biològiques procedents de 29 famílies amb un fill/a afectat/da per la SD22q11.2. Les famílies van ser contactades i seleccionades pel personal mèdic de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona i l'Hospital Parc Taulí de Sabadell.

Tots els individus van ser informats dels protocols d'estudi i van manifestar la voluntat de participar amb la signatura d'un consentiment informat. El comitè d'ètica de cada centre hospitalari va aprovar els protocols d'estudi necessaris per a la consecució dels objectius establerts al projecte de recerca.

Per a cadascuna de les famílies participants es va recollir una mostra de sang perifèrica en heparina sòdica (pare i mare) i una mostra de sang perifèrica en EDTA (pare i mare), i una mostra de semen (pare). Tanmateix, els centres col·laboradors van subministrar una mostra de DNA genòmic del fill/a afecte/a.

Les mostres biològiques es van processar i caracteritzar genèticament d'acord amb els protocols d'anàlisi que es detallen a les següents seccions i que es presenten de forma resumida a la [Figura 5](#).

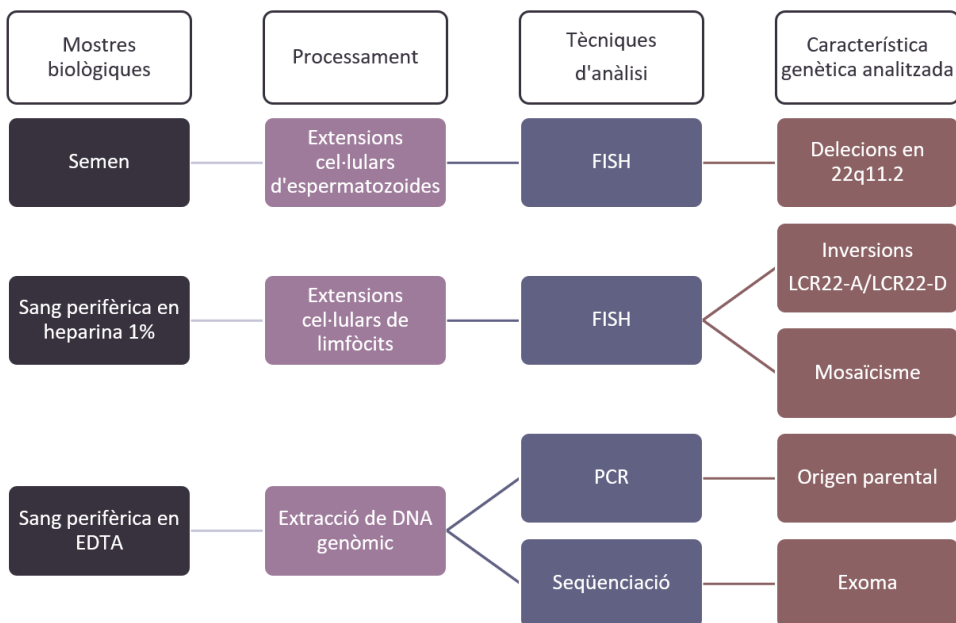


Figura 5. Esquema del disseny experimental de l'estudi



3.1.1. SEMEN

Les mostres de semen es van obtenir per masturbació en contenidors de polietilè després d'un període mínim de tres dies d'abstinència sexual. De les 29 famílies participants, es van recollir un total de 21 mostres de semen. Quatre pares van refusar participar en aquesta part de l'estudi, i quatre pares s'havien sotmès a una vasectomia.

3.1.1.1. EXTENSIONES CEL·LULARS D'ESPERMATOZOIDES

Les extensions d'espermatozoides es van realitzar aplicant el procediment estandarditzat al nostre laboratori (Sarrate & Anton, 2009):

- Transferir la mostra a un tub de 15 ml
- Centrifugar 8 minuts a 1.000 g
- Separar el plasma seminal de la fracció cel·lular amb una pipeta Pasteur
- Afegir 6 ml de solució hipotònica KCl 0,075 M gota a gota amb agitació contínua, temperada prèviament a 37 °C
- Incubar 25 minuts a 37 °C
- Centrifugar 8 minuts a 800 g
- Decantar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular
- Afegir 6 ml de fixador Carnoy (3:1, metanol:àcid acètic) gota a gota i amb agitació contínua
- Centrifugar 8 minuts a 1.000 g i repetir el rentat amb Carnoy dues vegades més
- Resuspendre el botó cel·lular amb fixador fins a assolir una concentració cel·lular òptima
- Realitzar les extensions sobre portaobjectes desengreixats en metanol
- Deixar assecar a l'aire i emmagatzemar els portaobjectes a -20 °C fins el moment del seu ús

3.1.2. SANG PERIFÈRICA

Es van recollir 10 ml de sang perifèrica en heparina sòdica 1% i 10 ml de sang perifèrica en EDTA per cada progenitor de les 29 famílies participants. En funció de la finalitat de l'estudi, les mostres es van processar per a l'obtenció de DNA genòmic, extensions de nuclis interfàsics i extensions de fibres de cromatina.

3.1.2.1. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

L'obtenció de DNA genòmic es va realitzar amb el kit comercial Gentra Puregene Blood (Qiagen) seguint les instruccions proporcionades pels fabricants (Gentra Puregene Handbook, <https://www.qiagen.com/es/resources/>):

- Afegir 30 ml de solució de lisi RBC en un tub de 50 ml
- Afegir 10 ml de sang perifèrica en EDTA i mesclar per inversió 10 vegades
- Incubar 5 minuts a temperatura ambient
- Centrifugar 2 minuts a 2.000 g
- Decantar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular amb el vòrtex
- Afegir 10 ml de solució de lisi cel·lular i mesclar amb el vòrtex
- Afegir 50 µl de RNasa A i invertir 25 vegades
- Incubar 15 minuts a 37 °C i 3 minuts en gel picat
- Afegir 3,33 ml de solució de precipitació proteica i mesclar amb el vòrtex
- Centrifugar 5 minuts a 2.000 g
- Afegir 10 ml de isopropanol i el sobrenedant del pas anterior en un tub nou de 50 ml
- Invertir 50 vegades i centrifugar 3 minuts a 2.000 g
- Descartar el sobrenedant i netejar les parets del tub amb paper absorbent
- Afegir 10 ml d'etanol al 70% i invertir varies vegades per rentar el botó cel·lular
- Centrifugar 1 minut a 2.000 g
- Descartar el sobrenedant i deixar assecar el botó cel·lular 5-10 minuts a temperatura ambient amb el tub obert
- Afegir 1 ml de solució d'hidratació i mesclar amb el vòrtex
- Incubar a 65 °C durant 1 hora per dissoldre el DNA
- Incubar tota la nit a temperatura ambient i en agitació suau constant
- Quantificar la concentració i la puresa del DNA mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDROP® 2000 (ThermoFisher Scientific) a una longitud d'ona de 260 a 280 nm a partir de 1,5 µl de mostra
- Emmagatzemar el DNA a -20 °C fins el moment del seu ús

3.1.2.2. EXTENSIONS CEL·LULARS DE LIMFÒCITS

L'obtenció d'extensions cel·lulars es va realitzar a partir de l'establiment i extracció de cultius cel·lulars de limfòcits seguint el procediment estandarditzat al nostre laboratori:



- Afegir 5 gotes de sang perifèrica en heparina sòdica 1% en 5 ml de medi RPMI estàndard suplementat amb un 5% de fitohemaglutinina
- Incubar a 37 °C durant 72 hores. Cada 24 hores, invertir el tub diverses vegades fins aconseguir la homogeneització del cultiu
- Afegir 80 µl de colcemid
- Incubar 25 minuts a 37 °C
- Centrifugar 8 minuts a 800 g
- Decantar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular
- Afegir 6 ml de solució hipotònica KCl 0,075 M gota a gota amb agitació constant, temperada prèviament a 37 °C
- Incubar 20 minuts a 37 °C al bany maria
- Centrifugar 8 minuts a 800 g
- Decantar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular
- Afegir 6 ml de fixador Carnoy (3:1, metanol:àcid acètic) gota a gota i amb agitació constant
- Centrifugar 8 minuts a 800 g i repetir el rentat amb Carnoy dues vegades més
- Resuspendre el botó cel·lular amb fixador fins a assolir una concentració cel·lular òptima
- Realitzar les extensions sobre portaobjectes desengreixats en metanol
- Deixar assecar a l'aire i emmagatzemar els portaobjectes a -20 °C fins el moment del seu ús

3.2. TÈCNiques D'ANÀLISI

3.2.1. FISH EN ESPERMATOZOIDES

La tècnica de FISH en espermatozoides es va aplicar en l'anàlisi de la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en els pares dels individus afectes de la SD22q11.2.

En les mostres que van mostrar un increment significatiu de delecions de la regió 22q11.2 (veure secció 4.2 de Resultats), es va ampliar l'estudi amb l'anàlisi de la freqüència de delecions i duplicacions de les regions 7q11.23 i 15q11-q13, corresponents a la regió crítica de la síndrome de Williams-Beuren i de Prader-Willi, respectivament.



3.2.1.1. SELECCIÓ DE LES SONDES

Es van seleccionar sondes de DNA específiques de les tres regions cromosòmiques analitzades. La selecció incloïa una sonda específica de la regió d'estudi, una sonda específica d'un locus diferent dins del mateix cromosoma utilitzada com a control d'hibridació, i una sonda específica d'una regió situada en un altre cromosoma com a control de ploïdia (Taula 2).

Taula 2. Combinacions de sondes utilitzades en l'estudi de la freqüència de delecions en espermatozoides, per les regions crítiques dels cromosomes 7, 15 i 22

Sondes		Cromosoma 7	Cromosoma 15	Cromosoma 22
Regió d'estudi	Localització	7q11.23	15q11.2	22q11.2
	Marcatge	<i>Spectrum Orange</i>	<i>Spectrum Orange</i>	<i>Spectrum Orange</i>
	Nom comercial	Vysis LSI ELN, LIMK1, D7S613	Vysis LSI D15S11	Vysis LSI TUPLE1
Control d'hibridació	Localització	7q31	15p11.2	22q13.3
	Marcatge	<i>Spectrum Green</i>	<i>Spectrum Green</i>	<i>Spectrum Green</i>
	Nom comercial	Vysis LSI D7S486, D7S522	Vysis CEP15, D15Z1	Vysis LSI ARSA
Control de ploïdia	Localització	6p11.1-q11	6p11.1-q11	6p11.1-q11
	Marcatge	<i>Spectrum Aqua</i>	<i>Spectrum Aqua</i>	<i>Spectrum Aqua</i>
	Nom comercial	Vysis CEP6, D6Z1	Vysis CEP6, D6Z1	Vysis CEP6, D6Z1

3.2.1.2. DESCONDENSACIÓ DE LA CROMATINA ESPERMÀTICA

La descondensació de la cromatina espermàtica es va realitzar aplicant el procediment estandarditzat al nostre laboratori (Sarrate & Anton, 2009):

- Descongelar els portaobjectes a temperatura ambient
- Rentar dues vegades durant 3 minuts en una solució de 2x de citrat de sòdic salí (2xSSC)
- Deshidratar en un gradient d'etanols (70%, 90% i 100%) durant 2 minuts a cada solució
- Deixar assecar a l'aire
- Incubar 10 minuts en la solució de descondensació (DTT) a 37 °C
- Rentar dues vegades durant 3 minuts en 2xSSC
- Deshidratar en un gradient d'etanols (70%, 90% i 100%) durant 2 minuts a cada solució



- Deixar assecat a l'aire

3.2.1.3. FISH

El procediment de FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoides es va realitzar seguint les especificacions de la metodologia optimitzada al nostre laboratori (Sarrate & Anton, 2009):

- Desnaturalitzar el DNA diana submergint el portaobjectes 5 minuts a 73 °C en una solució amb formamida al 70%
- Deshidratar en un gradient d'etanols (70%, 85% i 100%) durant 1 minut a cada solució
- Deixar assecat a l'aire
- Realitzar la mescla de les sondes:
 - o 70% tampó d'hibridació (Buffer LSI/WCP, Vysis)
 - o 10% sonda de la regió d'estudi
 - o 10% sonda del control d'hibridació
 - o 10% sonda del control de ploïdia
- Desnaturalitzar la mescla de sondes durant 5 minuts a 73 °C
- Aplicar la combinació de sondes sobre la mostra i cobrir amb un cobreobjectes
- Segellar amb cola d'enquadernar
- Incubar tota la nit a 37 °C en un Hybrite Slide Stainer® (Vysis)
- Retirar la cola i el cobreobjectes
- Submergir el portaobjectes 2 minuts a 73 °C en 1xSSC/0,3% NP-40
- Submergir 1 minut a temperatura ambient en 2xSSC/0,1% NP-40
- Deixar assecat a l'aire
- Contratenyir els nuclis dels espermatozoides amb 5 µl de DAPI
- Cobrir amb un cobreobjectes i segellar amb esmalt d'ungles
- Desar els portaobjectes hibridats en una caixa opaca a -20 °C fins el moment de la seva valoració

3.2.1.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA

L'anàlisi de la freqüència de delecions i duplicacions en espermatozoides es van analitzar amb un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 (Olympus) equipat amb un filtre que permet la detecció simultània dels fluorocroms DAPI/ *Spectrum Orange/Spectrum Green/Spectrum Aqua*, i de tres filtres específics pels fluorocroms *Spectrum Orange*, *Spectrum Green* i *Spectrum Aqua*.

La valoració dels espermatozoides es va realitzar seguint els criteris descrits prèviament pel nostre grup de recerca (Blanco et al., 1996; Molina et al., 2010): (i) només es van avaluar els espermatozoides amb un contorn ben definit, (ii) els espermatozoides superposats es van excloure del recompte, (iii) en el cas d'espermatozoides amb dos o més senyals de la mateixa regió cromosòmica, tots els senyals d'hibridació havien de tenir la mateixa mida, intensitat i una distància de separació igual o superior al diàmetre de cada senyal. En funció del número de senyals d'hibridació els espermatozoides es van classificar segons els següents genotips (Figura 6):

- Normal: espermatozoides amb tres senyals d'hibridació, un senyal per a la sonda específica de la regió crítica, un altre pel control d'hibridació i un tercer senyal corresponent a la sonda control de ploïdia.
- Deleció: espermatozoides amb dos senyals d'hibridació, un corresponent a la sonda control d'hibridació i un altre pel control de ploïdia. Aquests espermatozoides no presentaven el senyal corresponent a la sonda de la regió crítica específica.
- Duplicació: espermatozoides amb quatre senyals d'hibridació, dos corresponents a la sonda de la regió crítica específica, un senyal per a la sonda de control d'hibridació i un darrer per a la sonda control de ploïdia.

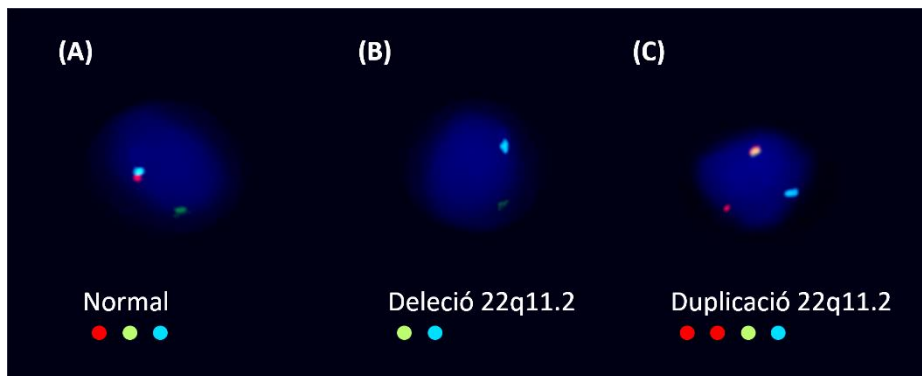


Figura 6. Identificació mitjançant FISH en espermatozoides de genotips normals (A), portadors de delecions (B) i portadors de duplicacions (C) de la regió 22q11.2

3.2.1.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Mitjançant la fórmula del model estadístic de determinació de la mida mostral descrit a la Figura 7, es va calcular el número d'espermatozoides que s'haurien d'analitzar per hibridació i mostra per aconseguir un nivell de precisió adequat. Tenint en compte un interval de confiança del 99% i un escenari de màxima incertesa, l'anàlisi de 10.000 espermatozoides per individu permetia assolir un nivell de precisió del



1,29%, que es va considerar òptim per a l'anàlisi de delecions i duplicacions de les diferents regions crítiques.

$$n = \frac{K^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{e^2}$$

n = mida de la mostra
 K = coeficient obtingut a partir del nivell de confiança establert (per a un nivell de confiança del 99% el valor de $K=2,576$)
 p_0 = proporció esperada d'observacions que presentaran la característica estudiada (en una situació de màxima incertesa $p=0,5$)
 $q_0 = 1 - p_0$
 e = precisió amb la que es vol estimar el paràmetre

Figura 7. Fórmula del model estadístic de determinació de la mida mostral

Els resultats de l'anàlisi de les mostres de pares d'individus afectes es van contrastar respecte els resultats obtinguts en una població control prèviament descrits pel nostre grup de recerca. Aquesta població està formada per 10 individus provinents de la població general, sense descendència afectada per la SD22q11.2 i d'edats compreses entre 23 i 50 anys (Molina et al., 2011).

Es va aplicar un test estadístic de contrast de mitjanes per analitzar si la freqüència mitjana de la freqüència de delecions, duplicacions i del sumatori d'ambdues anomalies mostrava diferències significatives entre la població problema (pares d'individus afectes) i la població control. Prèviament es va contrastar la normalitat dels resultats mitjançant el test estadístic Shapiro-Wilk per tal d'aplicar el test estadístic de contrast de mitjanes adequat.

Aquest tipus de comparació també es va realitzar a nivell individual, és a dir, a través de l'aplicació del test exacte de Fisher es va comprovar si la freqüència de delecions, duplicacions i del sumatori de delecions i duplicacions que mostrava cada individu era diferent del que mostrava el conjunt de la població control.

Es va analitzar la participació de la NAHR inter o intra-cromàtide en la generació de reorganitzacions. A nivell poblacional, es va realitzar una comparació de la freqüència de delecions respecte la de duplicacions amb el test estadístic Wilcoxon i, a nivell individual, la comparació es va realitzar mitjançant el test exacte de Fisher.

Per a determinar l'efecte de l'edat paterna, en primer lloc es va contrastar la normalitat de les dades (edat dels individus control i pares d'individus afectes) mitjançant el test estadístic D'agostino-Pearson i Shapiro-Wilk. Posteriorment es va realitzar una anàlisi de correlació entre l'edat i la freqüència de delecions i/o duplicacions espermàtiques de la regió 22q11.2.

Totes les comparacions es van realitzar utilitzant el programa R i386 3.3.2 (R Core Team, 2013) aplicant un nivell de significació de $p < 0,01$ amb la finalitat de reduir els falsos positius (errors tipus α).

3.2.2. FISH EN NUCLIS INTERFÀSICS DE LIMFÒCITS

La tècnica de FISH en nuclis interfàsics de limfòcits es va aplicar en l'anàlisi de la freqüència d'inversions de la regió 22q11.2 i en l'anàlisi de mosaïcisme somàtic parental.

3.2.2.1. SELECCIÓ DE LES SONDES PER A L'ANÀLISI DE LA FREQUÈNCIA D'INVERSIONS

Per a l'anàlisi de la freqüència d'inversions entre els LCR22-A i LCR22-D es van seleccionar tres sondes de tipus BAC: RP11-66F9 (F9), RP11-505B16 (B16) i RP11-47L18 (L18) (Figura 8). Aquesta selecció es va realitzar a partir de l'anàlisi de la regió 22q11.2 en la versió d'assemblatge del genoma humà de Febrer de 2009 publicada a UCSC *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>).

En l'haplotip normal, el BAC F9 delimita la part proximal del LCR22-A i els BACs B16 i L18 delimiten la part proximal i distal del LCR22-D, respectivament (Figura 8A). En canvi, en el cas de l'haplotip invertit, el posicionament del BAC B16 canvia i passa a estar proper a la part distal del LCR22-A (Figura 8B). Així doncs, tal i com s'explica més endavant, amb el marcatge diferencial dels tres BACs és possible diferenciar l'haplotip normal de l'invertit.

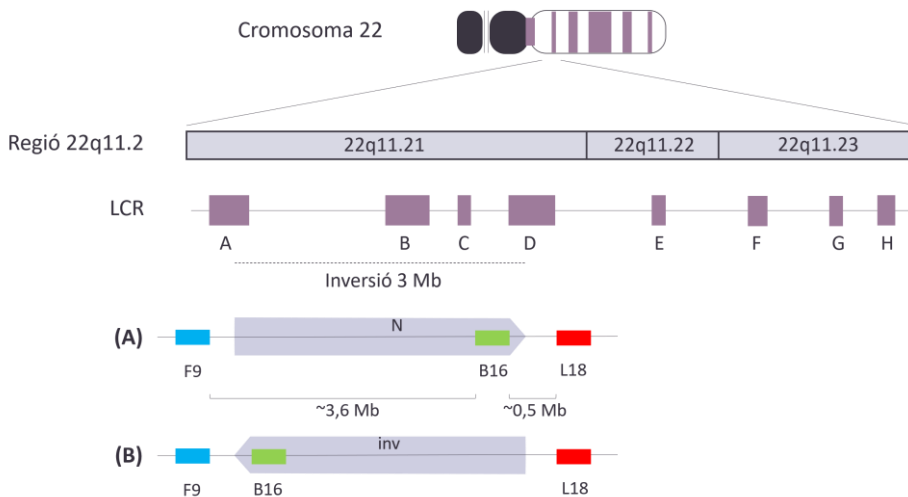


Figura 8. Sondes BAC utilitzades per a la identificació i anàlisi de la inversió LCR22-A/LCR22-D.

(A) Posició dels BACs en l'haplotip normal. (B) Posició dels BACs en l'haplotip invertit

Els BACs van ser proveïts per BACPAC *Resources Center*, CHORI, USA (<http://bacpac.chori.org/>) i es va aplicar el protocol següent pel seu correcte emmagatzematge i obtenció d'estoc.



3.2.2.1.1. OBTENCIÓ D'ESTOC DELS CLONS BACTERIANS

- Afegir 10 ml de medi LB en tubs estèrils de 50 ml
- Afegir el volum de cloramfenicol necessari per obtenir una concentració final de 12,5 µg/ml
- Picar amb una punta de pipeta estèril l'alíquota que conté el BAC i transferir-la al medi de cultiu LB anterior
- Incubar el cultiu tota la nit al bany a 37 °C a 250 rpm
- En un tub Eppendorf de 1,5 ml, afegir 150 µl de glicerol i 850 µl del cultiu bacterià
- Congelar en un recipient de congelació Nalgene Mr. Frosty™ (ThermoFisher Scientific) durant 24 hores a -80 °C
- Emmagatzemar l'estoc a -80 °C fins el moment del seu ús

3.2.2.1.2. CULTIU I SELECCIÓ DELS CLONS BACTERIANS

- Afegir 10 ml de medi LB en tubs estèrils de 50 ml
- Afegir el volum de cloramfenicol necessari per obtenir una concentració final de 12,5 µg/ml
- Picar l'alíquota de cultiu que conté la soca bacteriana portadora del BAC, que es troba emmagatzemada a -80 °C i sense descongelar, i transferir-la al medi de cultiu LB
- Incubar el cultiu tota la nit a 37 °C a 250 rpm

3.2.2.1.3. EXTRACCIÓ DE PLASMIDIS

L'extracció de plasmidis es va realitzar amb el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) i seguint les instruccions proporcionades pels fabricants (QIAprep Miniprep Handbook, <https://www.qiagen.com/es/resources/>):

- Transferir el cultiu a tubs de 15 ml
- Centrifugar 10 minuts a 4.000 rpm i decantar el sobrenedant
- Resuspendre el botó cel·lular amb 400 µl de Buffer P1 i transferir a un tub Eppendorf de 1,5 ml
- Afegir 400 µl de Buffer P2 i invertir 5 vegades
- Afegir 400 µl de Buffer N3 i invertir 5 vegades
- Centrifugar 10 minuts a 14.000 rpm
- Extreure el sobrenedant i dipositar-lo en una columna del kit
- Centrifugar 1 minut a 14.000 rpm i desmuntar la columna del kit per eliminar el sobrenedant
- Afegir 500 µl de Buffer PB

- Centrifugar 1 minut a 14.000 rpm i eliminar el sobrenedant
- Afegir 750 µl de Buffer PE
- Centrifugar 1 minut a 14.000 rpm i eliminar el sobrenedant
- Repetir una altra vegada per eliminar residus del tampó de rentat
- Col·locar la columna en un tub Eppendorf de 1,5 ml
- Afegir 50 µl de Buffer EB, escalfat a 65 °C
- Deixar reposar 1 minut i centrifugar 1 minut a 14.000 rpm
- Quantificar la concentració de DNA plasmídic mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDROP© 2000 a una longitud d'ona de 260 a 280 nm a partir de 1,5 µl de mostra
- Emmatzemar a -20 °C fins el moment del seu ús

3.2.2.1.4. MARCATGE DE LES SONDDES

Es van marcar els BACs amb tres fluorocroms diferents: F9 amb *Spectrum Aqua*-dUTP, B16 amb *Spectrum Green*-dUTP i L18 amb *Spectrum Orange*-dUTP. El marcatge de les sondes es va realitzar amb el kit comercial Nick Translation Kit (Abbott Molecular):

- Col·locar un tub Eppendorf de 0,5 µl en gel picat
- Afegir els següents components en l'ordre indicat:
 - (17,5 - x) µl d'aigua lliure de nucleases
 - x µl de la solució de DNA plasmídic que continguin 1 µg total
 - 2,5 µl Green-dUTP/Orange-dUTP/Aqua-dUTP 0,2 mM
 - 5 µl de barreja dTTP 0,1 mM (20 µl d'aigua lliure de nucleases i 10 µl de dTTP 0,3 mM)
 - 10 µl de barreja dNTP mix (10 µl de dATP 0,3 mM, 10 µl de dGTP 0,3 mM i 10 µl de dCTP 0,3 mM)
 - 5 µl de 10X Nick Translation Buffer
 - 10 µl de Nick Translation Enzyme
- Incubar 16 hores a 15 °C al termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc)
- Aturar la reacció incrementant la temperatura a 70 °C durant 10 minuts
- Transferir el volum de *Nick Translation* a un Eppendorf de 1,5 ml
- Afegir 12,5 µl de DNA d'esperma de salmó (1 µg/ml)
- Afegir 6,25 µl d'acetat sòdic 3 M
- Afegir 125 µl d'etanol 100% a -20 °C
- Agitar per inversió i deixar precipitant tota la nit a -20 °C
- Centrifugar 30 minuts a 4 °C a 14.000 rpm i extreure el sobrenedant
- Rentar el botó cel·lular amb 50 µl d'etanol 70% a -20 °C



- Centrifugar 6 minuts a 4 °C a 14.000 rpm i extreure el sobrenedant
- Incubar 3 minuts a l'estufa a 37 °C
- Afegir 50 µl de TE 1x
- Incubar 15 minuts a l'estufa a 37 °C
- Deixar reposar la solució tota la nit a temperatura ambient
- Mesclar en un nou tub Eppendorf 10 µl de la solució amb 4 µl de Cot1
- Col·locar els tubs oberts 2 hores i mitja a 45 °C fins que s'assequi el botó cel·lular
- Resuspèndre el botó cel·lular amb buffer LSI
- Emmagatzemar a -20 °C fins al moment de la seva utilització

3.2.2.2. SELECCIÓ DE LES SONDES PER A L'ANÀLISI DEL MOSAÏCISME SOMÀTIC PARENTAL

Pel que respecta a l'estudi del mosaïcisme parental, es va utilitzar la mateixa combinació de sondes locus específiques aplicada a l'estudi de la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides: LSI TUPLE1 i LSI ARSA (Taula 2).

3.2.2.3. FISH

Primerament es van realitzar els següents rentats:

- Rentar dues vegades durant 3 minuts en 2xSSC
- Deshidratar en un gradient d'etanols (70%, 90% i 100%) durant 2 minuts a cada solució
- Deixar assecat a l'aire

A continuació, es va aplicar el protocol de FISH detallat a l'apartat de FISH en espermatozoides amb les següents variacions:

- Anàlisi d'inversions: el temps de desnaturalització del DNA de la mostra amb formamida al 70% es va reduir a 2 minuts.
- Anàlisi de mosaïcisme parental: la temperatura de desnaturalització de la solució de les sondes es va incrementar a 75 °C i, posteriorment, es va realitzar una segona incubació de 45 minuts a 37 °C.

3.2.2.4. ANÀLISI MICROSCÒPICA

L'anàlisi microscòpica es va realitzar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 (Olympus, Barcelona, Espanya) descrit a l'apartat 3.2.1.4 de Materials i mètodes. El microscopi estava acoblat a un sistema de captura d'imatges *Isis Imaging System* (Metasystems).

La valoració dels senyals d'hibridació de l'anàlisi del mosaïcisme parental es va realitzar seguint els criteris generals d'anàlisi descrits a l'apartat "FISH en espermatozoides": (i) únicament es van avaluar els nuclis de morfologia normal i no solapats amb altres nuclis, (ii) els senyals d'una mateixa sonda havien de tenir la mateixa mida, intensitat i una distància de separació igual o superior al seu diàmetre per considerar-se senyals independents.

D'acord amb aquests criteris generals, es van classificar els nuclis en quatre categories segons les diferents combinacions de senyals (Figura 9):

- Genotip normal: nuclis amb quatre senyals, dos senyals corresponents a la sonda LSI TUPLE i els altres dos a la sonda LSI ARSA (Figura 9A)
- Genotip delecció 22q11.2 en hemizigosi: nuclis amb tres senyals, dos senyals corresponents a la sonda LSI ARSA i absència d'un senyal corresponent a la sonda LSI TUPLE1 (Figura 9B)
- Genotip delecció 22q13.3 en hemizigosi: nuclis amb tres senyals, dos senyals corresponents a la sonda LSI TUPLE1 i absència d'un senyal corresponent a la sonda LSI ARSA
- Altres genotips: combinacions de senyals no representades en els tres genotips anteriors

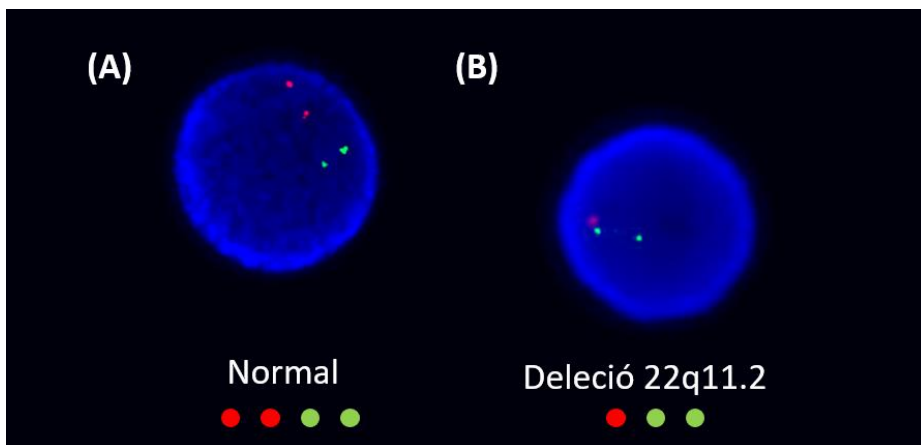


Figura 9. Identificació de genotips mitjançant FISH per a caracteritzar el mosaïcisme per a la delecció 22q11.2 en limfòcits. (A) Nucli amb genotip normal. (B) Nucli amb genotip delecio 22q11.2

Respecte l'estudi de la inversió de 3 Mb, la valoració dels senyals d'hibridació es va realitzar seguint els criteris descrits prèviament pel nostre grup de recerca (Vergés et al., 2017): (i) únicament s'analitzen els nuclis amb dos senyals de cada sonda distribuïts en dos haplotips diferenciats, (ii) es consideren informatius aquells haplotips en els quals es pot distingir una distribució de dos senyals de diferent color agrupats (molt pròxims o sobreposats) i un tercer senyal separat, (iii) el senyal distanciat es troba separat dels altres dos per almenys el doble de la distància que separa els dos senyals agrupats.

Segons la distribució de senyals de cada sonda es van distingir els haplotips normals i els haplotips que presentaven una inversió entre els LCR22-A i LCR22-D (Figura 8; Figura 10):

- Haplotip normal: el senyal verd es troba proper al vermell i allunyat del senyal blau (Figura 10A).
- Haplotip amb la inversió: el senyal verd es troba proper al blau i allunyat del senyal vermell (Figura 10B).

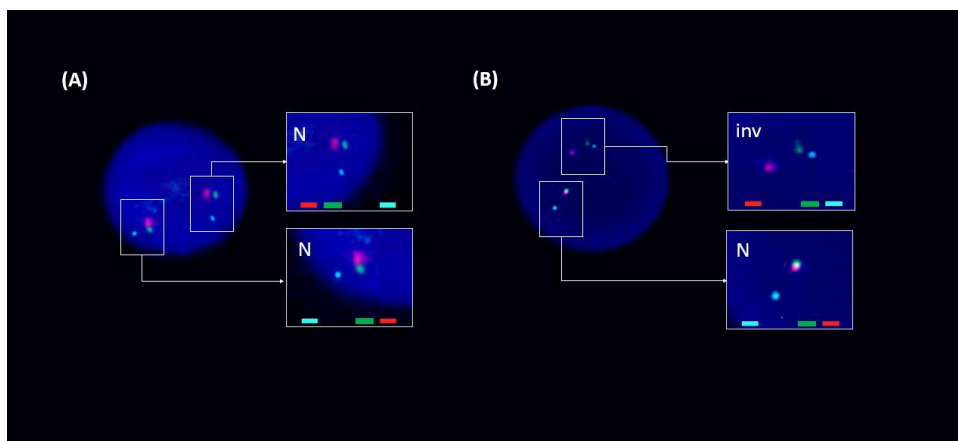


Figura 10. Identificació d'haplotips per a caracteritzar la presència de la inversió LCR22-A/LCR22-D en nuclis interfàsics. (A) Nucli amb dos haplotips normals (senyal verd prop de vermell i separat de blau). (B) Nucli amb un haplotip amb la inversió (senyal verd prop de blau i lluny de vermell) i un de normal

3.2.2.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA

En l'anàlisi del mosaïcisme parental, la població d'estudi estava formada per 28 progenitors transmissors de la deleció 22q11.2 a la seva descendència. Un progenitor no es va poder analitzar degut a la baixa qualitat de la mostra. L'anàlisi de 27 progenitors no transmissors de la deleció es va constituir com a població control.

Mitjançant la fórmula del model estadístic de determinació de la mida mostral (Figura 7), es va calcular que l'anàlisi de 500 nuclis interfàsics per a cada individu

atorgava un grau de precisió del 5,76%, suficient per identificar la presència de mosaïcismes de grau baix o elevat (Silva et al., 2019).

En l'anàlisi d'inversions, la població d'estudi estava formada pels 29 individus transmissors de la deleció. Per altra banda, es va establir una població control formada per 16 individus, 5 dels quals eren individus de la població general i 11 eren progenitors de descendència afectada per la SD22q11.2 no transmissors de la deleció.

Com en els casos anteriors, es va calcular la mida mostral (Figura 7) i es va comprovar que amb l'anàlisi de 100 haplotips informatius s'assolia una precisió del 12,88%, suficient per identificar una possible presència en heterozigosi de la inversió entre els LCR22-A i LCR22-D.

En ambdós estudis, es van realitzar comparacions respecte la població control i a nivell poblacional i una a nivell individual.

Prèviament es va contrastar la normalitat dels resultats mitjançant el test estadístic Shapiro-Wilk per tal d'aplicar el test estadístic de contrast de mitjanes adequat.

Es va comprovar si la freqüència de la deleció de la regió 22q11.2 que mostrava cada individu era diferent de la que mostrava el conjunt de la població control mitjançant el test exacte de Fisher. Aquest mateix test es va aplicar per comparar la freqüència de l'haplotip normal i de l'haplotip invertit respecte el conjunt de la població control.

Ambdues comparacions es van realitzar amb un nivell de significació de $p < 0,01$ amb la finalitat de reduir falsos positius (errors tipus α).

Les dades es van analitzar utilitzant el programa R i386 3.3.2 (R Core Team, 2013).

3.2.3. PCR

Per a determinar l'origen parental de la deleció 22q11.2 en els descendents afectats es va realitzar una anàlisi de microsatèl·lits mitjançant la tècnica de PCR. Es van utilitzar les mostres de DNA genòmic d'ambdós progenitors i del fill/a afectat/a (Taula 1, Annex).

Es va aplicar un disseny experimental basat en la selecció de cinc seqüències microsatèl·lits a partir de la base de dades NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Quatre d'aquests microsatèl·lits es localitzaven dins la regió crítica 22q11.2, mentre que el cinquè es localitzava fora d'aquesta regió (Figura 11). Aquest disseny va permetre identificar l'origen parental del cromosoma portador de la deleció i determinar la mida del fragment delecionat.

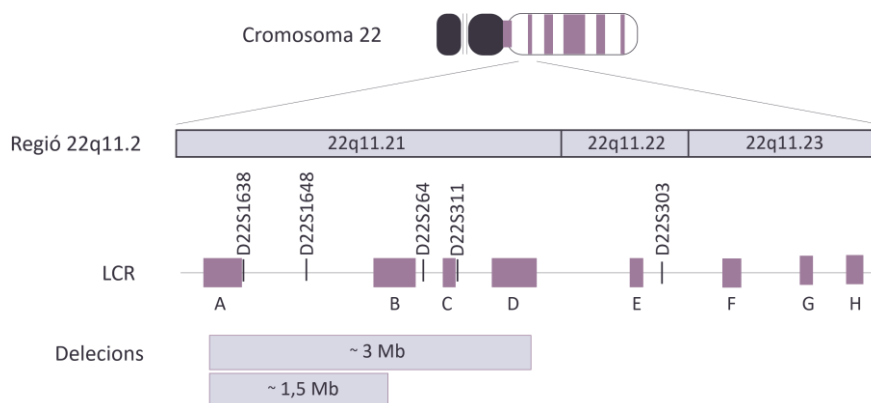


Figura 11. Posició dels cinc microsatèl·lits utilitzats per a determinar l'origen parental de la deleció 22q11.2 i la seva mida

Les seqüències de microsatèl·lits es van amplificar per PCR amb encebadors *forward* (F) modificats amb un marcatge a l'extrem 5' (HEX o 6-FAM) (Roche Molecular Solutions). La seqüència de nucleòtids dels encebadors F i *reverse* (R), el marcatge a 5' dels encebadors F, la mida dels amplicons, la seva posició cromosòmica i la temperatura d'hibridació es detallen a la [Taula 3](#).

Taula 3. Marcadors de microsatèl·lits utilitzats en la determinació de l'origen parental

Microsatèl·lit	Posició	Encebadors	Marcatge	Mida (pb)	T ^a hibridació
D22S1638	22q11.21	F: GACAACAGCAAATTGCACATT R: TCAGCCACTACCCTCCAG	HEX -	93	55 °C
D22S1648	22q11.21	F: CAGATGCTTCAGGAGAAGTG R: AGTTGTCAGATGCCTAAGAGA	HEX -	152	50 °C
D22S264	22q11.21	F: ATTAACATATAAAGGAGCCC R: CACCCACCCAGAGGTATTC	HEX -	190 - 198	56 °C
D22S311	22q11.21	F: GCTAGTGTGAGATAACGAAGCC R: TTTTGTATTTTGTAGAGACGG	6-FAM -	262	57 °C
D22S303	22q11.22	F: AGGACCTCAGACTGGTCAGTC R: CTCCATGAGAAGGTACTCTCC	6-FAM -	220 - 233	56 °C

Es va preparar la reacció de PCR amb els reactius detallats a la [Taula 4](#). L'amplificació es va dur a terme amb el termociclador MasterCycler ep (Eppendorf) i seguint les següents condicions: 10 minuts a 94 °C, 35 cicles de 30 segons a 94 °C, 30 segons a la temperatura d'hibridació específica per cada encebador ([Taula 3](#)), 35 segons a 72 °C i 12 minuts a 72 °C.

Taula 4. Reactius, concentració i volums utilitzats en cada reacció de PCR

Reactius	Concentració	Volum (μ l)/reacció
H ₂ O nucleasa free	-	14,25 - x
10x buffer II	-	2,5
MgCl ₂	25 mM	2
dNTPs	2,5 mM cadascun	2
AmpliTaQ Gold	250 U	0,25
Encebador forward (F)	12,5 pmol/ μ l	2
Encebador reverse (R)	12,5 pmol/ μ l	2
DNA genòmic	40-90 ng	x
Volum final		25

3.2.3.1. ANÀLISI DE LES MOSTRES

Els productes de la reacció de PCR es van analitzar per electroforesi capil·lar mitjançant el seqüenciador automàtic ABI 3130XL (Applied Biosystems) del Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona (<https://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/>).

Les dades obtingudes es van analitzar amb el programa *Peak Scannver* versió 2.0 (Applied Biosystems), que permet la visualització dels perfils de grandària dels fragments amplificats de cada seqüència microsatèl·lit i la seva comparació en les tres mostres d'interès (ambdós progenitors i la descendència afectada).

3.2.4. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA

Per a identificar variants de gens implicats en el procés de la HR i avaluar la seva associació amb el fenomen de la NAHR i la formació de delecions es va seqüenciar l'exoma de 9 progenitors (Taula 2, Annex). Es van seleccionar els pares que van mostrar un increment en el nombre de delecions i duplicacions en espermatozoides (4 individus: veure secció 4.2 de Resultats), i cinc mares transmissores de la delecio 22q11.2. La selecció de les mares transmissores es va realitzar a l'atzar, degut a la impossibilitat d'analitzar oòcits per comprovar si existia un increment en la freqüència de delecions i duplicacions.

3.2.4.1. ELABORACIÓ D'UN PANEL DE GENS IMPLICATS EN HR

Es va elaborar un panel de gens susceptibles de ser analitzats en relació amb la seva implicació en fenòmens de HR.

En primer lloc es van seleccionar els processos biològics que contenen les paraules “*homologous recombination*” a la pàgina d'ontologia gènica AmiGo 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>). En segon lloc es va elaborar un llistat amb els gens associats a aquests processos.

3.2.4.2. ANÀLISI DE L'EXOMA

La seqüenciació de l'exoma es va realitzar a través de la contractació dels serveis de l'empresa Sequentia Biotech (<https://www.sequentiabio.tech.com/>). Es va utilitzar la plataforma Illumina HiSeq i la tecnologia SureSelect Agilent v7, amb una cobertura de 100x (18 Gb) i una lectura de 150 pb de llargada de cada fragment. Les mostres de DNA es van desnaturalitzar i el DNA monocatenari obtingut es va hibridar amb sondes de DNA específiques per a les regions exòniques marcades amb biotina. Posteriorment, es van seleccionar les regions biotilades mitjançant perles magnètiques d'estreptavidina, generant una llibreria de regions exòniques que es van utilitzar per a la generació de *clústers* i la seva seqüenciació. Les dades crues obtingudes de la seqüenciació es van processar per eliminar les lectures de baixa qualitat abans de procedir al seu mapatge amb l'última versió del genoma humà.

La identificació de les variants gèniques es va realitzar mitjançant la utilització del software proporcionat per la mateixa empresa de seqüenciació, una plataforma anomenada GINO (<https://gino.sequentiabio.tech.com/GENO/>). Aquesta plataforma facilita el número total de variants gèniques i ofereix la possibilitat de filtrar-les segons el tipus (SNPs, delecions, insercions), significança clínica, freqüència al·lèlica i qualitat de mapeig. A més, dins de cada variant mostra els canvis de nucleòtids que s'han produït, la seva significança clínica i la valoració de patogenicitat. A cada pestanya, ofereix enllaços amb diferents bases de dades, com Ensembl, dbSNP o ClinVar, per poder ampliar la informació d'una manera ràpida i específica.

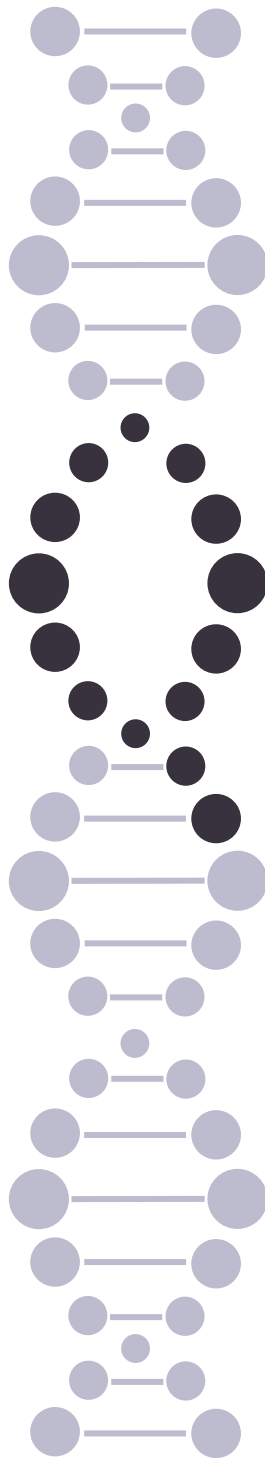
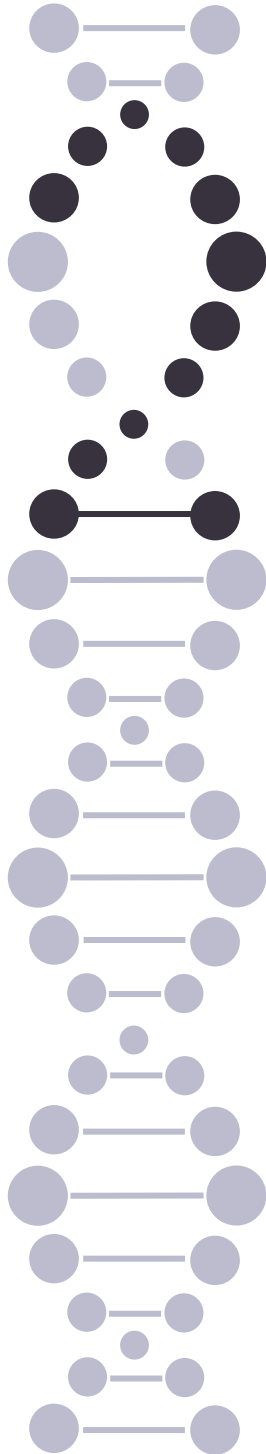
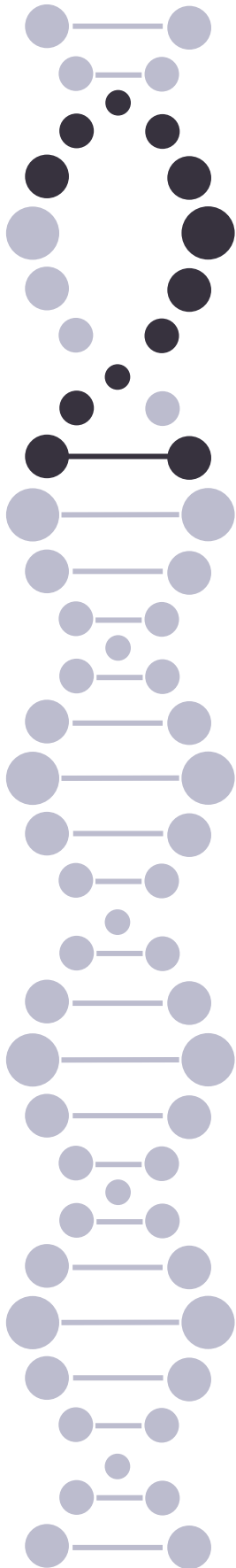
Es van realitzar quatre filtres per identificar variants amb una possible associació amb el fenomen de la NAHR:

- Filtratge 1: es van seleccionar les variants amb una significança clínica patogènica, probablement patogènica o de significat incert i amb una freqüència de l'al·lel minoritari menor a l'1% (MAF<0,01).



- Filtratge 2: les variants resultants es van contrastar amb el panel de gens (apartat 3.3.1 de Materials i mètodes) per a identificar aquelles variants gèniques associades a la HR.
- Filtratge 3: es va basar en l'evidència de patogenicitat descrita en els estàndards del Col·legi Americà de Medicina Gènica i Genòmica (ACMG) i l'Associació de Patologia Molecular (AMP) (Richards et al., 2015). Aquests estàndards valoren i combinen l'evidència de cada variant i les classifiquen tenint en compte la freqüència al·lèlica, els resultats de les anàlisis funcionals, les prediccions *in silico*, les anàlisis de segregació i la relació genotip-fenotip. La combinació d'aquestes dades permet classificar les variants gèniques en una de les següents categories: benigne, probablement benigne, variant de significat incert (VUS), probablement patogènica i patogènica. A més, proporcionen una ponderació per a estimar el seu grau de patogenicitat. Cada criteri patogènic es pondera com a molt fort (PVS1), fort (PS1-4), moderat (PM1-6) o de suport (PP1-5) i cada criteri benigne es pondera com independent (BA1), fort (BS1-4) i de suport (BP1-6). Cal remarcar que la numeració dins de cada categoria és únicament per a ajudar a referir-se als diferents criteris i no indica que un criteri amb un nombre més baix tingui major importància que un criteri amb un nombre més alt. Es van seleccionar les variants amb un ACMG patogènic, probablement patogènic i VUS. A més, les variants VUS seleccionades havien de complir almenys amb criteri patogènic PVS, PS, PM, PP.
- Filtratge 4: es van contrastar els resultats obtinguts en bases de dades de predicció de la patogenicitat segons l'efecte de la substitució d'un aminoàcid i la conservació filogenètica (SIFT, PolyPhen2, CADD, DANN, FATHMM, Fathmm-MKL, PROVEAN, Mutation Taster, PhastCons i PhyloP). Es van seleccionar les variants que mostraven un balanç més patogènic que neutre en el conjunt de les bases de dades.

SIFT prediu si la substitució d'un aminoàcid pot afectar la funció de la proteïna, en base a l'homologia de seqüències i la semblança fisicoquímica entre els aminoàcids alternatius. PolyPhen2 és semblant a SIFT, però també té en compte les estructures 3D de les proteïnes. CADD i DANN prediuen si la variant deriva d'un al·lel perjudicial. PROVEAN es basa en l'homologia de seqüències. Mutation Taster utilitza el classificador de Bayes per a predir el potencial de malaltia d'una alteració, FATHMM i Fathmm-MKL es basen en l'associació de la conservació evolutiva de les seqüències amb puntuacions específiques de les malalties. Finalment, PhastConst i PhyloP es basen en la conservació filogenètica a partir d'alineacions de genomes de vertebrats i/o mamífers.



4. Resultats

4.1. MIDA I ORIGEN PARENTAL DE LA DELECIÓ 22q11.2

La mida i l'origen parental i de la deleció en el fill/a afecte/a es van determinar en les 29 famílies participants en aquest projecte de tesi.

La deleció de 3 Mb entre els LCR22-A i LCR22-D es va observar en 27 famílies (93,10% dels casos). En canvi, la descendència de les famílies 14 i 17 (6,90% dels casos) presentava la deleció de 1,5 Mb, generada entre els LCR22-A i LCR22-B (Taula 1, Annex).

La deleció va ser d'origen matern en 16 famílies (55,17%) i d'origen patern en les 13 famílies restants (44,83%) (Taula 1, Annex). Es va realitzar una prova binomial i es va observar que no existia un biaix en l'origen parental ($p=0,711$).

A partir dels estudis publicats on es determinava l'origen parental de la SD22q11.2 es va realitzar una revisió de les dades per a comprovar en una mida mostral més àmplia l'existència d'una preferència parental en la transmissió de la deleció 22q11.2. Es van recopilar 21 estudis (inclòs els resultats d'aquesta Tesi) i es va obtenir una població total de 866 famílies. La deleció era d'origen matern en 488 famílies (56,35%) i d'origen patern en 378 famílies (43,65%). La prova binomial va determinar una tendència materna en la transmissió de la deleció 22q11.2 ($p=0,0002$) (Taula 3, Annex).

També es van revisar les dades publicades per als trastorns genòmics recurrents més freqüents especificats a la Taula 1. Es van seleccionar aquells trastorns amb un nombre de casos informatius superior a 30 (Taula 5). Dels nou trastorns genòmics analitzats, set van mostrar un marcat biaix parental. En general, quan la regió crítica es localitzava propera al centròmer l'origen parental era preferentment matern, en canvi, mostrava un origen preferentment patern en una localització més telomèrica (Taula 5).



Taula 5. Resultats de la revisió bibliogràfica sobre l'origen parental dels trastorns genòmics més freqüents

Trastorn genòmic	Regió cromosòmica (localització)	Incidència	Total població	Origen matern (%)	Origen patern (%)	Tipus biaix
Síndrome de la deleció 1p36	1p36 (T)	1:5.000	80	55 (68,75%)	25 (31,25%)	Matern (p=0,0011)
Síndrome de Wolf-Hirschhorn	4p16.3 (T)	1:50.000	30	5 (16,67%)	25 (83,33%)	Patern (p=0,0003)
Síndrome de Cri du Chat	5p15 (T)	1:15.000	97	12 (12,37%)	85 (87,63%)	Patern (p<0,0001)
Síndrome de Sotos	5q35 (T)	1:14.000	41	5 (12,20%)	36 (87,80%)	Patern (p<0,0001)
Síndrome de Williams-Beuren	7q11.23 (C)	1:20.000	974	512 (52,57%)	462 (47,43%)	No biaix (p=0,1164)
Síndrome de la deleció 16p11.2	16p11.2 (C)	1:5.000	66	59 (89,39%)	7 (10,61%)	Matern (p<0,0001)
Síndrome de Smith-Magenis	17p11.2 (C)	1:15.000	56	22 (39,29%)	34 (60,71%)	No biaix (p=0,1409)
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A	17p12 (C)	1:5.000	79	8 (10,13%)	71 (89,87%)	Patern (p<0,0001)
Síndrome de la microdeleció NF1	17q11.2 (C)	-	110	90 (81,82%)	20 (18,18%)	Matern (p<0,0001)
Síndrome de la deleció 22q11.2	22q11.2 (C)	1:4.000	866	488 (56,35%)	378 (43,65%)	Matern (p=0,0002)

C: centromèrica

T: telomèrica

4.2. DELECCIONS I DUPLICACIONS EN ESPERMATOZOIDES

4.2.1. DELECCIONS I DUPLICACIONS DE LA REGIÓ 22q11.2

Es va analitzar un total de 211.970 espermatozoides procedents dels 21 pares que van donar una mostra de semen, aproximadament 10.000 espermatozoides per individu.

Als pares amb descendència afectada de la SD22q11.2 van mostrar una freqüència mitjana de deleccions de 0,28%, amb una desviació estàndard (SD) de 0,25 i un rang de 0,03 a 0,93%. La freqüència mitjana de duplicacions va ser del 0,12%, amb una SD de 0,12 i un rang de 0 a 0,59%. La freqüència mitjana del sumatori de deleccions i duplicacions va ser de 0,40%, amb una SD de 0,36 i un rang de 0,07 a 1,52% (Taula 6). Aquestes dades es van comparar respecte les freqüències mitjanes descrites

a la població control (Molina et al., 2011). En cap de les tres comparacions es van observar diferències significatives (Test Mann-Whitney, $p=0,263$, $p=0,689$, $p=0,542$, respectivament).

D'altra banda, es va comparar a nivell poblacional la freqüència de delecions amb la de duplicacions. Es va observar un increment significatiu de la freqüència mitjana de delecions en comparació a la freqüència mitjana de duplicacions (Test de Wilcoxon, $p<0,0001$), fet que indica la participació de la NAHR intra-cromàtide en la generació d'anomalies.

Taula 6. Resultats de FISH en espermatozoides de la freqüència de delecions (del), duplicacions (dup), sumatori de delecions i duplicacions (del+dup). En negreta i senyalat amb un asterisc s'indiquen les freqüències incrementades respecte la població control.

Codi	Edat	Origen parental	Normal (%)	del22q11.2 (%)	dup22q11.2 (%)	del+dup (%)	Altres (%)	Total
DG1P	29	Paternal	10.000 (99,19)	24 (0,24)	11 (0,11)	35 (0,35)	47 (0,47)	10.082
DG2P	48	Paternal	10.000 (98,4)	57 (0,57)*, b	20 (0,20) ^c	77 (0,77)*	86 (0,86)	10.163
DG3P	44	Paternal	9.927 (99,09)	19 (0,19)	13 (0,13)	32 (0,32)	59 (0,59)	10.018
DG6P	36	Paternal	10.096 (98,87)	52 (0,52)*, b	12 (0,12) ^c	64 (0,64)*	51 (0,51)	10.211
DG7P	30	Maternal	10.000 (99,24)	28 (0,28) ^b	5 (0,05) ^c	33 (0,33)	43 (0,43)	10.076
DG8P	39	Paternal	10.000 (99,34)	18 (0,18)	7 (0,07)	25 (0,25)	41 (0,41)	10.066
DG10P	33	Paternal	9.948 (99,31)	13 (0,13)	10 (0,10)	23 (0,23)	46 (0,46)	10.017
DG11P	37	Maternal	9.930 (99,28)	25 (0,25)	16 (0,16)	41 (0,41)	31 (0,31)	10.002
F03-1	-	Maternal	10.008 (99,73)	3 (0,03)	4 (0,04)	7 (0,07)	20 (0,20)	10.035
F04-1	-	Maternal	10.012 (99,65)	21 (0,21) ^b	3 (0,03) ^c	24 (0,24)	11 (0,11)	10.047
F05-1	-	Paternal	10.013 (99,72)	4 (0,04)	5 (0,05)	9 (0,09)	19 (0,19)	10.041
F10-1	-	Maternal	10.011 (98,34)	95 (0,93)*, b	60 (0,59)*, c	155 (1,52)*	14 (0,14)	10.180
F12-1	-	Maternal	10.037 (99,46)	21 (0,21)	14 (0,14)	35 (0,35)	19 (0,19)	10.091
F13-1	35	Paternal	10.004 (99,44)	19 (0,19)	18 (0,18)	37 (0,37)	19 (0,19)	10.060
F14-1	41	Paternal	10.061 (98,67)	94 (0,92)*, b	26 (0,25)*, c	120 (1,18)*	16 (0,16)	10.197
F15-1	36	Paternal	10.006 (99,81)	12 (0,12) ^b	0 (0,00) ^c	12 (0,12)	7 (0,07)	10.025
F16-1	53	Maternal	10.004 (99,32)	26 (0,26)	12 (0,12)	38 (0,38)	30 (0,30)	10.072
F17-1	42	Maternal	10.007 (99,46)	24 (0,24)	9 (0,09)	33 (0,33)	21 (0,21)	10.061



F18-1	40	Matern	10.361 (99,87)	3 (0,03)	6 (0,06)	9 (0,09)	4 (0,04)	10.374
F20-1	38	Matern	10.035 (99,51)	26 (0,26) ^b	4 (0,04) ^c	30 (0,30)	19 (0,19)	10.084
F21-1	46	Matern	10.041 (99,73)	10 (0,10)	4 (0,04)	14 (0,14)	13 (0,13)	10.068
\bar{x} (SD)			99,31 (0,43)	0,28 (0,25)	0,12 (0,12)	0,40 (0,36)	0,29 (0,20)	
\bar{x} (SD) ^a			99,08 (0,29)	0,17 (0,09)	0,12 (0,09)	0,29 (0,17)	0,64 (0,17)	
IC 99% ^a			98,84-99,31	0,10-0,24	0,05-0,20	0,15-0,43	0,50-0,78	

* Increment significatiu respecte la població control

^a Dades població control (Molina et al., 2011)

^{b,c} En la mateixa fila indica la distorsió significativa de la ràtio 1:1 del:dup

A continuació, es va realitzar un estudi a nivell individual. Els individus DG2P, DG6P, F10-1 i F14-1 van mostrar un increment significatiu del percentatge de delecions en comparació a les dades control (Test exacte de Fisher, $p=1,04 \cdot 10^{-12}$, $p=1,81 \cdot 10^{-10}$, $p<2,2 \cdot 10^{-16}$ i $p<2,2 \cdot 10^{-16}$, respectivament) (Taula 6). Tanmateix, les freqüències de delecions dels quatre individus es van situar fora del rang de normalitat establert a la població control (IC 99% = 0,10-0,24).

El risc de generar delecions en aquests individus en relació a la població control es va estimar en una oportunitat relativa (OR) de 3,38 en l'individu DG2P; 3,07 en l'individu DG6P; 5,64 en l'individu F10-1 i 5,57 en l'individu F14-1.

Pel que fa a les duplicacions, els individus F10-1 i F14-1 també van mostrar un increment significatiu del percentatge de duplicacions (Test exacte de Fisher, $p<2,2 \cdot 10^{-16}$ i $p=0,0015$, respectivament) i es trobaven fora del rang de normalitat establert a la població control (IC 99% = 0,05-0,20). El risc de generar duplicacions en aquests individus en relació a la població control es va estimar en una OR de 4,82 en l'individu F10-1 i de 2,08 en l'individu F14-1.

De la mateixa manera que en la freqüència de delecions, aquests quatre individus també van mostrar un increment significatiu del percentatge del sumatori de delecions i duplicacions (Test exacte de Fisher, $p=1,02 \cdot 10^{-11}$, $p=2,73 \cdot 10^{-07}$, $p<2,2 \cdot 10^{-16}$ i $p<2,2 \cdot 10^{-16}$, respectivament). Tanmateix, les freqüències de delecions i duplicacions es van situar fora dels rang de normalitat establert a la població control (IC 99% = 0,15-0,43). El risc de generar delecions i duplicacions respecte la població control es va estimar en una OR de 2,63 en l'individu DG2P; 2,17 en l'individu DG6P; 5,32 en l'individu F10-1 i 4,1 en l'individu F14-1.

Aquestes dades es van posar en comú amb els resultats obtinguts de l'anàlisi d'origen parental de la deleció 22q11.2 en el fill/a afecte/a (Taula 6). Es va observar que els individus DG2P, DG6P i F14-1 eren els progenitors transmissors de la deleció a la seva descendència. En canvi, en la família F10, l'origen de la deleció era matern.

En relació a la comparativa a nivell individual entre la freqüència de delecions i duplicacions, 8 dels 21 casos analitzats van mostrar distorsions de la proporció 1:1 exhibint increments de la freqüència de delecions (Test exacte de Fisher, $p < 0,0001$ en DG2P, DG6P, DG7P, F04-1, F14-1 i F20-1, $p = 0,0059$ en F10-1 i $p = 0,0005$ en F15-1) (Taula 6). És important destacar que 4 dels 8 individus identificats corresponien als pares que van mostrar increments significatius de delecions respecte la població control.

Respecte a l'efecte de l'edat paterna, es van analitzar en conjunt els individus de la població control i de la població d'estudi. No es va observar una correlació positiva significativa entre l'edat i la freqüència de delecions (Correlació de Spearman, $r = 0,4663$; $p = 0,0163$), de duplicacions (Correlació de Spearman, $r = 0,3453$; $p = 0,084$), ni del sumatori de delecions i duplicacions (Correlació de Spearman, $r = 0,451$; $p = 0,0208$).

4.2.2. DELECIONS I DUPLICACIONS DE LES REGIONS 7q11.23 I 15q11-q13

En els 4 pares que presentaven un increment de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 es van analitzar les freqüències de delecions i duplicacions de les regions crítiques 7q11.23 (Taula 7) i 15q11q13 (Taula 8). En total, es van analitzar 40.745 espermatozoides per la regió 7q11.23 i 40.278 espermatozoides per la regió 15q11q13.

Primerament es va realitzar una comparativa a nivell poblacional de la freqüència mitjana de delecions, de duplicacions i del sumatori de delecions i duplicacions de cada regió crítica entre els pares seleccionats i la població control. No es van observar diferències significatives en cap de les tres comparacions realitzades ni per la regió crítica 7q11.23 (Test de Mann-Whitney, $p = 0,045$, $p = 0,356$, $p = 0,944$, respectivament), ni en el cas de la regió 15q11q13 (Test de Mann-Whitney, $p = 0,887$, $p = 0,034$, $p = 0,478$, respectivament).

A nivell individual i en referència a la regió 7q11.23, els individus DG2P, DG6P i F14-1¹ no van mostrar un increment significatiu ni de delecions (Test exacte de Fisher, $p = 0,909$, $p = 0,218$, $p = 3,59 \cdot 10^{-05}$, respectivament) (IC 99% = 0,12-0,30), ni de duplicacions (Test exacte de Fisher, $p = 0,797$, $p = 0,607$, $p = 0,701$, respectivament) (IC 99% = 0,12-0,21), ni del sumatori d'ambdues reorganitzacions (Test exacte de Fisher, $p = 0,732$, $p = 0,613$, $p = 1,74 \cdot 10^{-09}$, respectivament) (IC 99% = 0,27-0,49) (Taula 7).

¹ En l'individu F14-1 s'observen valors de p significatius i valors fora de l'interval de confiança degut a que presenta disminucions significatives d'anomalies respecte la població control, tant per la regió 7q11.23 com per la 15q11-q13.

En canvi, l'individu F10-1 va presentar un increment significatiu de la freqüència de delecions i del sumatori de delecions i duplicacions (Test exacte de Fisher, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$ i $p = 3,45 \cdot 10^{-14}$, respectivament). El risc de generar delecions en aquest individu en relació a la població control es va estimar en una OR de 3,78 i de 2,59 per la generació de delecions i duplicacions (Taula 7).

Taula 7. Resultats de la freqüència de delecions (del), duplicacions (dup), sumatori de delecions i duplicacions (del+dup) de la regió 7q11.23 en espermatozoides dels quatre progenitors que presentaven un increment de delecions de la regió 22q11.2. En negreta i senyalat amb un asterisc, s'indiquen les freqüències incrementades respecte la població control.

Codi	Normal (%)	del7q11.23 (%)	dup7q11.23 (%)	del+dup (%)	Altres (%)	Total
DG2P	10.049 (99,05)	20 (0,20)	15 (0,15)	35 (0,35)	61 (0,60)	10.145
DG6P	10.321 (99,14)	28 (0,28)	14 (0,13)	42 (0,41)	48 (0,46)	10.411
F10-1	10.000 (98,85)	79 (0,78)*	18 (0,18)	97 (0,96)*	19 (0,19)	10.116
F14-1	10.064 (99,91)	4 (0,04)	2 (0,02)	6 (0,06)	3 (0,03)	10.073
\bar{x} (SD)	99,24 (0,46)	0,32 (0,32)	0,12 (0,07)	0,44 (0,38)	0,32 (0,26)	
\bar{x} (SD) ^a	98,99 (0,54)	0,21 (0,10)	0,17 (0,06)	0,38 (0,14)		
IC 99% ^a	98,55-99,43	0,12-0,30	0,12-0,21	0,27-0,49		

* Increment significatiu respecte la població control

^a Dades població control (Molina et al., 2011)

Respecte a la regió 15q11q13, els resultats van ser similars. Els individus DG2P, DG6P i F14-1¹ no van mostrar increments significatius de delecions (Test exacte de Fisher, $p = 0,150$, $p = 0,498$, $p = 0,002$, respectivament) (IC 99% = 0,14-0,30), de duplicacions (Test exacte de Fisher, $p = 0,022$, $p = 0,002$, $p = 3,28 \cdot 10^{-07}$, respectivament) (IC 99% = 0,14-0,34) ni del sumatori de delecions i duplicacions (Test exacte de Fisher, $p = 0,588$, $p = 0,007$, $p = 4,46 \cdot 10^{-09}$, respectivament) (IC 99% = 0,29-0,63) (Taula 8).

En l'individu F10-1 també es van observar un increment en la freqüència de delecions i del sumatori d'ambdues reorganitzacions (Test exacte de Fisher, $p = 1,99 \cdot 10^{-10}$ i $p = 6,47 \cdot 10^{-05}$, respectivament). El risc de generar delecions en relació a la població control es va estimar en una OR de 2,79 i de 1,68 per la generació de delecions i duplicacions (Taula 8).

¹ En l'individu F14-1 s'observen valors de p significatius i valors fora de l'interval de confiança degut a que presenta disminucions significatives d'anomalies respecte la població control, tant per la regió 7q11.23 com per la 15q11-q13.

Taula 8. Resultats de la freqüència de delecions (del), duplicacions (dup), sumatori de delecions i duplicacions (del+dup) de la regió 15q11-q13 en espermatozoides dels quatre progenitors que presentaven un increment de delecions de la regió 22q11.2. En negreta i senyalat amb un asterisc, s'indiquen les freqüències incrementades respecte la població control.

Codi	Normal (%)	del15q11-q13 (%)	dup15q11-q13 (%)	del+dup (%)	Altres (%)	Total
DG2P	9.970 (99,27)	29 (0,29)	13 (0,13)	42 (0,41)	31 (0,31)	10.043
DG6P	10.048 (99,38)	18 (0,18)	10 (0,10)	28 (0,28)	35 (0,35)	10.111
F10-1	10.013 (99,12)	61 (0,60)*	17 (0,17)	78 (0,77)*	11 (0,11)	10.102
F14-1	10.008 (99,86)	8 (0,08)	3 (0,03)	11 (0,11)	3 (0,03)	10.022
\bar{x} (SD)	99,41 (0,32)	0,29 (0,23)	0,11 (0,06)	0,39 (0,28)	0,20 (0,15)	
\bar{x} (SD) ^a	99,17 (0,21)	0,22 (0,10)	0,24 (0,13)	0,46 (0,21)		
IC 99% ^a	99,00-99,34	0,14-0,30	0,14-0,34	0,29-0,63		

* Increment significatiu respecte la població control

^a Dades població control (Molina et al., 2011)

4.3. INVERSIÓ LCR22-A/LCR22-D

Es va analitzar un mínim de 100 haplotips informatius per a cada un dels 16 individus control i dels 29 progenitors transmissors de la deleción. En total es van analitzar 2.133 haplotips informatius per a la població control i 3.588 haplotips per a la població d'estudi.

Pel que fa a la població control, la freqüència mitjana d'haplotips normals va ser de 95,63%, amb una SD de 2,19 i un rang de 90,13 a 98,06%. La freqüència mitjana d'haplotips que presentaven la inversió va ser de 3,07, amb una SD de 1,95 i un rang de 0,96 a 7,89% (Taula 9).

Taula 9. Resultats de l'estudi de la inversió LCR22-A/LCR22-D en la població control.

Codi	Nuclis	Haplotips informatius	Haplotips			Genotip
			Normal (%)	Inversió (%)	Altres (%)	
C3	87	102	98 (96,08)	1 (0,98)	3 (2,94)	N/N
C7	69	101	96 (95,05)	2 (1,98)	3 (2,97)	N/N
C9	77	102	96 (94,12)	3 (2,94)	3 (2,94)	N/N
C11	77	104	101 (97,12)	1 (0,96)	2 (1,92)	N/N
C14	75	103	101 (98,06)	1 (0,97)	1 (0,97)	N/N
F01-1	107	138	134 (97,10)	3 (2,17)	1 (0,72)	N/N
F02-1	120	170	163 (95,88)	7 (4,12)	0	N/N
F03-1	118	170	165 (97,06)	5 (2,94)	0	N/N
F04-1	113	150	142 (94,67)	7 (4,67)	1 (0,67)	N/N
F05-2	69	101	99 (98,02)	1 (0,99)	1 (0,99)	N/N
F08-1	106	86	83 (96,51)	3 (3,49)	0	N/N
F09-1	122	164	157 (95,73)	4 (2,44)	3 (1,83)	N/N
F10-1	115	152	137 (90,13)	12 (7,89)	3 (1,97)	N/N
F11-2	116	162	155 (95,68)	6 (3,70)	1 (0,62)	N/N
F12-1	112	150	146 (97,33)	4 (2,67)	0	N/N
F13-2	113	178	163 (91,57)	11 (6,18)	4 (2,25)	N/N
\bar{x} (SD)			95,63 (2,19)	3,07 (1,95)	1,30 (1,11)	

N: normal

La freqüència mitjana d'haplotips normals en els progenitors transmissors de la deleció 22q11.2 va ser de 95,38%, amb una SD de 2,00 i un rang de 91,72 a 99,02%. La freqüència mitjana d'haplotips que presentaven la inversió va ser de 3,61, amb una SD de 2,11 i un rang de 0 a 7,84% (Taula 10).

Taula 10. Resultats de l'estudi de la inversió LCR22-A/LCR22-D en la població d'estudi.

Codi	Nuclis	Haplotips informatius	Haplotips			Genotip
			Normal (%)	Inversió (%)	Altres (%)	
DG1P	77	103	100 (97,09)	3 (2,91)	0	N/N
DG2P	112	119	116 (97,48)	0	3 (2,52)	N/N
DG3P	86	102	101 (99,02)	1 (0,98)	0	N/N
DG6P	103	110	104 (94,55)	3 (2,73)	3 (2,73)	N/N
DG7M	78	103	101 (98,06)	2 (1,94)	0	N/N
DG8P	93	102	101 (99,02)	0	1 (0,98)	N/N
DG10P	93	102	97 (95,10)	2 (1,96)	3 (2,94)	N/N
DG11M	80	101	96 (95,05)	2 (1,98)	3 (2,97)	N/N
F01-2	104	144	138 (95,83)	4 (2,78)	2 (1,39)	N/N
F02-2	122	177	174 (98,31)	3 (1,69)	0	N/N
F03-2	101	151	143 (94,70)	5 (3,31)	3 (1,99)	N/N
F04-2	89	126	121 (96,03)	3 (2,38)	2 (1,59)	N/N
F05-1	107	153	146 (95,42)	4 (2,61)	3 (1,96)	N/N
F08-2	101	123	118 (95,93)	5 (4,07)	0	N/N
F09-2	122	157	144 (91,72)	9 (5,73)	4 (2,55)	N/N
F10-2	106	157	151 (96,18)	5 (3,18)	1 (0,64)	N/N
F11-1	124	178	169 (94,94)	9 (5,06)	0	N/N
F12-2	104	157	144 (91,72)	12 (7,64)	1 (0,64)	N/N
F13-1	111	158	152 (96,20)	3 (1,90)	3 (1,90)	N/N
F14-1	83	106	100 (94,34)	6 (5,66)	0	N/N
F15-1	71	116	111 (95,69)	4 (3,45)	1 (0,86)	N/N
F16-2	73	107	100 (93,46)	7 (6,54)	0	N/N
F17-2	79	102	94 (92,16)	8 (7,84)	0	N/N
F18-2	66	100	95 (95,00)	3 (3,00)	2 (2,00)	N/N



F19-1	66	108	100 (92,59)	7 (6,48)	1 (0,093)	N/N
F20-2	64	103	98 (95,15)	5 (4,85)	0	N/N
F21-2	63	110	106 (96,36)	4 (3,64)	0	N/N
F22-1	75	109	101 (92,66)	7 (6,42)	1 (0,92)	N/N
F23-2	75	104	100 (96,15)	4 (3,85)	0	N/N
\bar{x} (SD)			95,38 (2,00)	3,61 (2,11)	1,02 (1,07)	

N: normal

A nivell poblacional no es van observar diferències significatives entre la freqüència mitjana de l'haplotip que presentava la inversió entre els progenitors transmissors de la deleció i la població control (t Student, $p=0,368$).

A nivell individual, es va comparar la freqüència de la inversió de la regió 22q11.2 de cada progenitor transmissor de la deleció amb el conjunt de la població control, mitjançant el test exacte de Fisher. En cap família es va observar un valor de p estadísticament significatiu. A més, cap individu va mostrar un percentatge de l'haplotip invertit fora del rang de normalitat establert a la població control (IC 99%=1,81-4,33) (Taula 10). Com a conseqüència, es va inferir que tots els progenitors transmissors presentaven un genotip normal (N/N).

4.4. MOSAÏCISME

Es van analitzar 500 nuclis interfàsics per cada un dels 27 individus control i dels 28 progenitors transmissors de la deleció. En total es van analitzar 13.575 nuclis interfàsics per la població control i 14.095 pels progenitors transmissors.

Respecte a la població control, la freqüència mitjana de nuclis interfàsics normals va ser de 87,79%, amb una SD de 4,86 i un rang de 76,60 a 96,40%. La freqüència mitjana de nuclis que presentaven la deleció de la regió 22q11.2 va ser de 4,00%, amb una SD de 1,89 i un rang de 1,53 a 7,94% (Taula 11).

Taula 11. Resultats de mosaïcisme somàtic en la població control.

Codi	Normal (%)	Deleció 22q11.2 (%)	Altres (%)	Total
DG1M	463 (92,60)	13 (2,60)	24 (4,80)	500
DG2M	450 (90,00)	16 (3,20)	34 (6,80)	500
DG3M	466 (93,20)	13 (2,60)	21 (4,20)	500
DG6M	449 (89,80)	23 (4,60)	28 (5,60)	500
DG8M	435 (87,00)	28 (5,6)	37 (7,40)	500
DG10M	455 (91,00)	12 (2,40)	33 (6,60)	500
DG11P	441 (88,20)	15 (3,00)	44 (8,80)	500
F01-1	480 (96,00)	9 (1,80)	11 (2,20)	500
F02-1	473 (94,6)	11 (2,20)	16 (3,20)	500
F03-1	427 (85,23)	31 (6,19)	43 (8,58)	501
F04-1	446 (89,20)	21 (4,20)	33 (6,60)	500
F05-2	441 (88,20)	22 (4,40)	37 (7,40)	500
F08-1	482 (96,40)	9 (1,80)	9 (1,80)	500
F09-1	448 (89,60)	26 (5,20)	26 (5,20)	500
F10-1	450 (90,00)	11 (2,20)	39 (7,80)	500
F11-2	452 (90,40)	9 (1,80)	39 (7,80)	500
F12-1	431 (83,85)	21 (4,09)	62 (12,06)	514
F13-2	427 (82,91)	15 (2,91)	73 (14,17)	515
F14-2	422 (82,42)	26 (5,08)	64 (12,50)	512
F16-1	461 (87,98)	8 (1,53)	55 (10,49)	524
F17-1	437 (86,71)	14 (2,78)	53 (10,51)	504
F18-1	409 (79,88)	42 (8,20)	61 (11,92)	512
F19-2	417 (82,74)	40 (7,94)	47 (9,32)	504
F20-1	414 (81,02)	33 (6,46)	64 (12,52)	511
F21-1	433 (88,19)	23 (4,68)	35 (7,13)	491
F22-2	383 (76,60)	31 (6,20)	86 (17,20)	500



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

F23-1	422 (86,65)	21 (4,31)	44 (9,04)	487
\bar{x} (SD)	87,79 (4,86)	4,00 (1,89)	41,41 (3,67)	

La freqüència mitjana de nuclis interfàsics normals en els progenitors transmissors de la deleció va ser de 85,24%, amb una SD de 16,46 i un rang de 6,40 a 96,00%. La freqüència mitjana de nuclis que presentaven la deleció de la regió 22q11.2 va ser de 6,68%, amb una SD de 14,90 i un rang de 0,79 a 82,20% (Taula 12).

Taula 12. Resultats de mosaïcisme somàtic en la població d'estudi.

Codi	Normal (%)	Deleció 22q11.2 (%)	Altres (%)	Total
DG1P	454 (90,26)	12 (2,39)	37 (7,36)	503
DG2P	443 (88,60)	14 (2,80)	43 (8,60)	500
DG3P	450 (90,00)	31 (6,20)	19 (3,80)	500
DG6P	457 (91,40)	23 (4,60)	20 (4,00)	500
DG8P	483 (96,60)	8 (1,60)	9 (1,80)	500
DG10P	444 (88,80)	28 (5,60)	28 (5,60)	500
DG11M	440 (88,00)	14 (2,80)	46 (9,20)	500
F01-2	477 (95,40)	4 (0,80)	19 (3,80)	500
F02-2	480 (96,00)	12 (2,40)	8 (1,60)	500
F03-2	459 (91,80)	15 (3,00)	26 (5,20)	500
F04-2	444 (88,80)	26 (5,20)	30 (6,00)	500
F05-1	444 (88,80)	26 (5,20)	30 (6,00)	500
F08-2	464 (92,80)	17 (3,40)	19 (3,80)	500
F09-2	463 (92,60)	18 (3,60)	19 (3,80)	500
F10-2	456 (91,20)	14 (2,80)	30 (6,00)	500
F11-1	450 (90,00)	16 (3,20)	34 (6,80)	500
F12-2	438 (85,21)	13 (2,53)	63 (12,26)	514
F13-1	409 (79,88)	23 (4,49)	80 (15,63)	512
F14-1	412 (81,91)	29 (5,77)	62 (12,32)	503
F15-1	492 (95,72)	10 (1,95)	12 (2,33)	514

F16-2	419 (82,81)	23 (4,55)	64 (12,64)	506
F17-2	32 (6,40)	411 (82,20)*	57 (11,40)	500
F18-2	473 (92,93)	4 (0,79)	32 (6,28)	509
F19-1	442 (84,03)	38 (7,22)	46 (8,75)	526
F20-2	405 (79,41)	37 (7,25)	68 (13,34)	510
F21-2	382 (75,94)	21 (4,17)	100 (19,89)	503
F22-1	389 (77,49)	25 (4,98)	88 (17,53)	502
F23-2	414 (83,98)	27 (5,48)	52 (10,54)	493
\bar{x} (SD)	85,24 (16,46)	6,68 (14,90)	40,75 (4,81)	

* Increment significatiu respecte la població control

A nivell poblacional no es van observar diferències significatives entre la freqüència mitjana de nuclis interfàsics normals ni de la de nuclis amb la deleció de la regió 22q11.2, entre els progenitors transmissors i la població control (Test Mann Whitney, $p=0,726$ i $p=0,772$, respectivament).

En canvi, a nivell individual, la progenitora transmissora F17-2 va presentar un increment significatiu del percentatge de deleccions (Test exacte de Fisher, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$), que es trobava allunyat del rang de normalitat de la població control (IC 99% = 3,06-4,94) (Taula 12) i mostrava una OR de 110,39.

4.5. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA

Per a l'elaboració del panel de gens associats amb fenòmens de recombinació, es van identificar 10 processos biològics relacionats amb HR a la base de dades AmiGo 2 (Taula 13). Dels 521 gens associats als processos seleccionats, 334 eren comuns entre les diferents vies. Després de fer el triatge, el llistat definitiu va constar de 187 gens (Taula 4, Annex).

Taula 13. Relació de processos biològics relacionats amb recombinació homòloga i número de gens associats

Procés biològic	GO	Número de gens
Recombinació homòloga	0035825	79
Reparació de trencaments de doble cadena mitjançant recombinació homòloga	0000724	223
Recombinació mitòtica	0006312	34
Regulació positiva de la reparació de trencaments de doble cadena mitjançant recombinació homòloga	1905168	14
Regulació de la reparació de trencaments de doble cadena mitjançant recombinació homòloga	0010569	57
Regulació negativa de la reparació de trencaments de doble cadena mitjançant recombinació homòloga	2000042	25
Recombinació recíproca meiòtica	0007131	78
Punt de control de recombinació meiòtica	0051598	4
Processament de la forquilla de replicació mitòtica dependent de la recombinació	1990426	2
Reparació de trencaments de doble cadena implicats en la recombinació meiòtica	1990918	5

GO: número ontologia gènica

Els resultats de l'anàlisi de l'exoma en els 9 individus analitzats van identificar un total de 1.984.040 variants. Tal i com mostra la [Taula 14](#), es van realitzar 4 filtratges per a seleccionar les variants amb més evidències d'associació amb el fenomen de la NAHR:

- Filtratge 1: mitjançant la plataforma GINO, es van seleccionar 3.129 variants que complien els requisits de tenir una $MAF < 0,01$ i una significança clínica patogènica, probablement patogènica o VUS.
- Filtratge 2: es van seleccionar les variants que afectaven els gens que formaven part del panel establert. Es van identificar un total de 20 variants ([Taula 5, Annex](#)).
- Filtratge 3: es va analitzar el grau de patogenicitat de les variants tenint en compte els estàndards ACMG i AMP. Es van escollir variants classificades com a patogèniques, probablement patogèniques o VUS i les ponderades amb un grau de patogenicitat major, la qual cosa va permetre seleccionar 10 variants ([Taula 5, Annex](#)).
- Filtratge 4: la predicció de patogenicitat de les variants mitjançant anàlisis *in silico* va seleccionar un total de 6 variants ([Taula 6, Annex](#)).

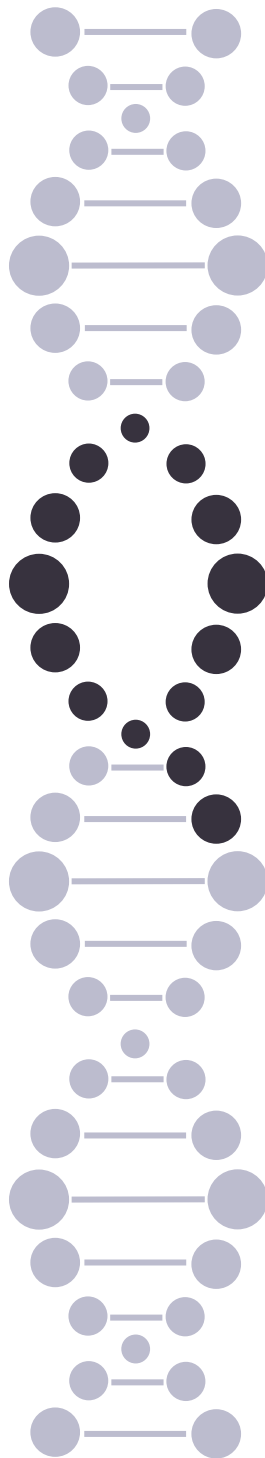
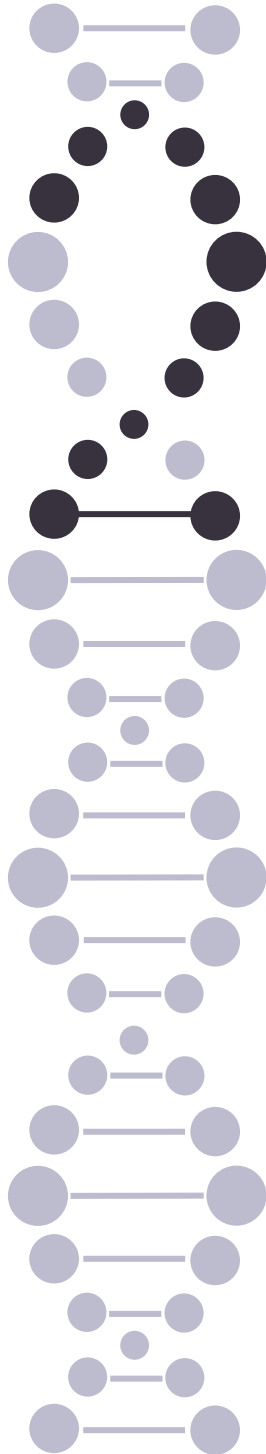
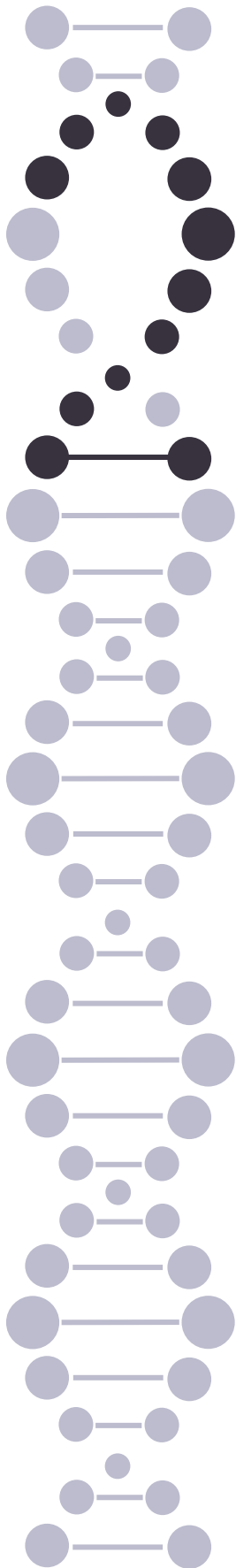
Taula 14. Procés de filtratge de les variants gèniques per a cada individu seqüenciat. Filtratge 1: potencial deleteri i $MAF < 0,01$. Filtratge 2: llistat de gens implicats en HR. Filtratge 3: criteris de patogenicitat de les guies ACMG. Filtratge 4: efecte del canvi nucleotídic i implicació filogenètica

Individu	Total variants	Filtratge 1	Filtratge 2	Filtratge 3	Filtratge 4
DG2P	238.867	360	2	1	0
DG6P	219.450	387	2	0	0
F02-2	217.050	335	3	3	2
F03-2	210.665	329	0	0	0
F04-2	197.821	309	3	1	1
F09-2	200.353	371	4	4	3
F10-1	223.834	330	1	0	0
F10-2	246.725	357	1	0	0
F14-1	229.275	351	4	1	0
Total	1.984.040	3.129	20	10	6

En la **Taula 15** es mostren les 6 variants gèniques resultants, totes elles pertanyents a tres de les mares transmissores analitzades.

Taula 15. Variants genètiques amb possible efecte patogènic en progenitors amb descendència afectada per la SD22q11.2

Variant	Individu	Gen	Posició	Regió	Zigositat	Canvi nucleotídic	Canvi proteic	Conseqüència molecular
rs4988345	F02-2	BRIP1	chr17:61847211	Exònica	Heterozigosi	c.517C>T	R173C	Missense
rs370882864	F02-2	LIG3	chr17:34991101	Exònica	Heterozigosi	c.1028G>A	R343Q	Missense
rs193211869	F09-2	PRDM9	chr5:23524407	Exònica	Heterozigosi	c.1024A>G	R342G	Missense
rs150866036	F09-2	RECQL5	chr17:75650638	3' UTR	Heterozigosi	c.*2T>A	-	Non coding transcript
rs147354564	F04-2	SHOC1	chr9:111756408	Exònica	Heterozigosi	c.587C>T	S196L	Missense
rs147220016	F09-2	TEX19	chr17:82362427	Exònica	Heterozigosi	c.277G>T	G93W	Missense



5. Discussió

5.1. MIDA, ORIGEN PARENTAL DE LA DELECIÓ I MOSAÏCISME

5.1.1. MIDA I ORIGEN PARENTAL DE LA DELECIÓ

La determinació de l'origen parental de la deleció 22q11.2 en el fill/a afecte/a s'ha realitzat amb la finalitat d'avaluar l'existència de diferències en la freqüència de transmissió de la deleció entre homes i dones. A més, en el cas dels pares ha servit per comprovar si hi havia una associació entre la freqüència de delecions 22q11.2 observades en espermatozoides i la presència de la deleció 22q11.2 en la descendència afecta. Tanmateix, el disseny de l'estudi per a la determinació de l'origen parental ha permès reconèixer la mida de la deleció que ocasiona la SD22q11.2 en cada família.

És conegut que existeixen diferències entre la recombinació meiòtica d'homes i dones. Les taxes de recombinació masculina tendeixen a ser més baixes i localitzades en posicions cromosòmiques terminals respecte la recombinació femenina (Bherer et al., 2017; Broman et al., 1998; Kong et al., 2002). D'altra banda, s'ha descrit l'existència de punts calents de recombinació específics que varien entre homes i dones (Coop et al., 2008; Duyzend et al., 2016). Aquestes característiques diferencials s'han relacionat amb el biaix parental que presenten alguns trastorns genòmics recurrents.

S'ha descrit un biaix patern en síndromes causades per reorganitzacions produïdes per la NAHR en regions properes als telòmers, com a la regió 4p16.3 causant de la síndrome de Wolf-Hirschhorn (Dallapiccola et al., 1993; Quarrell et al., 1991; Tupler et al., 1992; Wieczorek et al., 2000), o la regió 5q35.3 que dona lloc a la síndrome de Sotos (Miyake et al., 2003; Tatton-Brown et al., 2005). En canvi, en síndromes on la regió crítica es troba més a prop del centròmer, com la síndrome de la deleció proximal 16p11.2 o la de la microdeleció NF1, que afecta a la regió 17q11.2, s'ha descrit un clar biaix matern (Ainsworth et al., 1997; Duyzend et al., 2016; Lázaro et al., 1996; López Correa et al., 2000; Neuhäusler et al., 2018; Steinmann et al., 2008; Upadhyaya et al., 1998).

No obstant, aquesta relació no s'evidencia en tots els trastorns genòmics. En el cas de la síndrome de la deleció 1p36 s'esperaria un biaix patern, ja que la regió crítica es troba prop del telòmer, però s'ha descrit una transmissió materna preferent (Heilstedt et al., 2003; Shapira et al., 1997; Wu et al., 1999). De manera similar, en la síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipus 1A, en la qual s'ha descrit un biaix patern (Bort et al., 1997; Lee et al., 2020; Lopes et al., 1997; Palau et al., 1993; Wise et al., 1993), s'esperaria un biaix matern. A més a més, hi ha trastorns genòmics pels quals no s'ha descrit cap tipus de biaix parental, com és el cas de la síndrome de Williams (Baumer et al., 1998; Dutra et al., 2011; Hobart et al., 2010; Morris et al., 2015; Pérez-García et al., 2015; Thomas et al., 2006; Wu et al., 1998) o de la



síndrome de Smith-Magenis (Greenberg et al., 1991; Potocki et al., 2003), i en ambdós casos la regió crítica es situa prop del centròmer (Taula 5).

En el cas concret de la SD22q11.2, els resultats publicats fins al moment són contradictoris. Alguns autors han descrit un biaix matern que coincideix amb la localització centromèrica de la regió crítica (Bassett et al., 2008; Chung et al., 2001; Delio et al., 2013; Demczuk et al., 1995; Driscoll et al., 1992; Lu et al., 1999; Michaelovsky et al., 2008; Seaver et al., 1994; Torres-Juan et al., 2007), mentre que altres autors descriuen un nombre equivalent de casos amb origen matern i patern (Baumer & Riegel, 2004; Baumer et al., 1998; Eliez et al., 2001; Fokstuen et al., 1998; Morrow et al., 1995; Ryan et al., 1997; Saitta et al., 2004; Sandrin-Garcia et al., 2007; Thomas et al., 2006; Trost et al., 2000; Vittorini et al., 2001). Els nostres resultats segueixen aquesta línia ja que no s'han observat diferències significatives entre l'origen parental de la deleció 22q11.2.

Els resultats poc concloents i en alguns casos contradictoris descrits als paràgrafs anteriors poden estar associats a limitacions relacionades amb mides mostrals molt baixes. Amb la finalitat d'eliminar aquesta limitació vam realitzar una revisió bibliogràfica recollint els resultats publicats pels trastorns genòmics recurrents més freqüents (Taula 1). Pel que fa a la SD22q11.2, d'una població total de 866 individus afectats, un 56,35% del casos presentava un origen matern de la deleció 22q11.2 i un 43,65%, patern (Taula 3, Annex). L'anàlisi estadística va mostrar un increment significatiu de casos en què la deleció era d'origen matern. El mateix resultat es va observar en el cas de la síndrome de la deleció 16p11.2 i de la microdeleció NF1, ambdues amb localització centromèrica de la regió crítica. No obstant, el biaix observat en la SD22q11.2 té menor intensitat que el descrit en les altres síndromes analitzades (Taula 5), on el percentatge de casos amb origen matern és superior al 80% (81,82% en la síndrome de la microdeleció NF1 i 89,39% en la síndrome de la deleció proximal 16p11.2). D'altra banda, en síndromes amb regions crítiques properes a la regió telomèrica es va observar un biaix patern. El percentatge de casos amb origen patern també és superior al 80% (83,33% en la síndrome de Wolf-Hirschhorn, 87,63% en la síndrome de Cri du Chat i 87,80% en la síndrome de Sotos).

A mode de resum, tot i que alguns resultats indiquen una certa influència del sexe i la localització cromosòmica de la regió crítica sobre l'origen parental dels esdeveniments de NAHR, aquesta associació no s'observa en tots els casos i suggereix la participació d'altres factors en el resultat final.

L'estudi de l'origen parental també ha permès identificar la mida de la deleció que ocasiona la SD22q11.2 en la descendència. Entre els LCR22-A i LCR22-D es produeix la deleció majoritària, que representa 3 Mb del cromosoma 22. La segueix la deleció entre els LCR22-A i LCR22-B, que representa 1,5 Mb i causa la SD22q11.2 en el 7% dels casos (Carlson et al., 1997). La utilització de marcadors de

tipus microsatèl·lits situats al llarg de la regió delimitada pels LCR-A i LCR-D ha permès diferenciar els dos tipus de delecions en funció de la presència o absència dels marcadors. Els resultats observats s'ajusten als resultats esperats. La delecio de 3 Mb es va observar en 27 famílies i només dues famílies van presentar la delecio de 1,5 Mb.

5.1.2. MOSAÏCISME SOMÀTIC PARENTAL

Els progenitors de la nostra població d'estudi varen ser informats, per part dels centres hospitalaris que van aportar les mostres, com individus sense trets fenotípics relacionats amb la SD22q11.2. No obstant, amb la finalitat d'excloure la presència de mosaïcisme somàtic es va realitzar un estudi per analitzar la presència de delecions de la regió 22q11.2 en limfòcits dels progenitors transmissors de la delecio.

La majoria dels individus analitzats van mostrar percentatges de cèl·lules portadores de la delecio equivalents als descrits en població control i, per tant, es va excloure la presència de mosaïcisme com a causa de la delecio diagnosticada en la seva descendència. No obstant, es va observar que la progenitora transmissora de la família 17 presentava un alt grau de mosaïcisme (82,20%) per a la delecio 22q11.2.

Aquests resultats van ser comunicats al centre hospitalari que, en revisar el cas, va informar que l'individu presentava algunes característiques fenotípiques compatibles amb la SD22q11.2, com el nas tubular amb ales hipoplàsiques, lleugera blefarofimosis, dits allargats i lleugeres dificultats d'aprenentatge. Tal i com va descriure Van Hemel, els progenitors mosaics per la delecio 22q11.2 poden presentar un rang molt variable d'afectacions fenotípiques, i, molts cops, es diagnostiquen un cop s'ha detectat la delecio a la descendència (Van Hemel et al., 1995). Tot i que en alguns casos la presència de mosaïcisme per la SD22q11.2 és asimptomàtic i sol ser imperceptible, contribueix a l'aparició d'una delecio hereditària (Halder et al., 2008). En aquests casos s'assumeix que el risc de transmissió de les cèl·lules portadores de l'alteració és del 50% i, per tant, s'incrementa notablement el risc de transmissió i recurrència. En aquest sentit, s'han descrit altres casos de mosaïcisme somàtic per a la regió 22q11.2 en progenitors d'individus purs afectes per la SD22q11.2 (Chen et al., 2019; Kasprzak et al., 1998). També s'han descrit casos en què ambdues generacions presentaven mosaïcisme per la SD22q11.2 (Chen et al., 2004; Patel et al., 2006).

De fet, la situació de mosaïcisme descrita en la regió 22q11.2 també succeeix en altres situacions en què progenitors asimptomàtics d'individus afectes de trastorns genòmics presentaven mosaïcisme somàtic. Campbell descriu que el 4% dels progenitors amb descendència afectada per un trastorn genòmic recurrent presenten mosaïcisme somàtic per la reorganització transmesa (Campbell et al., 2014), un percentatge similar al descrit a la nostra població (1 de 29; 3,4%). Això indica la



importància de l'estudi de mosaïcisme en l'estimació del risc de recurrència i la millora de l'assessorament genètic que rebrien les famílies afectes.

5.2. FISH EN ESPERMATOZOIDES

L'estudi d'espermatozoides mitjançant la tècnica de FISH permet analitzar un gran nombre de cèl·lules de manera directa i individualitzada. Aquest fet permet valorar la freqüència d'anomalies cromosòmiques que es produeixen en baixa freqüència (Downie et al., 1997; Egozcue et al., 1997). La tècnica de FISH s'ha utilitzat per un ampli espectre d'estudis citogenètics en espermatozoides adreçats a determinar el risc de transmissió de determinades anomalies cromosòmiques a la descendència. Es tracta d'una tècnica adequada per a la valoració de delecions i duplicacions causades per esdeveniments de NAHR ja que permet avaluar el risc de transmissió així com el tipus de NAHR predominant que origina els gàmetes amb anomalies.

5.2.1. RISC DE TRANSMISSIÓ

En el conjunt de la població de pares amb descendència afecta per la SD22q11.2 no es va observar una susceptibilitat incrementada de generar delecions de la regió 22q11.2 en comparació amb la població control. No obstant, a nivell individual es van identificar quatre pares (DG2P, DG6P, F10-1, F14-1) amb un increment significatiu en el nombre de delecions de la regió 22q11.2 en els seus espermatozoides. En aquests individus, el risc de generar delecions es va estimar a partir de l'estadístic *Odds Ratio* entre 3 i 5 vegades superior al de la població control. Això indica que gairebé el 15% de les famílies analitzades en aquesta Tesi presenten un risc superior de transmissió i de recurrència i, conseqüentment, requeririen d'un procés d'assessorament genètic particular.

En aquest sentit, per determinar si en aquests individus la susceptibilitat a la NAHR es trobava focalitzada únicament a la regió 22q11.2, es va analitzar la freqüència de delecions en espermatozoides d'altres regions inestables del genoma, com la regió 7q11.23 i 15q11-q13, corresponents a la síndrome de Williams i la síndrome de Prader-Willi, respectivament. Els individus DG2P, DG6P i F14-1 no presentaven increment de delecions en les altres regions. Aquest fet indica que en aquests individus els factors de predisposició a la NAHR afecten preferentment la regió 22q11.2. En canvi, l'individu F10-1 presentava un increment de delecions per la regió 7q11.23 i 15q11-q13 la qual cosa ens suggereix un efecte generalitzat a la NAHR en aquest cas particular.

Finalment, vam relacionar l'increment de delecions en espermatozoides dels quatre pares amb la transmissió paterna de la deleció 22q11.2 a la descendència. En tres dels quatre casos els dos fets es van poder vincular (DG2P, DG6P i F14-1). Per contra, F10-1, malgrat ser el pare amb un increment més significatiu i mostrar una

NAHR generalitzada, no va ser el progenitor transmissor de la deleció. Aquest fet planteja dues possibilitats: (i) que la mare d'aquesta família també presenti una major susceptibilitat a la NAHR que hagi predisposat a la SD22q11.2 a la descendència, cosa que faria sospitar que la susceptibilitat a la NAHR es degui a una causa ambiental, o (ii) que, per probabilitat, la susceptibilitat a la NAHR del pare no estigui relacionada amb l'afectació de la SD22q11.2 de la descendència, ja que, tot i mostrar un increment de la freqüència de delecions en els espermatozoides, també presentava espermatozoides no portadors de delecions.

5.2.2. TIPUS DE NAHR

Les delecions es poden produir per dos mecanismes de NAHR que originen productes complementaris diferents. Una NAHR inter-cromàtide en LCR orientats de forma directa genera delecions i duplicacions, en canvi, una NAHR intra-cromàtide genera delecions i anells acèntrics (Gu et al., 2008).

Per a determinar la participació de la NAHR inter-cromàtide i/o intra-cromàtide en la generació de delecions 22q11.2, es va comparar la freqüència de delecions i la de duplicacions de la regió 22q11.2.

A nivell poblacional es va observar un increment significatiu de les delecions respecte les duplicacions ($p < 0,0001$), fet que indica la participació de la NAHR intra-cromàtide en la generació de delecions. L'anàlisi individual de les mostres va indicar que aquesta situació no es produeix en tots els casos. Només 8 dels 21 casos analitzats van mostrar diferències significatives entre la freqüència de delecions i la de duplicacions, fet que indica la participació de la NAHR intra-cromàtide en la generació d'anomalies. Cal destacar que quatre d'aquests individus es van classificar com a individus de risc. Així doncs, els nostres resultats apunten a un augment del fenomen de la NAHR intra-cromàtide en els individus que presenten un increment significatiu de delecions 22q11.2. Aquest fet també s'ha descrit en altres trastorns genòmics, com la síndrome de Prader-Willi (Molina et al., 2010), on s'ha atribuït la participació de la NAHR intra-cromàtide a l'increment de delecions de la regió crítica en pares transmissors.

5.2.3. AVALUACIÓ DELS FACTORS DE PREDISPOSICIÓ

5.2.3.1. INVERSIONS

Uns dels factors de predisposició estudiats va ser la inversió de la regió 22q11.2 en progenitors transmissors d'aquesta deleció. Tal i com s'ha observat en altres síndromes causades per microdelecions, com la síndrome de Williams (Hobart et al., 2010; Osborne et al., 2001; Scherer et al., 2005), la síndrome de Prader-Willi (Gimelli et al., 2003; Molina et al., 2012), la síndrome Smith-Magenis (Yang, Fi



guera, et al., 1997) o la síndrome de la deleció 17q21.31 (Rao et al., 2010), la presència d'una inversió en la regió crítica causant de la síndrome incrementa la probabilitat de que es produeixin fenòmens de NAHR. L'explicació a aquest fet és que la presència d'una inversió en heterozigosi pot originar geometries d'aparellament a paquetè que afavoririen fenòmens de NAHR (Feuk, 2010).

No obstant, els resultats de la nostra població descarten la presència de la inversió com a factor de predisposició i donen suport a resultats previs descrits per altres autors (Gebhardt et al., 2003; Saitta et al., 2004). De fet, tenint en compte totes les dades publicades i les descrites en aquesta Tesi, s'han analitzat un total de 69 progenitors transmissors de la SD22q11.2 i en cap cas s'ha identificat la inversió de 3 Mb com a factor de predisposició per a la SD22q11.2

Així doncs, la presència d'una inversió de la regió crítica que predisposi a reorganitzacions secundàries no ocorre en tots els trastorns genòmics i suggereix que la formació de la inversió d'una regió flanquejada per LCR es podria veure condicionada per les característiques arquitectòniques dels LCR involucrats.

5.2.3.2. EDAT

No hi ha consens sobre si l'edat paterna promou la inestabilitat genòmica. Alguns autors apunten un increment d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides (Asada et al., 2000; Bosch et al., 2003; Slotter et al., 2007) o de mutacions originades *de novo* (Kong et al., 2012) a mesura que s'incrementa l'edat de l'home. En canvi, altres autors determinen que l'edat té un efecte poc significatiu (Brandt et al., 2019; Kurahashi & Emanuel, 2001; Plastira et al., 2007). En aquesta línia, en un estudi sobre la generació *de novo* de translocacions recíproques entre els cromosomes 11 i 12 en espermatozoides, no es va observar un efecte de l'edat (Kato et al., 2007). Tampoc s'ha relacionat amb la freqüència de recombinació meiótica i la longitud del complex sinaptonemal (Lynn et al., 2002) ni amb la taxa de recombinació al·lèlica (Broman et al., 1998; Kong et al., 2004), ambdós fenòmens de naturalesa meiótica.

En la nostra població d'estudi, la freqüència de delecions, duplicacions i del sumatori de delecions i duplicacions de la regió 22q11.2 en espermatozoides no s'ha correlacionat amb l'edat dels individus. Aquestes dades recolzen els resultats d'altres autors en els quals no relacionen fenòmens de NAHR amb l'edat paterna. Sibbons no va trobar una associació entre l'edat paterna i la generació de reorganitzacions cromosòmiques originades per la NAHR (Sibbons et al., 2011). Tampoc es van observar diferències en l'efecte de l'edat entre controls i pares de fills afectes en regions flanquejades per LCR (Hehir-Kwa et al., 2011). En diferents trastorns genòmics, com la SD22q11.2 (Bassett et al., 2008; Delio et al., 2013; Saitta et al., 2004; Vergés et al., 2014), la síndrome de Prader-Willi (Kinoshita et al., 2019;

Molina et al., 2010), la síndrome de Wolf-Hirschhorn (Quarrell et al., 1991) i la síndrome de Sotos (Miyake et al., 2003), l'edat paterna no constitueix un factor de predisposició

5.2.3.3. PRESENCIA DE VARIANTS GÈNIQUES PATOGENIQUES

La HR i la NAHR es produeixen a partir de la mateixa maquinària cel·lular (Hurles & Lupski, 2006). Per tant, la presència de variants gèniques en gens implicats en la HR podrien originar productes no funcionals o menys eficients que podrien generar patrons de recombinació diferents i incentivar fenòmens de NAHR. A mode d'exemple, en alguns trastorns genòmics, s'ha suggerit que determinades variants al·lèliques de *PRDM9* modularien la recombinació meiótica, esdevenint un factor de predisposició (Berg et al., 2010; Borel et al., 2012). Altres autors han indicat que la taxa de recombinació es podria veure modulada per variants gèniques de *RNF212* (Chowdhury et al., 2009; Fledel-Alon et al., 2011; Kong et al., 2008).

Així doncs, l'anàlisi de la presència de variants gèniques en els pares considerats de risc ens podria permetre vincular els increments significatius de la freqüència de delecions de la regió 22q11.2 en espermatozoides identificats amb fenòmens de NAHR alterats. Especialment aportaria una major claredat a entendre la susceptibilitat a la NAHR generalitzada que presenta l'individu F10-1. D'altra banda, en el cas de les mares transmissores, i davant la impossibilitat d'analitzar els oòcits per comprovar la susceptibilitat a la NAHR durant l'oogènesi, l'anàlisi de les variants podria ser una eina en la identificació de mares amb un increment del risc de transmissió.

Del total de variants gèniques identificades, i després dels diferents filtratges aplicats, es van seleccionar 6 variants amb una possible associació amb el fenomen de la NAHR. Totes les variants es presentaven en heterozigosi, cinc es van identificar en regions exòniques i van generar un canvi *missense*, mentre que la variant restant es va anotar a la regió 3'UTR del gen.

La variant corresponent al gen *PRDM9* es va localitzar en la progenitora F09-2 i consisteix en un canvi d'adenina per guanina, que causa un canvi aminoacídic d'arginina per glicina al domini metilasa PR/SET (Figura 12). Aquest canvi és considerat deleteri per les bases de dades SIFT, PolyPhen2, PROVEAN, CADD, DANN, Mutation Taster i PhyloP.

Quan *PRDM9* s'uneix al DNA, aquest domini permet la trimetilació de la histona H3 de la regió. Això esdevé en la separació dels nucleosomes, que permeten una configuració favorable per iniciar la formació de DSB mitjançant SPO11 (Baker et al., 2014).

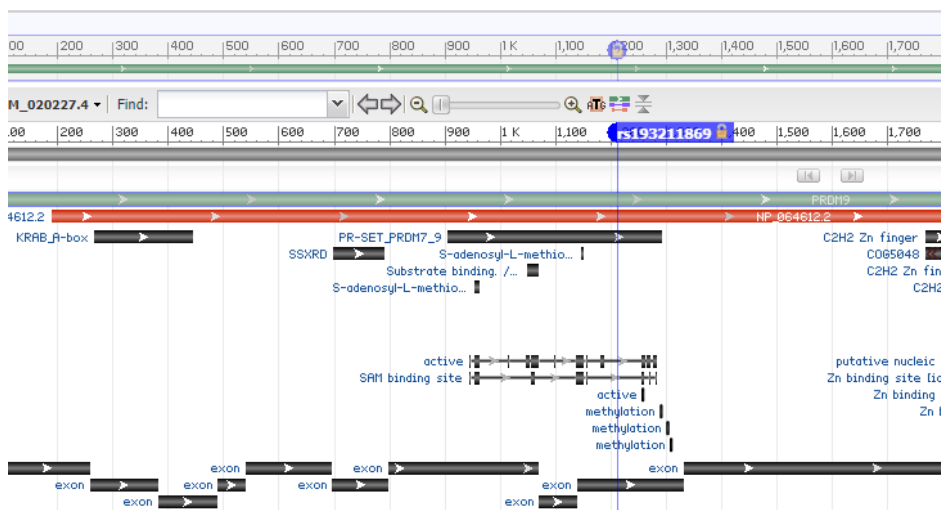


Figura 12. Localització de la variant gènica rs193211869 en *PRDM9* (Base de dades NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_020227.4?report=graph)

Així doncs, *PRDM9* determina els llocs programats de DSB i els punts calents de la recombinació meiótica (Keeney et al., 2018). S'ha descrit que la formació dels DSB per *SPO11* ocorre després de l'actuació de *PRDM9*. No obstant, les marques de metilació produïdes pel domini metilasa de *PRDM9* es mantenen presents al llarg de la resolució i reparació dels DSB, i s'han relacionat amb la migració de les HJ (Baker et al., 2014; Powers et al., 2016).

Tal i com s'observa en la **Figura 13**, a partir de la base de dades STRING es pot observar la relació directa de la proteïna *PRDM9* amb altres proteïnes. Les xarxes d'interacció proteïna-proteïna són importants per a la comprensió dels processos cel·lulars que es poden veure compromesos com a conseqüència de disfuncions proteiques. En aquest sentit, la proteïna *PRDM9* es relaciona amb diferents histones, però també amb *SPO11*. Així doncs, una alteració de *PRDM9* podria afectar la funció de *SPO11* i condicionar el fenomen de recombinació homòloga, incentivant la NAHR. De fet, s'han descrit variacions al·lèliques d'altres dominis funcionals de la proteïna *PRDM9* associats a la NAHR de les regions crítiques de la síndrome de Williams (Borel et al., 2012) i la SD22q11.2 (Vergés et al., 2017).

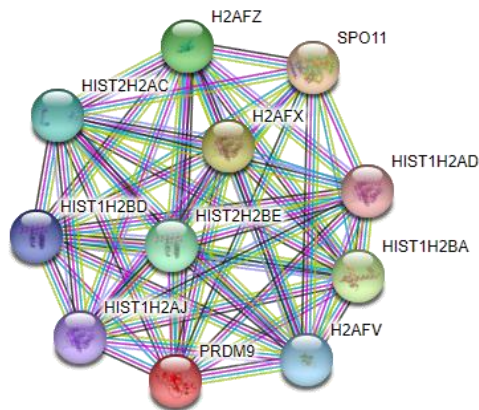


Figura 13. Xarxa de les interaccions de la proteïna PRDM9 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bLMX4eqQ5LcH&input_page_show_search=off)

La progenitora F09-2 també va presentar una variant en la regió 3'UTR del gen *RECQL5* com a conseqüència d'un canvi nucleotídic de adenina per timina. Tot i que d'aquesta variant no consten dades en les diferents bases de dades de predicció de patogenicitat, és important remarcar que les regions UTR governen l'expressió gènica i regulen l'estabilitat i traducció dels mRNA (Mayr, 2019), per tant, variants en aquestes regions poden comprometre la funcionalitat dels gens associats.

El gen *RECQL5* és una helicasa important per a l'estabilitat del genoma. Davant d'una HR aberrant, desplaça *RAD51* del ssDNA i evita l'intercanvi de cromàtides germanes i la HR. En ratolins s'ha observat que la manca de *RECQL5* incrementa els DSB i la recombinació homòloga generant reordenaments cromosòmics (Hu et al., 2007).

La presència d'aquesta variant podria comprometre la funcionalitat dels gens amb els que es relaciona directa o indirectament (Figura 14) i fomentar esdeveniments de NAHR. Per exemple, podria inferir en *RAD51*, necessari per a l'intercanvi de cadenes i cerca d'homologia; o *BRCA1*, la qual competeix amb *TP53BP1* per utilitzar la via de reparació HR o d'unió d'extremes no homòlegs (NHEJ), respectivament.

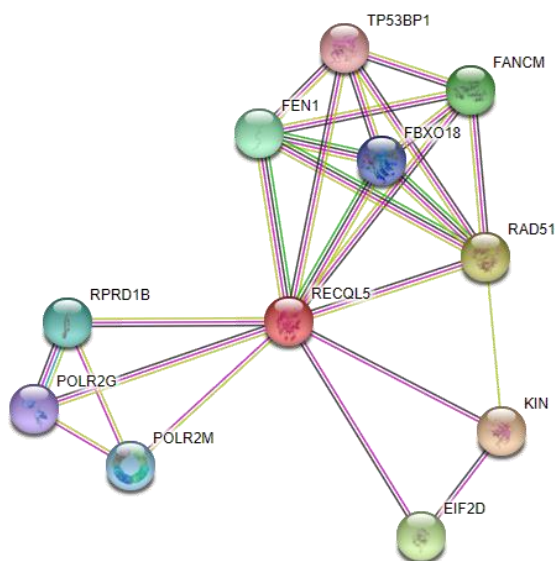


Figura 14. Xarxa de les interaccions de la proteïna RECQL5 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bLMX4eqQ5LcH&input_page_show_search=off)

La tercera variant identificada en la progenitora F09-2 es va anotar al gen *TEX19*. Aquesta variant s'origina per un canvi de glicina a triptòfan degut a un canvi nucleotídic de guanina per timina. SIFT, PolyPhen2, PROVEAN i CADD classifiquen com a deleteri aquest canvi. El gen *TEX19* és requerit durant l'espermatogènesi i el desenvolupament de la placenta, participant en el reclutament d'elements genètics mòbils i evitant la seva mobilització. A més, durant l'espermatogènesi i juntament amb *UBR2*, promou punts de recombinació dependents de *SPO11*, per assegurar similitud entre les seqüències i impulsar la sinapsi cromosòmica entre seqüències homòlogues. No hi ha estudis en humans sobre aquest gen, però sí que s'ha estudiat el seu sinònim (*Tex19.1*) en ratolins. S'ha descrit que la manca de *Tex19.1* en mascles s'associa amb defectes en la recombinació meiótica que condueixen a l'asinapsi cromosòmica i a la mort de cèl·lules germinals masculines (Crichton et al., 2017; Öllinger et al., 2008). El gen *TEX19* inhibeix la ubiquïtina *UBR2* per impulsar la sinapsi cromosòmica. En un estudi recent, s'ha observat que en ratolins *knock-out* per *Tex19.1* s'activa *UBR2* promovent la degradació de la cohesina ac.SMC3 als proteosomes. Aquest fet augmenta el risc de generar aneuploidies en els oòcits dels ratolins durant la meiosi (Reichmann et al., 2020).

Així doncs, la presència d'aquesta variant gènica a *TEX19* podria comprometre la seva funció i la de *UBR2* (Figura 15), promovent una incorrecta sinapsi cromosòmica que podria predisposar a la NAHR.

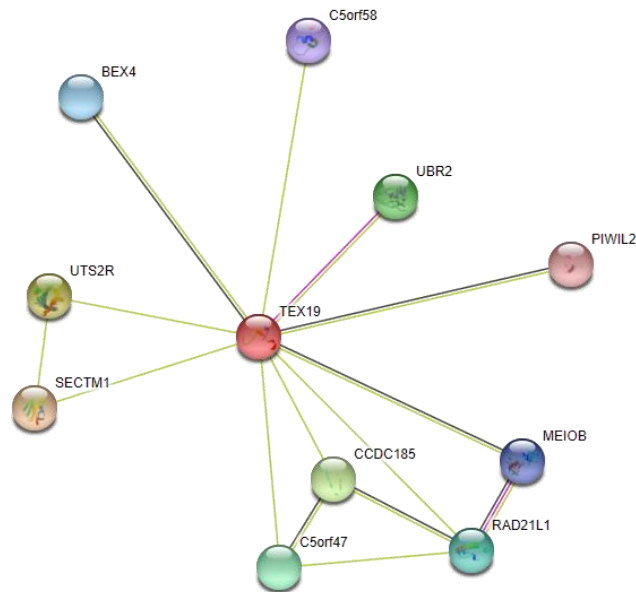


Figura 15. Xarxa de les interaccions de la proteïna TEX19 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bLMX4eqQ5LcH&input_page_show_search=off)

En la progenitora F02-2 es van identificar dues variants, una d'elles possiblement patogènica, corresponent al gen *BRIP1*, també conegut com *FANCF*. Aquesta es produeix per un canvi de guanina per adenina, que deriva en un canvi d'arginina a cisteïna. Aquesta alteració és considerada deletèria per SIFT, PolyPhen2, Fathmm-MKL, Mutation Taster, CADD, i DANN.

BRIP1 juga un paper determinant en la reparació de DSB mitjançant la HR a través de la seva interacció amb *BRCA1* (Awate et al., 2020; Nath & Nagaraju, 2020; Fan Zhang et al., 2010). A més, donat que és una helicasa de DNA, pot desenrotllar el dsDNA en els punts on s'hagi produït dany i pot cooperar amb l'aparellament homòleg dependent de *RAD51* (Zhang et al., 2009). La presència d'una variant gènica podria comprometre la HR degut a l'estreta relació de *BRIP1* amb gens claus en vies de reparació de DSB (Figura 16), i fomentar la NAHR.

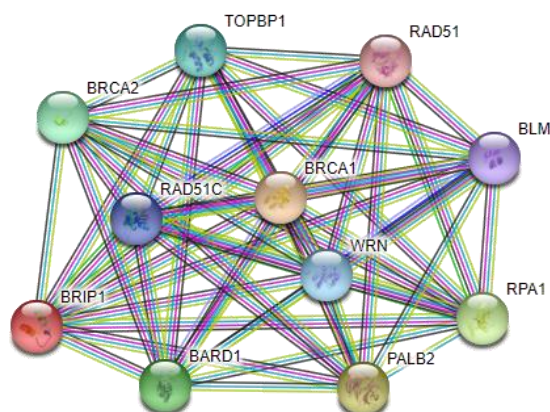


Figura 16. Xarxa de les interaccions de la proteïna BRIP1 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bLMX4eqQ5LcH&input_page_show_search=off)

L'altra variant pertany al gen *LIG3* i es produeix per un canvi de guanina per adenina, generant un canvi aminoacídic d'arginina a glutamina. És considerada deletèria per Fathmm-MKL, Mutation Taster, CADD i DANN i possiblement patogènica per PolyPhen2. Aquest gen es troba involucrat en la reparació per escissió de bases. Hi ha estudis que recalquen la importància de *LIG3* en la reparació de trencaments del DNA (Kohutova et al., 2019; Puebla-Osorio et al., 2006).

Es relaciona directament amb altres gens amb un paper important en la reparació de DSB, com són XRCC1 o RPA1 (Figura 17). El fet de presentar una variant genètica en el gen *LIG3* podria inferir en major o menor mesura en l'elecció de quina via utilitzar per a reparar els DSB.

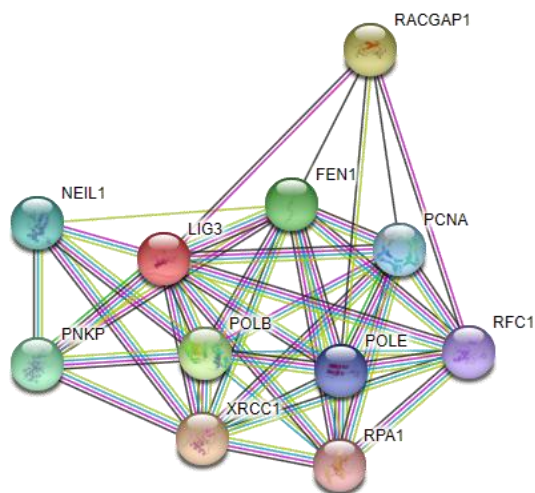


Figura 17. Xarxa de les interaccions de la proteïna LIG3 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bLMX4eqQ5LcH&input_page_show_search=off)

A la mare F04-2 es va identificar una variant del gen *SHOC1* generada per un canvi guanina per adenina que comporta un canvi aminoacídic de serina per leucina. Aquest canvi el classificuen com a deleteri els algorismes SIFT, Fathmm-MKL, CADD i DANN, i com a probablement patogènic per PolyPhen2. *SHOC1* és necessari durant la meiosi per a la formació de CO durant la HR. L'absència de *SHOC1* en ratolins resulta en una recombinació meiòtica deficient, que acaba, en últim terme, amb la transmissió incorrecta en el nombre de cromosomes a la següent generació (Guiraldelli et al., 2018). Darrerament, s'han relacionat variants gèniques de *SHOC1* amb la azoospermia no obstructiva (Yao et al., 2020).

Respecte a l'individu F10-1, el qual presentava una susceptibilitat generalitzada de la NAHR, no es va detectar cap variant gènica patogènica relacionada amb el procés de HR. No obstant, tenint en compte els resultats de l'anàlisi de FISH en espermatozoides d'aquest pare vam considerar convenient ampliar l'estudi a tot l'exoma per si presentava alguna altra variant de risc que es pogués associar a una susceptibilitat generalitzada de la NAHR. De les 330 variants resultants al primer filtratge, se'ls va aplicar el filtratge 3 i 4 per identificar variants amb potencial patogènic i només vam identificar una variant anotada a l'helicasa de RNA *DHX35*. Aquesta variant es produïa per un canvi d'una guanina a una citosina, generant un canvi *missense* de valina per leucina. Era exònica, es trobava en heterozigosi i es classificava com a VUS. Els predictors CADD, DANN, Fathmm-MKL i Mutation Taster la van classificar com a patogènica, mentre que PolyPhen2 ho va fer com a possiblement patogènica.

Les proteïnes d'aquesta família helicases de RNA es troben implicades en una sèrie de processos cel·lulars que impliquen l'alteració de l'estructura secundària del RNA. A més, es creu que poden estar involucrats en l'embriogènesi, l'espermatogènesi i el creixement i divisió cel·lular. Fins el moment no s'ha descrit cap conseqüència clínica d'aquesta variant ni s'ha associat aquest gen a una malaltia o alteració. No obstant, les helicases de RNA actuen mantenint l'estabilitat del DNA de la línia germinal i, recentment, s'ha descrit que variants gèniques d'aquestes poden relacionar-se amb la infertilitat masculina quan actuen durant l'espermatogènesi (Tutak et al., 2020).

L'anàlisi de la xarxa d'interacció de *DHX35* indica la seva relació funcional amb *PRPF19* (Figura 18). *PRPF19* és una ligasa que ubiquïtina directament RPA1, important en la reparació de DSB. També pot desenvolupar un paper en la reparació de DSB al reclutar el factor de reparació SETMAR. A més, junt amb CDC5L formen un complex que actua en la reparació del dany del DNA.

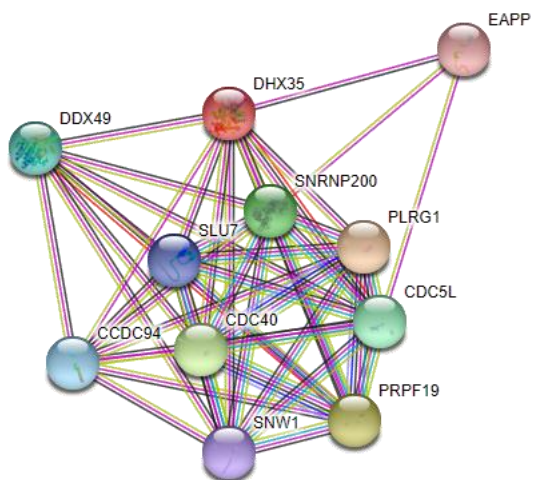
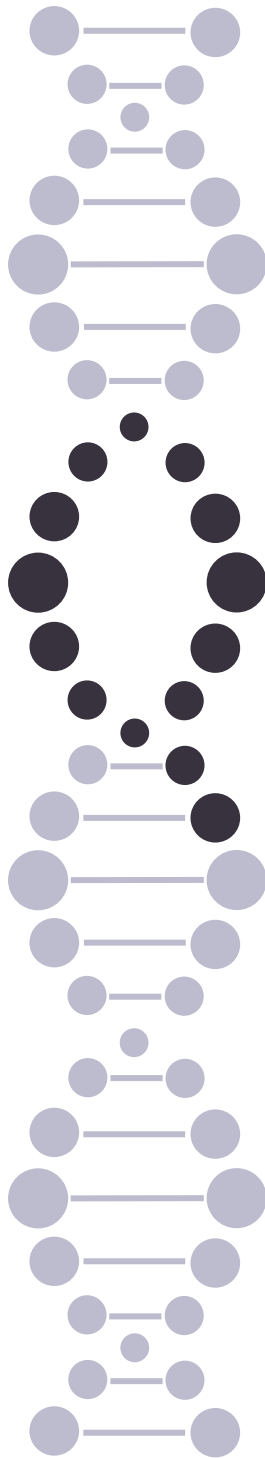
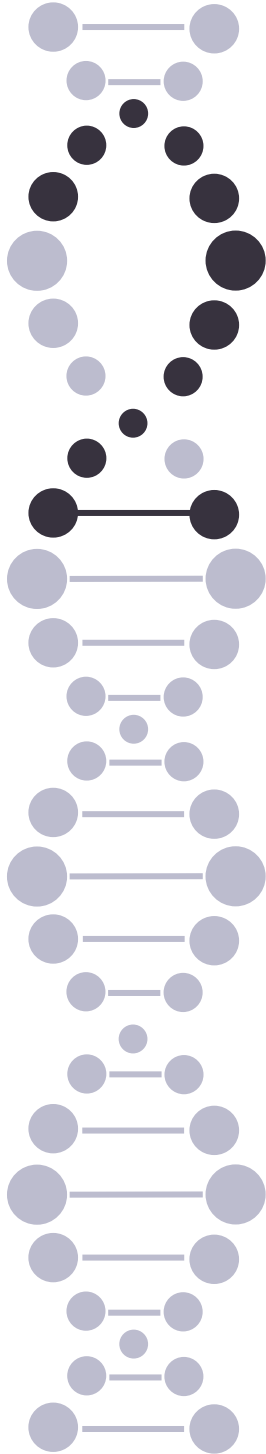
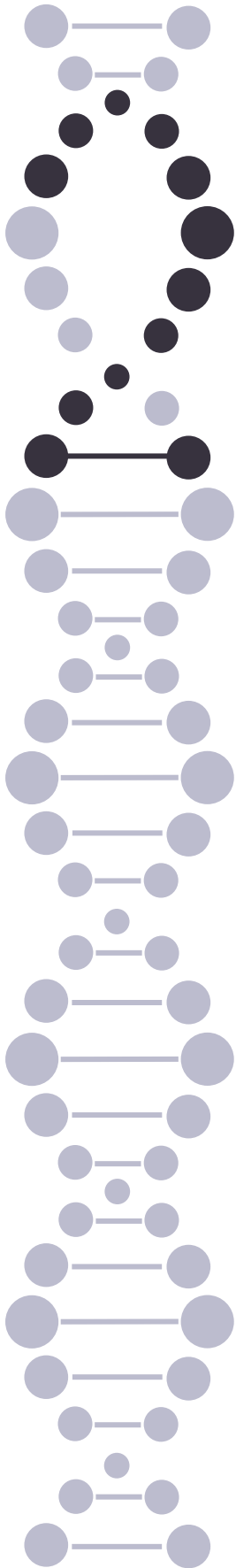


Figura 18. Xarxa de les interaccions de la proteïna RECQL5 amb altres proteïnes (Base de dades STRING, <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bANeeU9Et1YA&sessionId=bk6uNkW3LoUi>)

Així doncs, els nostres resultats aporten un llistat de variants genètiques candidates a incrementar la susceptibilitat a la NAHR. El següent pas serà realitzar estudis funcionals per a poder establir una correlació genotip-fenotip i demostrar una relació inequívoca entre les variants i la predisposició a la NAHR.



6. Conclusions



Primera

La SD22q11.2 presenta un biaix matern en la taxa de transmissió de la delecio a la descendència.

Segona

Els trastorns genòmics que impliquen regions cromosòmiques terminals presenten un origen preferentment patern, mentre que els que impliquen regions més intersticials presenten un origen preferentment matern.

Tercera

El mosaïcisme somàtic per la delecio 22q11.2 constitueix un factor de risc de transmissió de la SD22q11.2 en la població analitzada. L'anàlisi del grau de mosaïcisme en famílies amb descendència afecta d'un trastorn genòmic permetria identificar famílies de risc.

Quarta

La freqüència de delecions de la regió 22q11.2 en espermatozoides es troba incrementada en 4 dels 21 pares transmissors de la SD22q11.2 analitzats com a conseqüència d'una major susceptibilitat a la NAHR intra-cromàtide.

Cinquena

La susceptibilitat a la NAHR pot tenir un efecte limitat a la regió 22q11.2 o presentar un efecte generalitzat a altres regions del genoma amb arquitectures genòmiques similars i caracteritzades per la presència de LCR.

Sisena

Tres dels quatre pares amb increments de delecions en espermatozoides varen transmetre la delecio 22q11.2 a la seva descendència, la qual cosa confirma que aquests individus presenten un risc incrementat de transmissió i recurrència.

Setena

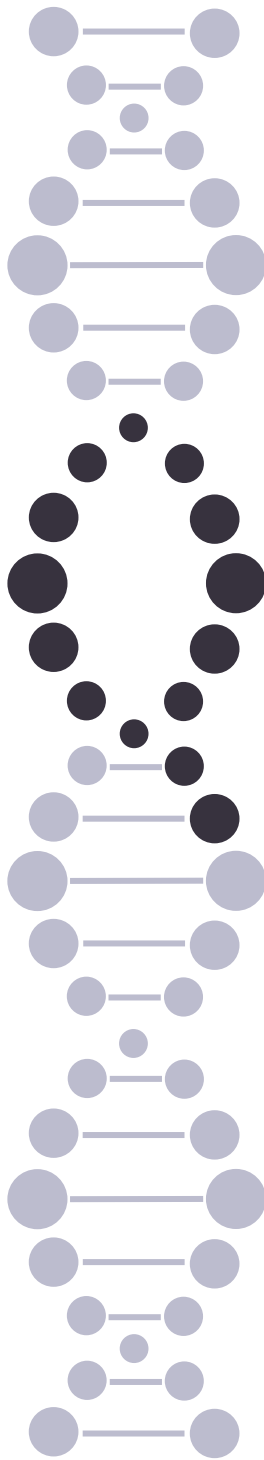
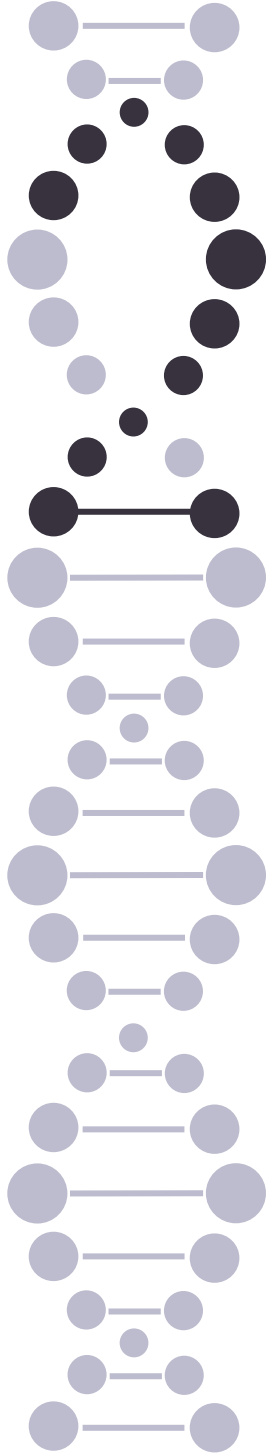
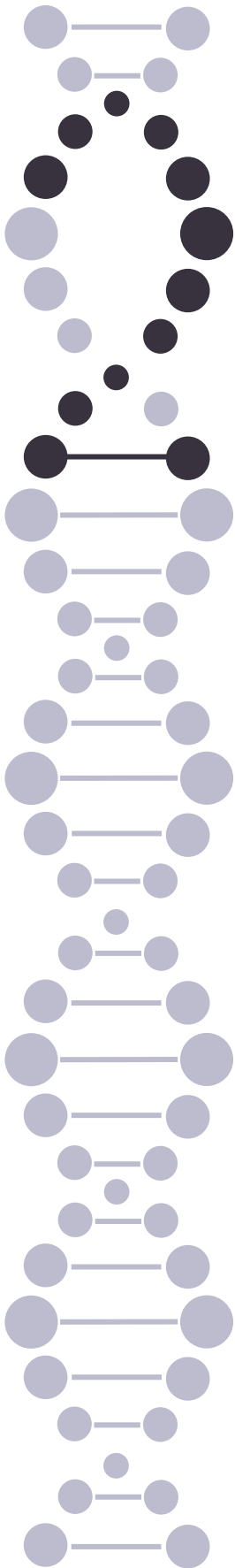
L'absència de l'haplotip de la inversio LCR22-A/LCR22-D exclou la implicació d'aquest polimorfisme com a factor de predisposicio de la SD22q11.2.

Vuitena

L'edat paterna no és un factor de susceptibilitat a la NAHR de la regió 22q11.2.

Novena

S'han identificat variants dels gens *BRIP1*, *LIG3*, *PRDM9*, *RECQL5*, *SHOC1* i *TEX19* potencialment associades a una major susceptibilitat a la NAHR.



Annex

Taula 1. Dades del DNA genòmic de les 29 famílies amb descendència afectada per la SD22q11.2

Cas	[] (ng/µl)	Puresa (A _{260/280})	Cas	[] (ng/µl)	Puresa (A _{260/280})	Cas	[] (ng/µl)	Puresa (A _{260/280})
DG1P	219,00	1,63	F02-3	1120,8	1,87	F14-2	396,63	1,89
DG1M	212,00	1,86	F03-1	243,55	1,80	F14-3	59,23	1,89
DG1F	145,3	1,68	F03-2	413,20	1,85	F15-1	324,47	1,90
DG2P	88,80	1,81	F03-3	695,10	1,82	F15-2	286,60	1,90
DG2M	109,10	1,72	F04-1	330,50	1,86	F15-3	537,67	1,88
DG2F	186,00	1,85	F04-2	271,90	1,87	F16-1	277,13	1,89
DG3P	185,20	1,77	F04-3	185,27	1,87	F16-2	224,23	1,89
DG3M	434,30	1,68	F05-1	312,40	1,87	F16-3	324,37	1,86
DG3F	169,5	1,86	F05-2	363,70	1,88	F17-1	110,43	1,90
DG6P	223,7	1,88	F05-3	201,40	1,85	F17-2	69,37	1,92
DG6M	754,75	1,83	F08-1	215,77	1,86	F17-3	321,73	1,96
DG6F	951,80	1,88	F08-2	86,20	1,87	F18-1	122,33	1,89
DG7P	57,10	1,89	F08-3	167,83	1,84	F18-2	86,33	1,91
DG7M	299,00	1,87	F09-1	412,50	1,89	F18-3	339,13	1,93
DG7F	111,30	1,80	F09-2	649,50	1,86	F19-1	173,87	1,88
DG8P	330,2	1,87	F09-3	349,60	2,07	F19-2	5,40	1,98
DG8M	332,5	1,77	F10-1	362,73	1,89	F19-3	413,07	1,95
DG8F	522,70	1,81	F10-2	379,90	1,89	F20-1	6,50	2,33
DG10P	358,00	1,85	F10-3	250,00	1,94	F20-2	2,17	3,42
DG10M	304,00	1,87	F11-1	401,27	1,89	F20-3	738,53	1,92
DG10F	144,70	1,76	F11-2	328,70	1,89	F21-1	167,53	1,85
DG11P	301,20	1,83	F11-3	756,80	1,90	F21-2	167,53	1,85
DG11M	366,90	1,87	F12-1	365,53	1,94	F21-3	231,1	1,88
DG11F	216,90	1,87	F12-2	144,33	1,88	F22-1	164,77	1,91
F01-1	404,98	1,67	F12-3	495,10	1,87	F22-2	206,20	1,91
F01-2	191,50	1,86	F13-1	23,40	2,75	F22-3	256,00	2,02
F01-3	484,03	1,88	F13-2	216,30	1,81	F23-1	14,83	1,97
F02-1	232,60	1,83	F13-3	636,00	1,85	F23-2	265,40	1,88
F02-2	301,85	1,86	F14-1	438,97	1,88	F23-3	305,07	1,98

[]: concentració



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

Taula 2. Origen parental i mida de la deleció de les 29 famílies amb descendència afectada per la SD22q11.2. En vermell s'indiquen els microsatèl·lits informatius

CAS	D22S1638	D22S1648	D22S264	D22S311	D22S303	Origen	Mida deleció
DG1P	114/116	174/174	185/195	251/251	220/222		
DG1M	116/116	174/174	195/195	250/256	222/223	patern	3 Mb
DG1F	116	174	195	256	220/223		
DG2P	116/116	170/172	195/203	250/250	212/222		
DG2M	116/116	172/172	201/201	250/257	212/222	patern	3 Mb
DG2F	116	172	201	257	222/222		
DG3P	99/105	174/178	193/199	256/256	220/223		
DG3M	116/116	174/174	193/199	256/259	222/224	patern	3 Mb
DG3F	116	174	193	259	220/224		
DG6P	116/120	174/174	195/201	250/256	224/225		
DG6M	116/118	174/174	188/203	256/256	224/226	patern	3 Mb
DG6F	-	174	203	256	224/226		
DG7P	105/116	174/174	187/191	250/250	222/222		
DG7M	109/109	173/178	185/193	250/254	222/222	matern	3 Mb
DG7F	116	174	191	250	222/222		
DG8P	109/120	174/174	185/199	250/250	222/224		
DG8M	114/116	174/174	199/205	254/257	212/224	patern	3 Mb
DG8F	116	174	199	254	212/224		
DG10P	114/114	174/174	187/199	252/256	213/223		
DG10M	109/116	174/174	199/201	250/256	223/225	patern	3 Mb
DG10F	116	174	199	256	223/223		
DG11P	116/116	174/174	199/201	250/256	212/222		
DG11M	111/122	170/171	187/191	250/254	222/222	matern	3 Mb
DG11F	116	174	201	256	212/222		
F01-1	107/114	170/172	194/202	249/255	221/221		
F01-2	103/103	171/172	192/200	249/249	212/221	matern	3 Mb
F01-3	107	172	-	255	221/221		
F02-1	107/109	172/172	198/198	249/255	212/212		
F02-2	109/114	172/172	-	248/250	212/212	matern	3 Mb
F02-3	109	172	198	249	212/212		
F03-1	103/110	171/171	195/200	249/255	221/221		
F03-2	103/116	171/171	185/200	249/255	210/212	matern	3 Mb
F03-3	110	171	195	255	212/221		
F04-1	111/116	172/172	190/192	257/257	222/222	matern	3 Mb



F04-2	109/114	172/172	192/194	249/259	210/212		
F04-3	116	172	-	257	212/222		
F05-1	103/114	171/172	186/195	249/255	221/221		
F05-2	107/114	171/172	195/201	249/255	221/221	patern	3 Mb
F05-3	114	172	201	255	221/221		
F08-1	103/114	171/171	194/204	249/255	212/221		
F08-2	108/108	171/171	-	249/253	212/223	matern	3 Mb
F08-3	114	171	204	255	212/212		
F09-1	114/119	172/174	-	249/255	222/222		
F09-2	110/110	172/172	195/198	255/257	212/220	matern	3 Mb
F09-3	114	172	-	255	212/222		
F10-1	110/114	172/176	192/202	249/249	212/223		
F10-2	112/116	155/171	185/195	249/255	223/223	matern	3 Mb
F10-3	110	176	202	249	212/223		
F11-1	114/114	172/172	195/200	253/253	221/221		
F11-2	107/114	171/172	184/198	251/261	221/221	patern	3 Mb
F11-3	107	172	198	251	221/221		
F12-1	112/114	172/172	-	249/255	212/221		
F12-2	103/114	172/172	-	237/253	219/221	matern	3 Mb
F12-3	114	172	-	255	221/221		
F13-1	114/114	172/172	186/198	249/249	221/221		
F13-2	114/114	171/171	201/201	251/259	212/221	patern	3 Mb
F13-3	114	171	-	251	221/221		
F14-1	112/112	171/172	194/200	237/249	221/221		
F14-2	107/116	171/172	200/200	255/255	221/221	patern	1,5 Mb
F14-3	107	171	194/200	249/255	221/221		
F15-1	112/112	171/176	196/202	249/255	223/223		
F15-2	108/108	171/176	195/200	249/249	212/221	patern	3 Mb
F15-3	108	176	200	249	221/221		
F16-1	114/114	172/172	198/198	247/255	212/212		
F16-2	103/114	172/172	195/200	257/261	212/221	matern	3 Mb
F16-3	114	172	198	247	212/221		
F17-1	105/114	171/172	-	249/255	212/223		
F17-2	103/103	171/172	185/198	255/255	212/221	matern	1,5 Mb
F17-3	105	172	185/198	249/255	221/223		
F18-1	114/114	171/171	194/202	249/255	212/221		
F18-2	103/103	171/171	195/198	249/255	221/222	matern	3 Mb
F18-3	114	171	202	255	212/221		



La síndrome de la deleció 22q11.2 com a model d'estudi per a l'anàlisi integral de factors genètics que predisposen a trastorns genòmics

F19-1	107/114	169/169	194/202	249/249	221/223		
F19-2	107/114	172/172	185/200	249/249	221/223	patern	3 Mb
F19-3	114	172	200	249	221/223		
F20-1	103/110	172/172	184/200	238/257	221/222		
F20-2	107/114	172/172	193/193	251/255	211/223	matern	3 Mb
F20-3	110	172	-	257	211/221		
F21-1	114/114	171/172	-	253/253	212/223		
F21-2	103/110	167/171	185/196	249/255	212/223	matern	3 Mb
F21-3	114	172	186	253	212/223		
F22-1	107/116	171/172	192/198	255/259	222/222		
F22-2	109/114	171/172	185/194	255/257	212/221	patern	3 Mb
F22-3	114	172	-	257	212/222		
F23-1	97/114	172/174	187/192	249/255	221/221		
F23-2	109/116	172/172	196/196	249/255	-	matern	3 Mb
F23-3	97	174	192	255	211/212		

Taula 3. Resultat de la revisió dels estudis que analitzen l'origen parental de la SD22q11.2

Articles	Total població	Origen matern	Origen patern
Bassett et al., 2008	60	36	24
Baumer et al., 1998	10	4	6
Baumer & Riegel, 2004	20	11	9
Chung et al., 2001	15	10	5
Delio et al., 2013	389	219	170
Demczuk et al., 1995	22	16	6
Driscoll et al., 1992	5	4	1
Eliez et al., 2001	18	9	9
Fokstuen et al., 1998	9	5	4
Lu et al., 1999	14	11	3
Michaelovsky et al., 2008	42	29	13
Morrow et al., 1995	15	8	7
Ryan et al., 1997	37	13	24
Saitta et al., 2004	65	35	30
Sandrin-Garcia et al., 2007	21	11	10
Seaver et al., 1994	5	4	1
Thomas et al., 2006	67	37	30
Torres-Juan et al., 2007	10	7	3
Trost et al., 2000	5	1	4
Vittorini et al., 2001	8	2	6
Estudi present	29	16	13
TOTAL	866	488	378
		56,35%	43,65%



Taula 4. Llistat de gens implicats en recombinació homòloga a data de 16/12/2020

ACTR2	HUS1	POLN	SHOC1
ANKRD31	HUS1B	POLQ	SIRT6
AP5S1	inip-ints3-nabp1_human	PPP4C	SIX6OS1
AP5Z1	inip-ints3-nabp2_human	PPP4R2	SLX1A
ARID2	INO80	PRDM7	SLX4
ATM	KASH5	PRDM9	SMC5
AUNIP	KDM1A	PSMC3IP	SMC6
BLM	KDM4D	PSMD14	SMCHD1
BRCA1	KLHDC3	RAD1	SPIDR
BRCA2	KLHL15	RAD21	SPO11
BRIP1	LIG3	RAD21L1	SWI5
btr_human	MAD2L2	RAD50	SWSAP1
CCNB1IP1	MAGEF1	RAD51	SYCE3
CDC45	MCM2	RAD51AP1	SYCP1
CDC7	MCM3	RAD51AP2	TEP1
CENPS	MCM4	RAD51B	TERF2
CENPX	MCM5	RAD51C	TERF2IP
CGAS	MCM6	RAD51D	TEX11
CHEK1	MCM7	RAD52	TEX15
CNTD1	MCM8	RAD54B	TEX19
CORT	MCM9	RAD54L	TIMELESS
DMC1	MCMDC2	RADX	TONSL
EME1	MEIOB	RBBP8	TOP2A
EME2	MLH1	REC8	TOP2B
ERCC1	MLH3	RECQL	TOP6BL
ercc1-xpf_human	MMS19	RECQL4	TP53BP1
ERCC2	MMS22L	RECQL5	TPRKB
ERCC4	MND1	REV3L	TRIP13
ERCC6	MORF4L1	RFWD3	UBE2B
EXD2	MRE11	RIF1	UBE2N
FAN1	MRNIP	RMI1	UBQLN4
FANCB	MSH3	RMI2	UBR2
FANCD2	MSH4	RNF138	USP51
FANCM	MSH5	RNF212	WAS
FBH1	MUS81	RPA1	WDR48
FEN1	NABP1	RPA2	WRAP53
FIGNL1	NABP2	RPA3	WRN
FUS	NBN	RPA4	XRCC1
GEN1	NIPBL	RTEL1	XRCC2
GINS2	NSMCE1	SAMHD1	XRCC3
GINS4	NSMCE2	SEM1	YY1
H2AX	nua4_human	SETD2	ZFYVE26
HDAC10	NUCKS1	SFPQ	ZNF365
HELB	PALB2	SFR1	ZNF711
HELQ	PARP1	SHLD1	ZSCAN4
HFM1	PARPBP	SHLD2	ZSWIM7
HORMAD1	POLL	SHLD3	

Taula 5. Aplicació del tercer filtratge en les 20 variants seleccionades. En verd s'indiquen les variants seleccionades en base als estàndard ACMG i la ponderació del grau de patogenicitat

Variant	Gen	Individu	Canvi nucleotídic i canvi proteic	ACMG	Contribució
rs1800056	ATM	DG2P	c.2572T>C F858L	VUS	PP5+BS1
rs4988345	BRIP1	F02-2	c.517C>T R173C	LP	PM1+PM2+PP3+PP5+BS1
rs28997570	BRIP1	F14-1	c.890A>G K297R	VUS	PM1 + PM2 + PP5 + BP4
rs141978919	EME1	DG2P	c.340G>A D114N	VUS	PM2+BP4
rs78214360	FBH1	F14-1	c.1146C>T L382L	VUS	BS1
rs148331344	GIN2	F10-2	c.489G>A A163A	VUS	PM2+BS1
rs370882864	LIG3	F02-2	c.1028G>A R343Q	VUS	PM1+PM2+BP4
rs143403320	MAGEF1	F09-2	c.185T>C L62S	VUS	PM2+BP4
rs150446804	MSH3	F02-2	c.2438A>G K813R	VUS	PM2+BP4
rs41562219	POLL	DG6P	c.1287C>T D429D	VUS	PM2+BS1
rs141638362	POLQ	F04-2	c.345T>C A115A	VUS	PM2+BS1
rs193211869	PRDM9	F09-2	c.1024A>G R342G	VUS	PM2+PP3
rs28903085	RAD50	F04-2	c.280A>C I94L	Benign	PM2+PP5+BS1+BS2+BP4
rs28903091	RAD50	DG6P	c.980G>A R327H	Benign	PM2+PP5+BS1+BS2
rs150866036	RECQL5	F09-2	c.*2T>A -	VUS	PM2
rs185854608	SEM1	F10-1	G/A -	VUS	PM2+BS1
rs147354564	SHOC1	F04-2	c.587C>T S196L	VUS	PM2+BP4
rs147220016	TEX19	F09-2	c.277G>T G93W	VUS	PM2+BP4
rs191126738	TEX19	F14-1	c.-38C>G -	VUS	PM2+BS1
rs187350468	TOP2B	F14-1	c.4843G>A V1620I	VUS	BP4

VUS: variant de significat incert

LP: probablement patogènic

Taula 6. Aplicació del quart filtratge en les 10 variants seleccionades. En verd s'indiquen les variants seleccionades en base a l'efecte del canvi nucleotídic i la implicació filogenètica

Variant	Individu	Gen	Canvi nucleotídic	Canvi proteic	SIFT	PolyPhen2	FATHMM	Fathmm-MKL	Mut Test	PROVEAN	CADD	DANN	PhastCons	PhyloP
rs4988345	F02-2	BRIP1	c.517C>T	R173C	D	D	T	D	D	D	5,941	0,998	1	1,048
rs28997570	F14-1	BRIP1	c.890A>G	K297R	T	PD	T	D	N	N	0,956	0,406	0,996	1,011
rs141978919	DG2P	EME1	c.340G>A	D114N	T	PD	T	N	N	N	0,206	0,489	0,171	-0,436
rs370882864	F02-2	LIG3	c.1028G>A	R343Q	T	PD	T	D	D	N	4,102	0,783	1	1,048
rs143403320	F09-2	MAGEF1	c.185T>C	L62S	T	B	T	N	N	N	0,930	0,094	0,01	0,064
rs150446804	F02-2	MSH3	c.2438A>G	K813R	T	B	D	D	N	N	0,991	0,409	0,669	1,199
rs193211869	F09-2	PRDM9	c.1024A>G	R342G	D	D	T	N	D	D	3,451	0,899	0,631	-0,142
rs150866036	F09-2	RECQL5	c.*544T>A c.*21>A	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs147354564	F04-2	SHOC1	c.470C>T c.587C>T	S157L S196L	D	PD	T	D	N	N	4,194	0,960	0,949	0,998
rs147220016	F09-2	TEX19	c.277G>T	G93W	D	D	NA	N	N	D	3,808	0,358	0,002	0,095

D: deleteri/probablement patogènic/causa de malaltia; T: tolerable; PD: possiblement patogènic; B: benigne; N: neutral; NA: desconegut



LLISTAT D'ACRÒNIMS

BAC: vector per clonar DNA en *E. coli*, de l'anglès *bacterial artificial chromosome*

CEP: sonda centromèrica, de l'anglès *chromosome enumeration probe*

CNV: variació en el nombre de còpies, de l'anglès *copy number variation*

CO: configuració creuada, de l'anglès *crossover*

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DNA: àcid desoxiribonucleic, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*

DSB: trencament de doble cadena, de l'anglès *double strand break*

dsDNA: DNA de doble cadena, de l'anglès *double stranded DNA*

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: àcid etilendiamintetraacètic

FISH: hibridació *in situ* fluorescent, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*

FITC: conjugat d'isotiocianat fluorescent

GO: ontologia gènica, de l'anglès *gene ontology*

HJ: unió *Holliday*, de l'anglès *Holliday junction*

HR: recombinació homòloga, de l'anglès *homologous recombination*

LB: medi de cultiu, de l'anglès *Luria Bertani*

LCR: repeticions de còpia baixa, de l'anglès *low copy repeats*

LP: possiblement patogènic, de l'anglès *likely pathogenic*

LSI: sonda locus específica, de l'anglès *locus specific identifier*

MAF: freqüència de l'al·lel minoritari, de l'anglès *minor allele frequency*

MRN: complex proteic format per Mre11, Rad50 i Nbs1

NAHR: recombinació homòloga no al·lèlica, de l'anglès *non allelic homologous recombination*

NCBI: base de dades, de l'anglès *National Center of Biotechnology Information*

NCO: configuració no creuada, de l'anglès *non-crossover*



NHEJ: unió d'extrems no homòlegs, de l'anglès *non-homologous end joining*

NP-40: nonil fenoxipolietoxiletanol 40, de l'anglès *ethoxylated nonylphenol*

OR: oportunitat relativa, de l'anglès *Odds ratio*

OMIM: base de dades de malalties amb un component genètic, de l'anglès *Online Mendelian Inheritance in Man*

PBS: tampó fosfat salí, de l'anglès *phosphate buffered saline*

PCR: reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès *polymerase chain reaction*

qPCR: PCR quantitativa o en temps reals, de l'anglès *quantitative polymerase chain reaction*

RNA: àcid ribonucleic, de l'anglès *ribonucleic acid*

rpm: revolucions per minut

RPMI: medi de cultiu, de l'anglès *Roswell Park Memorial Institute medium*

SD: desviació estàndard, de l'anglès *Standard Deviation*

SD: duplicacions segmentals, de l'anglès *segmental duplication*

SD22q11.2: síndrome de la deleció 22q11.2

SSC: solució salina de citrat de sodi, de l'anglès *ssaline-sodium citrate*

ssDNA: DNA monocatenari, de l'anglès *single-stranded DNA*

T^a: temperatura

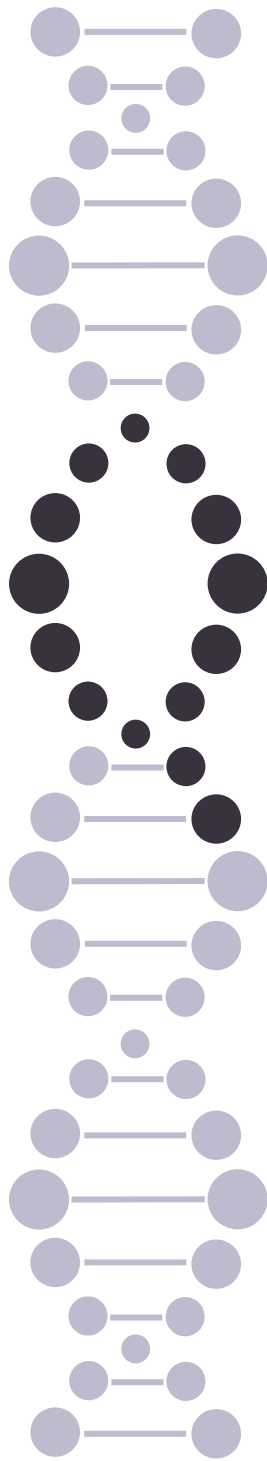
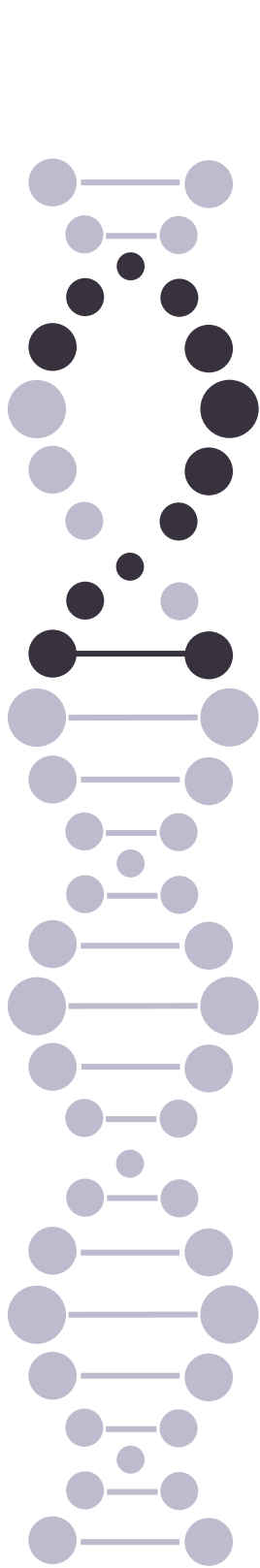
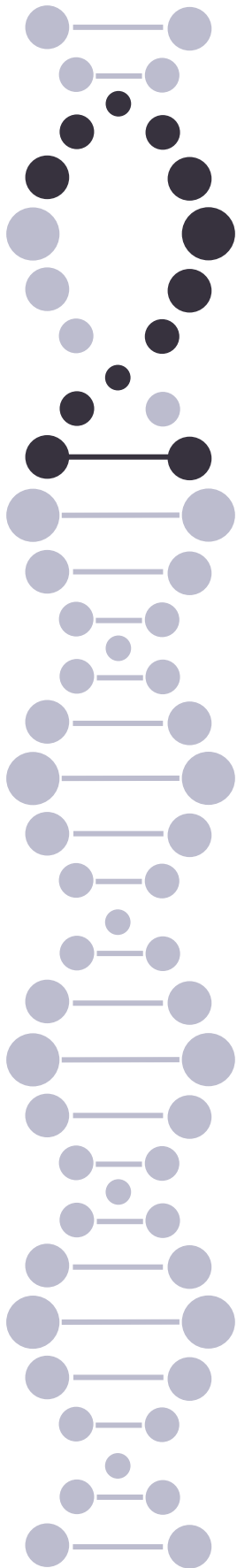
TE: solució tampó composta per Tris i EDTA

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

VUS: variant de significat incert, de l'anglès *variant of uncertain significance*

**LLISTAT DE GENS**

BRCA1: BRCA1 DNA Repair Associated (OMIM 113705)
BRIP1: BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1 (OMIM 605882)
DHX35: DEAH-Box Helicase 35
DMC1: DNA Meiotic Recombinase 1 (OMIM 602721)
FANCF: BRIP1
HIRA: Histone Cell Cycle Regulator (OMIM 600237)
LIG3: DNA Ligase 3 (OMIM 600940)
MRE11: MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease (OMIM 600814)
MSH2: MutS Homolog 2 (OMIM 609309)
NBS1: Nibrin (OMIM 602667)
NCF1: Neutrophil Cytosolic Factor 1 (OMIM 608512)
PRDM9: PR/SET Domain 9 (OMIM 609760)
RAD50: RAD50 Double Strand Break Repair Protein (OMIM 604040)
RAD51: RAD51 Recombinase (OMIM 179617)
RECQL5: RecQ Like Helicase 5 (OMIM 603781)
RNF212: Ring Finger Protein 212 (OMIM 612041)
SHOC1: Shortage In Chiasmata 1 (OMIM 618038)
SPO11: SPO11 Initiator of Meiotic Double Stranded Breaks (OMIM 605114)
TBX1: T-Box Transcription Factor 1 (OMIM 602054)
TEX19: Testis Expressed 19 (615647)
TUPLE1: HIRA
UBR2: Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 2 (OMIM 609134)



Bibliografia

A

- Ainsworth, P. J., Chakraborty, P. K., & Weksberg, R. (1997). Example of somatic mosaicism in a series of de novo neurofibromatosis type 1 cases due to a maternally derived deletion. *Human Mutation*, 9(5), 452–457. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:5<452::AID-HUMU12>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:5<452::AID-HUMU12>3.0.CO;2-1)
- Alemaný-Schmidt, A., Navarro-Palou, M., Voltes-Cobo, A., Rosell, J., Heine-Suñer, D., Picornell, A., & Oliver-Bonet, M. (2014). Geographical genetic variability: A factor to consider when assessing clinical implications of prdm9. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2(2), 201–203. <https://doi.org/10.1002/mgg3.56>
- Antonacci, F., Kidd, J. M., Marques-Bonet, T., Teague, B., Ventura, M., Girirajan, S., Alkan, C., Campbell, C. D., Vives, L., Malig, M., Rosenfeld, J. A., Ballif, B. C., Shaffer, L. G., Graves, T. A., Wilson, R. K., Schwartz, D. C., Eichler, E. E., & Genet, N. (2010). A large, complex structural polymorphism at 16p12.1 underlies microdeletion disease risk. *Nat Genet*, 42(9), 745–750. <https://doi.org/10.1038/ng.643>
- 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. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 17, Issue 1).
- Awate, S., Sommers, J. A., Datta, A., Nayak, S., Bellani, M. A., Yang, O., Dunn, C. A., Nicolae, C. M., Moldovan, G.-L., Seidman, M. M., Cantor, S. B., & Brosh, R. M. (2020). FANCI compensates for RAP80 deficiency and suppresses genomic instability induced by interstrand cross-links. *Nucleic Acids Research*, 48(16), 9161–9180. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa660>

B

- Babcock, M., Pavlicek, A., Spiteri, E., Kashork, C. D., Ioshikhes, I., Shaffer, L. G., Jurka, J., & Morrow, B. E. (2003). Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution. *Genome Research*, 13(12), 2519–2532. <https://doi.org/10.1101/gr.1549503>
- Babcock, M., Yatsenko, S., Hopkins, J., Brenton, M., Cao, Q., de Jong, P., Stankiewicz, P., Lupski, J. R., Sikela, J. M., & 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>
- Bailey, J. A., Gu, Z., Clark, R. A., Reinert, K., Samonte, R. V., Schwartz, S., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., & Eichler, E. E. (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science*, 297(5583), 1003–1007. <https://doi.org/10.1126/science.1072047>
- Baker, C. L., Walker, M., Kajita, S., Petkov, P. M., & Paigen, K. (2014). PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Research*, 24(5), 724–732.
<https://doi.org/10.1101/gr.170167.113>
- Bassett, A. S., Marshall, C. R., Lionel, A. C., Chow, E. W. C., & Scherer, S. W. (2008). Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Human Molecular Genetics*, 17(24), 4045–4053.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddn307>
- Baumer, A. & Riegel, M. (2004). Non-random asynchronous replication at 22q11.2 favours unequal meiotic crossovers leading to the human 22q11.2 deletion. *J Med Genet*, 41, 413–420.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2003.016352>
- 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>
- Berg, I. L., Neumann, R., Lam, K. W. G., Sarbajna, S., Odenthal-Hesse, L., May, C. A., & Jeffreys, A. J. (2010). PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nature Genetics*, 42(10), 859–863. <https://doi.org/10.1038/ng.658>
- Bherer, C., Campbell, C. L., & Auton, A. (2017). Refined genetic maps reveal sexual dimorphism in human meiotic recombination at multiple scales. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14994>
- Blanco, J., Egozcue, J., & Vidal, F. (1996). Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. In *Human Reproduction* (Vol. 11, Issue 4). <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/11/4/722/624716>
- Blennow, E., Lagerstedt, K., Malmgren, S., Sahlén, S., Schoumans, J., & Anderlid, B. M. (2008). Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. *Clinical Genetics*, 74(1), 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01008.x>

- Borel, C., Cheung, F., Stewart, H., Koolen, D. A., Phillips, C., Thomas, N. S., Jacobs, P. A., Eliez, S., & Sharp, A. J. (2012). Evaluation of PRDM9 variation as a risk factor for recurrent genomic disorders and chromosomal non-disjunction. *Human Genetics*, *131*(9), 1519–1524. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1180-4>
- Bort, S., Martínez, F., & Palau, F. (1997). Prevalence of the 677C-T MTHFR Mutation in Whites and Blacks in South Carolina, and Comparison with Prevalence in Other Populations. *Am. J. Hum. Genet.*, *60*, 230–233.
- Bosch, M., Rajmil, O., Egozcue, J., & Templado, C. (2003). Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *European Journal of Human Genetics*, *11*(10), 754–759. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201049>
- Botto, L. D., May, K., Fernhoff, P. M., Correa, A., Coleman, K., Rasmussen, S. A., Merritt, R. K., O'Leary, L. A., Wong, L. Y., Elixson, E. M., Mahle, W. T., & Campbell, R. M. (2003). A population-based study of the 22q11.2 Deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, *112*(1 I), 101–107. <https://doi.org/10.1542/peds.112.1.101>
- Brandt, J. S., Cruz Ithier, M. A., Rosen, T., & Ashkinadze, E. (2019). Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, *39*(2), 81–87. <https://doi.org/10.1002/pd.5402>
- Broman, K. W., Murray, J. C., Sheffield, V. C., White, R. L., & Weber, J. L. (1998). Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *American Journal of Human Genetics*, *63*(3), 861–869. <https://doi.org/10.1086/302011>
- Buizer-Voskamp, J. E., Blauw, H. M., Boks, M. P. M., Van Eijk, K. R., Veldink, J. H., Hennekam, E. A. M., Vorstman, J. A. S., Mulder, F., Tiemeier, H., Uitterlinden, A. G., Kiemeny, L. A., Van Den Berg, L. H., Kahn, R. S., Sabatti, C., & Ophoff, R. A. (2013). Increased paternal age and the influence on burden of genomic copy number variation in the general population. *Human Genetics*, *132*(4), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1261-4>
- 
- Campbell, I. M., Yuan, B., Robberecht, C., Pfundt, R., Szafranski, P., McEntagart, M. E., Nagamani, S. C. S., Erez, A., Bartnik, M., Wiśniewiecka-Kowalnik, B., Plunkett, K. S., Pursley, A. N., Kang, S. H. L., Bi, W., Lalani, S. R., Bacino, C. A., Vast, M., Marks, K., Patton, M., ... Stankiewicz, P. (2014).



- Parental somatic mosaicism is underrecognized and influences recurrence risk of genomic disorders. *American Journal of Human Genetics*, 95(2), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.07.003>
- Carlson, C., Sirotkin, H., Pandita, R., Goldberg, R., McKie, J., Wadey, R., Patanjali, S. R., Weissman, S. M., Anyane-Yeboah, K., Warburton, D., Scambler, P., Shprintzen, R., Kucherlapati, 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>
- Carvalho, C. M. B., & Lupski, J. R. (2008). Copy number variation at the breakpoint region of isochromosome 17q. *Genome Research*, 18(11), 1724–1732. <https://doi.org/10.1101/gr.080697.108>
- Chen, C.-P., Chern, S.-R., Lee, C.-C., Lin, S.-P., Chang, T.-Y., & Wang, W. (2004). Prenatal diagnosis of mosaic 22q11.2 microdeletion. *Prenatal Diagnosis*, 24, 658–664. <https://doi.org/10.1002/pd.917>
- Chen, W., Li, X., Sun, L., Sheng, W., & Huang, G. (2019). A rare mosaic 22q11.2 microdeletion identified in a Chinese family with recurrent fetal conotruncal defects. *Mol Genet Genomic Med*, 7, 847. <https://doi.org/10.1002/mgg3.847>
- Chowdhury, R., Bois, P. R. J., Feingold, E., Sherman, S. L., & Cheung, V. G. (2009). Genetic Analysis of Variation in Human Meiotic Recombination. *PLoS Genet*, 5(9), 1000648. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000648>
- Chung, M. Y., Lu, J. H., Chien, H. P., & Hwang, B. (2001). Chromosome 22q11 microdeletion in conotruncal heart defects: clinical presentation, parental origin and de novo mutations. *International Journal of Molecular Medicine*, 7(5), 501–505. <https://doi.org/10.3892/ijmm.7.5.501>
- Colasante, A., Minasi, M. G., Scarselli, F., Casciani, V., Zazzaro, V., Ruberti, A., Greco, P., Varricchio, M. T., & Greco, E. (2018). The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Archivio Italiano Di Urologia e Andrologia*, 90(4), 254–259. <https://doi.org/10.4081/aiua.2018.4.254>
- Coop, G., Wen, X., Ober, C., Pritchard, J. K., & Przeworski, M. (2008). High-resolution mapping of crossovers reveals extensive variation in fine-scale recombination patterns among humans. *Science*, 319(5868), 1395–1398. <https://doi.org/10.1126/science.1151851>
- Crichton, J. H., Playfoot, C. J., MacLennan, M., Read, D., Cooke, H. J., & Adams, I. R. (2017). Tex19.1 promotes Spo11-dependent meiotic recombination in mouse spermatocytes. *PLoS Genetics*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006904>

- Crow, J. F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Reviews Genetics*, 1(1), 40–47. <https://doi.org/10.1038/35049558>
- 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>

D

- Dallapiccola, B., Mandich, P., Bellone, E., Selicorni, A., Mokin, V., Ajmar, F., & Novelli, G. (1993). Parental origin of chromosome 4p deletion in Wolf-Hirschhorn syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 47(6), 921–924. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320470622>
- Delio, M., Guo, T., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E., Herman, S., Kaminetzky, M., Higgins, A. M., Coleman, K., Chow, C., Jarlbrzkowski, M., Bearden, C. E., Bailey, A., Vangkilde, A., Olsen, L., Olesen, C., Skovby, F., Werge, T. M., Templin, L., Busa, T., ... Morrow, B. E. (2013). Enhanced maternal origin of the 22q11.2 deletion in velocardiofacial and digeorge syndromes. *American Journal of Human Genetics*, 92(3), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.018>
- Demaerel, W., Hosseinzadeh, M., Nouri, N., Sedghi, M., Dimitriadou, E., Salehi, M., Abdali, H., Memarzadeh, M., Zamani, M., & Vermeesch, J. R. (2016). Reciprocal 22q11.2 Deletion and Duplication in Siblings with Karyotypically Normal Parents. *Cytogenetic and Genome Research*, 148(1), 1–5. <https://doi.org/10.1159/000445089>
- Demczuk, S., Lévy, A., Aubry, M., Croquette, M. F., Philip, N., Prieur, M., Sauer, U., Bouvagnet, P., Rouleau, G. A., Thomas, G., & Aurias, A. (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. *Human Genetics*, 96(1), 9–13. <https://doi.org/10.1007/BF00214179>
- Dempsey, M. A., Schwartz, S., & Waggoner, D. J. (2007). Mosaicism del(22)(q11.2q11.2)/dup(22)(q11.2q11.2) in a patient with features of 22q11.2 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143a, 1082–1086. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a>
- Devriendt, K., Fryns, J.-P., Mortier, G., Van Thienen, M.-N., & Keymolen, K. (1998). The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 35, 789–790. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.9.789-a>

- Dittwald, P., Gambin, T., Gonzaga-Jauregui, C., Carvalho, C. M. B., Lupski, J. R., Stankiewicz, P., & Gambin, A. (2013a). Inverted Low-Copy Repeats and Genome Instability—A Genome-Wide Analysis. *Human Mutation*, *34*(1), 210–220. <https://doi.org/10.1002/humu.22217>
- Dittwald, P., Gambin, T., Szafranski, P., Li, J., Amato, S., Divon, M. Y., Rojas, L. X. R., Elton, L. E., Scott, D. A., Schaaf, C. P., Torres-Martinez, W., Stevens, A. K., Rosenfeld, J. A., Agadi, S., Francis, D., Kang, S. H. L., Breman, A., Lalani, S. R., Bacino, C. A., ... Stankiewicz, P. (2013b). NAHR-mediated copy-number variants in a clinical population: Mechanistic insights into both genomic disorders and Mendelizing traits. *Genome Research*, *23*(9), 1395–1409. <https://doi.org/10.1101/gr.152454.112>
- Downie, S. E., Flaherty, S. P., & Matthews, C. D. (1997). Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Molecular Human Reproduction*, *3*(7), 585–598. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.7.585>
- Driscoll, D. A., Salvin, J., Sellinger, B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., & Emanuel, B. S. (1993). Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: Implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics*, *30*(10), 813–817. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.10.813>
- Driscoll, Deborah A, Budarft, M. L., & Emanuel, B. S. (1992). A Genetic Etiology for DiGeorge Syndrome: Consistent Deletions and Microdeletions of 22q I I. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 50).
- Du Fossé, N. A., Van Der Hoorn, M.-L. P., Van Lith, J. M. M., Le Cessie, S., & Lashley, E. E. L. O. (2020). Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *26*(5), 650–669. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa010>
- Dutra, R. L., Pieri, P. de C., Teixeira, A. C. D., Honjo, R. S., Bertola, D. R., & Kim, C. A. (2011). Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics*, *66*(6), 959–964. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000600007>
- Duyzend, M. H., Nuttle, X., Coe, B. P., Baker, C., Nickerson, D. A., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2016). Maternal Modifiers and Parent-of-Origin Bias of the Autism-Associated 16p11.2 CNV. *American Journal of Human Genetics*, *98*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.017>

E

- Egozcue, J., Blanco, J., & Vidal, F. (1997). Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Human Reproduction Update*, 3(5), 441–452. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.441>
- Eliez, S., Antonarakis, S. E., Morris, M. A., Dahoun, S. P., & Reiss, A. L. (2001). Parental origin of the deletion 22q11.2 and brain development in velocardiofacial syndrome: A preliminary study. *Archives of General Psychiatry*, 58(1), 64–68. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.1.64>
- Emanuel, B. S. (2008). Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(1), 11–18. <https://doi.org/10.1002/ddrr.3>

F

- Feuk, L. (2010). Inversion variants in the human genome: role in disease and genome architecture. *Genome Medicine*, 2(2), 11. <https://doi.org/10.1186/gm132>
- Fledel-Alon, A., Leffler, E. M., Guan, Y., Stephens, M., Coop, G., & Przeworski, M. (2011). Variation in human recombination rates and its genetic determinants. *PLoS One*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020321>
- Fokstuen, S., Arbenz, U., Artan, S., Dutly, F., Bauersfeld, U., Brecevic, L., Fasnacht, M., Röthlisberger, B., & Schinzel, A. (1998). 22q11.2 deletions in a series of patients with non-selective congenital heart defects: Incidence, type of defects and parental origin. *Clinical Genetics*, 53(1), 63–69. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1998.tb02584.x>

G

- García-Miñaur, S., Fantes, J., Murray, R. S., Porteous, E. M., Strain, L., Burns, J. E., & Stephen, J. (2002). A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet*, 39, 62. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.10.e62>
- Gebhardt, G. S., Devriendt, K., Thoelen, R., Swillen, A., Pijkels, E., Gewillig, M., Fryns, J.-P., & Vermeesch, J. R. (2003). No evidence for a parental inversion



- polymorphism predisposing to rearrangements at 22q11.2 in the DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 11(2), 109–111. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200930>
- Gimelli, G., Pujana, M. A., Patricelli, M. G., 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. *Human Molecular Genetics*, 12(8), 849–858. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg101>
- Goodship, J., Cross, I., Liling, J., & Wren, C. (1998). A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Archives of Disease in Childhood* 79(4). <https://doi.org/10.1136/adc.79.4.348>
- Gotter, A. L., Nimmakayalu, M. A., Jalali, G. R., Hacker, A. M., Vorstman, J., Duffy, D. C., Medne, L., & Emanuel, B. S. (2007). A palindrome-driven complex rearrangement of 22q11.2 and 8q24.1 elucidated using novel technologies. *Genome Research*, 17(4), 470–481. <https://doi.org/10.1101/gr.6130907>
- Grati, F. R., Molina Gomes, D., Ferreira, J. C. P. B., Dupont, C., Alesi, V., Gouas, L., Horelli-Kuitunen, N., Choy, K. W., García-Herrero, S., de la Vega, A. G., Piotrowski, K., Genesio, R., Queipo, G., Malvestiti, B., Hervé, B., Benzacken, B., Novelli, A., Vago, P., Piippo, K., ... Vialard, F. (2015). Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenatal Diagnosis*, 35(8), 801–809. <https://doi.org/10.1002/pd.4613>
- Greenberg, F., Guzzetta, V., Montes de Oca-Luna, R., Ellen Magenis, R., C M Smith, I. A., Richter, S. F., Kondo, I., William Dobyns, B., & Lupski, J. R. (1991). Molecular Analysis of the Smith-Magenis Syndrome: A Possible Contiguous-Gene Syndrome Associated with del(17)(p1 1.2). *Am. J. Hum. Genet*, 49, 1207–1218
- Gu, W., Zhang, F., & Lupski, J. R. (2008). *Mechanisms for human genomic rearrangements*. 17, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1755-8417-1-4>
- Guiraldelli, M. F., Felberg, A., Almeida, L. P., Parikh, A., de Castro, R. O., & Pezza, R. J. (2018). SHOC1 is a ERCC4-(HhH)2-like protein, integral to the formation of crossover recombination intermediates during mammalian meiosis. *PLoS Genetics*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007381>

H

- Halder, A., Jain, M., Kabra, M., & Gupta, N. (2008). Mosaic 22q11.2 microdeletion syndrome: diagnosis and clinical manifestations of two cases. *Molecular Cytogenetics*, *1*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-1-18>
- Harel, T., & Lupski, J. R. (2018). Genomic disorders 20 years on—mechanisms for clinical manifestations. *Clinical Genetics*, *93*(3), 439–449. <https://doi.org/10.1111/cge.13146>
- Hehir-Kwa, J. Y., Rodríguez-Santiago, B., Vissers, L. E., de Leeuw, N., Pfundt, R., Buitelaar, J. K., Pérez-Jurado, L. A., & Veltman, J. A. (2011). De novo copy number variants associated with intellectual disability have a paternal origin and age bias. *Journal of Medical Genetics*, *48*(11), 776–778. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100147>
- Heilstedt, H. A., Ballif, B. C., Howard, L. A., Lewis, R. A., Stal, S., Kashork, C. D., Bacino, C. A., Shapira, S. K., & Shaffer, L. G. (2003). Physical Map of 1p36, Placement of Breakpoints in Monosomy 1p36, and Clinical Characterization of the Syndrome. *Am. J. Hum. Genet*, *72*(5), 1200–1212. <https://doi.org/10.1086/375179>
- Heyer, W. D. (2004). Recombination: Holliday Junction Resolution and Crossover Formation. In *Current Biology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 56–58). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.043>
- Hobart, H. H., Morris, C. A., Mervis, C. B., Pani, A. M., Kistler, D. J., Rios, C. M., Kimberley, K. W., Gregg, R. G., & Bray-Ward, P. (2010). Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, *154C*(2), 220–228. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30258>
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M. G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J. M., Barnes, E. L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., & Luo, G. (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes and Development*, *21*(23), 3073–3084. <https://doi.org/10.1101/gad.1609107>
- Hurles, M. E., & Lupski, J. R. (2006). Recombination hotspots in nonallelic homologous recombination. In J. R. Lupski & P. Stankiewicz (Eds.), *Genomic disorders: The genomic basis of disease* (pp. 341–342). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-039-3>

K

- Kasprzak, L., Der Kaloustian, V. M., Elliott, A. M., Shevell, M., Lejtenyi, C., & Eydoux, P. (1998). Deletion of 22q11 in two brothers with different phenotype. *American Journal of Medical Genetics*, 75(3), 288–291. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980123\)75:3<288::AID-AJMG12>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980123)75:3<288::AID-AJMG12>3.0.CO;2-L)
- Kato, T., Yamada, K., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Emanuel, B. S., & Kurahashi, H. (2007). Age has no effect on de novo constitutional t(11;22) translocation frequency in sperm. *Fertility and Sterility*, 88(5), 1446–1448. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.019>
- Keeney, S., Gregorova, S., Gergelits, V., Chvatalova, I., Bhattacharyya, T., Valiskova, B., Fotopulosova, V., Jansa, P., Wiatrowska, D., & Forejt, J. (2018). *Modulation of Prdm9-controlled meiotic chromosome asynapsis overrides hybrid sterility in mice*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34282.001>
- Kidd, J. M., Graves, T., Newman, T. L., Fulton, R., Hayden, H. S., Malig, M., Kallicki, J., Kaul, R., Wilson, R. K., & Eichler, E. E. (2010). A human genome structural variation sequencing resource reveals insights into mutational mechanisms. *Cell*, 143(5), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.027>
- Kinoshita, T., Mikami, M., Ayabe, T., Matsubara, K., Ono, H., Ohki, K., Fukami, M., & Katoh-Fukui, Y. (2019). Frequency of Common Copy-Number Variations at 15q11.2q13 in Sperm of Healthy Men. *Cytogenetic and Genome Research*, 159(2), 66–73. <https://doi.org/10.1159/000503267>
- Kohutova, A., Raška, J., Kruta, M., Seneklova, M., Barta, T., Fojtik, P., Jurakova, T., Walter, C. A., Hampl, A., Dvorak, P., & Rotrekl, V. (2019). Ligase 3-mediated end-joining maintains genome stability of human embryonic stem cells. *The FASEB Journal*, 33(6), 6778–6788. <https://doi.org/10.1096/fj.201801877RR>
- Kong, A., Barnard, J., Gudbjartsson, D. F., Thorleifsson, G., Jonsdottir, G., Sigurdardottir, S., Richardsson, B., Jonsdottir, J., Thorgeirsson, T., Frigge, M. L., Lamb, N. E., Sherman, S., Gulcher, J. R., & Stefansson, K. (2004). Recombination rate and reproductive success in humans. *Nature Genetics*, 36(11), 1203–1206. <https://doi.org/10.1038/ng1445>
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W., Sigurdsson, G., Walters, G. B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Magnusson, O. T., ... Stefansson, K.

- (2012). Rate of de novo mutations, father's age, and disease risk. *Nature*, *488*(7412), 471–475. <https://doi.org/10.1038/nature11396>
- Kong, A., Gudbjartsson, D. F., Sainz, J., Jonsdottir, G. M., Gudjonsson, S. A., Richardsson, B., Sigurdardottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., Shlien, A., Palsson, S. T., Frigge, M. L., Thorgeirsson, T. E., Gulcher, J. R., & Stefansson, K. (2002). A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature Genetics*, *31*(3), 241–247. <https://doi.org/10.1038/ng917>
- Kong, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Masson, G., Helgason, A., Gudbjartsson, D. F., Jonsdottir, G. M., Gudjonsson, S. A., Sverrisson, S., Thorlacius, T., Jonasdottir, A., Hardarson, G. A., Palsson, S. T., Frigge, M. L., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., & Stefansson, K. (2008). Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate. *Science*, *319*(5868), 1398–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1152422>
- Koolen, D. A., Dupont, J., De Leeuw, N., Elm Vissers, L., Van Den Heuvel, S. P., Bradbury, A., Steer, J., Pm De Brouwer, A., Ten Kate, L. P., Nillesen, W. M., Ba De Vries, B., & Parker, M. J. (2012). Two families with sibling recurrence of the 17q21.31 microdeletion syndrome due to low-grade mosaicism. *European Journal of Human Genetics*, *20*, 729–733. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.1>
- Kurahashi, H., & Emanuel, B. S. (2001). Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nature Genetics*, *29*(2), 139–140. <https://doi.org/10.1038/ng1001-139>

L

- Lázaro, C., Gaona, A., Ainsworth, P., Tenconi, R., Vidaud, D., Kruyer, H., Ars, E., Volpini, V., & Estivill, X. (1996). Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Human Genetics*, *98*(6), 696–699. <https://doi.org/10.1007/s004390050287>
- Lee, A. J., Nam, D. E., Choi, Y. J., Noh, S. W., Nam, S. H., Lee, H. J., Kim, S. J., Song, G. J., Choi, B.-O., & Chung, K. W. (2020). Paternal gender specificity and mild phenotypes in Charcot-Marie-Tooth type 1A patients with de novo 17p12 rearrangements. *Mol Genet Genomic Med*, *8*, 1380. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1380>
- Liu, P., Carvalho, C. M. B., Hastings, P. J., & Lupski, J. R. (2012). *Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.012>
- Liu, P., Lacia, M., Zhang, F., Withers, M., Hastings, P. J., & Lupski, J. R. (2011). Frequency of nonallelic homologous recombination is correlated with length

- of homology: Evidence that ectopic synapsis precedes ectopic crossing-over. *American Journal of Human Genetics*, 89(4), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.009>
- Liu, Y., Michelson, D., Clark, R., & Gold, J. A. (2018). Child Neurology: Siblings with infantile epilepsy and developmental delay: A circuitous path to genomic diagnosis. *Neurology*, 91(3), 143–147. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005815>
- Lopes, J., Vandenberghe, A., Tardieu, S., Ionasescu, V., Lévy, N., Wood, N., Tachi, N., Bouche, P., Latour, P., Brice, A., & LeGuern, E. (1997). Sex-dependent rearrangements resulting in CMT1A and HNPP. *Nature Genetics*, 17, 136–137.
- López Correa, C., Brems, H., Lázaro, C., Marynen, P., & Legius, E. (2000). Unequal Meiotic Crossover: A Frequent Cause of NF1 Microdeletions. *Am. J. Hum. Genet.*, 66, 1969–1974. <https://doi.org/10.1086/302920>
- Lu, J. H., Chung, M. Y., Hwang, B., & Chien, H. P. (1999). Prevalence and parental origin in tetralogy of fallot associated with chromosome 22q11 microdeletion. *Pediatrics*, 104(1), 87–90. <https://doi.org/10.1542/peds.104.1.87>
- Lupski, J. R. (1998). Genomic disorders : structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genetics*, 14(10), 417–422. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01555-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01555-8)
- Lupski, J. R. (2004). Hotspots of homologous recombination in the human genome: Not all homologous sequences are equal. *Genome Biology*, 5(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-242>
- Lupski, J. R. (2009). Genomic disorders ten years on. *Genome Medicine*, 1(4), 1–11. <https://doi.org/10.1186/gm42>
- Lynn, A., Koehler, K. E., Judis, L. A., Chan, E. R., Cherry, J. P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P. A., & Hassold, T. J. (2002). Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science*, 296(5576), 2222–2225. <https://doi.org/10.1126/science.1071220>

M

- MacArthur, J. A. L., Spector, T. D., Lindsay, S. J., Mangino, M., Gill, R., Small, K. S., & Hurles, M. E. (2014). The rate of nonallelic homologous recombination in males is highly variable, correlated between monozygotic twins and independent of age. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004195. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004195>

- Mayr, C. (2019). What are 3' utrs doing? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- McDonald-McGinn, D. M., Sullivan, K. E., Marino, B., Philip, N., Swillen, A., Vorstman, J. A. S., Zackai, E. H., Emanuel, B. S., Vermeesch, J. R., Morrow, B. E., Scambler, P. J., & Bassett, A. S. (2015). 22q11.2 Deletion Syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 15071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.71>
- McDonald-McGinn, D. M., & Zackai, E. H. (2008). Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Developmental Disabilities Research Reviews*, *14*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1002/ddrr.10>
- McKinlay Gardner, R. J., Stuhlerland, G. R., & Shaffer, L. G. (2011). Structural rearrangements. In *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (4 edition). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780195375336.001.0001>
- Michaelovsky, E., Gothelf, D., Korostishevsky, M., Frisch, A., Burg, M., Carmel, M., Steinberg, T., Inbar, D., Apter, A., & Weizman, A. (2008). Association between a common haplotype in the COMT gene region and psychiatric disorders in individuals with 22q11.2DS. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *11*(03), 351–363. <https://doi.org/10.1017/S1461145707008085>
- Miyake, N., Kurotaki, N., Sugawara, H., Shimokawa, O., Harada, N., Kondoh, T., Tsukahara, M., Ishikiriyama, S., Sonoda, T., Miyoshi, Y., Sakazume, S., Fukushima, Y., Ohashi, H., Nagai, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Touyama, M., Shiihara, T., Okamoto, N., ... Matsumoto, N. (2003). Preferential Paternal Origin of Microdeletions Caused by Prezygotic Chromosome or Chromatid Rearrangements in Sotos Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *72*(5), 1331–1337. <https://doi.org/10.1086/375166>
- Molina, O., Anton, E., Vidal, F., & Blanco, J. (2012). High rates of de novo 15q11q13 inversions in human spermatozoa. *Molecular Cytogenetics*, *100*(6), 380–386. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-5-11>
- 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>
- 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>
- Morris, C. A., Mervis, C. B., Paciorkowski, A. P., Abdul-Rahman, O., Dugan, S. L., Rope, A. F., Bader, P., Hendon, L. G., Velleman, S. L., Klein-Tasman, B. P., & Osborne, L. R. (2015). 7q11.23 Duplication Syndrome: Physical



Characteristics and Natural History. *Am J Med Genet A*, 167(12), 2916–2935. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37340>

Morrow, B., Goldberg, R., Carlson, C., Das Gupta, R., Sirotkin, H., Collins, J., Dunham, I., O'Donnell, H., Scambler, P., Shprintzen, R., & Kucherlapati, R. (1995). Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 56(6), 1391–1403. [/pmc/articles/PMC1801093/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1801093/)

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. *Nature Genetics*, 40(9), 1124–1129. <https://doi.org/10.1038/ng.213>

N

Nath, S., & Nagaraju, G. (2020). FANCI helicase promotes DNA end resection by facilitating CtIP recruitment to DNA double-strand breaks. *PLOS Genetics*, 16(4), e1008701. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008701>

Neuhäusler, L., Summerer, A., Cooper, D. N., Mautner, V. F., & Kehrer-Sawatzki, H. (2018). Pronounced maternal parent-of-origin bias for type-1 NF1 microdeletions. *Human Genetics*, 137(5), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1888-x>

O

Öllinger, R., Childs, A. J., Burgess, H. M., Speed, R. M., Lundegaard, P. R., Reynolds, N., Gray, N. K., Cooke, H. J., & Adams, I. R. (2008). Deletion of the pluripotency-associated *Tex19.1* gene causes activation of endogenous retroviruses and defective spermatogenesis in mice. *PLoS Genetics*, 4(9), e1000199. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000199>

Osborne, L. R., Li, M., Pober, B., Chitayat, D., Bodurtha, J., Mandel, A., Costa, T., Grebe, T., Cox, S., Tsui, L. C., & 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., Szafranski, P., Cooper, M. L., Rao, M., Shao, L., South, S. T., Coleman, K., Fernhoff, P. M., Deray, M. J., Rosengren, S., Roeder, E. R., Enciso, V. B., Chinault, A. C., Patel, A., ... Cheung, S. W. (2011). Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between

nonhomologous chromosomes. *Genome Research*, 21(1), 33–46.
<https://doi.org/10.1101/gr.111609.110>

P

- Palau, F., Löfgren, A., Jonghe, P. De, Bort, S., Nelis, E., Sevilla, T., Martin, J. J., Vilchez, J., Prieto, F., & Broeckhoven, C. Van. (1993). Origin of the de novo duplication in charcot - marie - tooth disease type 1A: Unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Human Molecular Genetics*, 2(12), 2031–2035. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.12.2031>
- Patel, Z. M., Gawde, H. M., & Khatkhatay, M. I. (2006). 22q11 Microdeletion Studies in the Heart Tissue of an Abortus Involving a Familial Form of Congenital Heart Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 20, 160–163. <https://doi.org/10.1002/jcla.20125>
- Peng, Z., Zhou, W., Fu, W., Du, R., Jin, L., & Zhang, F. (2015). Correlation between frequency of non-allelic homologous recombination and homology properties: Evidence from homology-mediated CNV mutations in the human genome. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu533>
- Pérez-García, D., Flores, R., Brun-Gasca, C., & Pérez-Jurado, L. A. (2015). Lateral preference in Williams–Beuren syndrome is associated with cognition and language. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 24(9), 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/s00787-014-0652-6>
- Plastira, K., Angelopoulou, R., Mantas, D., Msaouel, P., Lyrakou, S., Plastiras, A., Bolaris, S., Baka, S., & Paparisteidis, N. (2007). The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *International Journal of Andrology*, 30(2), 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00715.x>
- Potocki, L., Shaw, C. J., Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. (2003). Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith–Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genetics in Medicine*, 5(6), 430–434. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000095625.14160.AB>
- Powers, N. R., Parvanov, E. D., Baker, C. L., Walker, M., Petkov, P. M., & Paigen, K. (2016). *The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo*. 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006146>
- Puebla-Osorio, N., Lacey, D. B., Alt, F. W., & Zhu, C. (2006). Early Embryonic Lethality Due to Targeted Inactivation of DNA Ligase III. *Molecular and*



Cellular Biology, 26(10), 3935–3941.
<https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3935-3941.2006>

Q

Quarrell, O. W. J., Snell, R. G., Curtis, M. A., Roberts, S. H., Harper, P. S., Shaw, D. J., Quarrell, O. W. J., Snell, R. G., Curtis, M. A., Roberts, S. H., Harper, P. S., & Shaw, D. J. (1991). Paternal origin of the chromosomal deletion resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Med Genet*, 28(4), 256–259. <https://doi.org/10.1136/jmg.28.4.256>

R

- Ramasamy, R., Chiba, K., Butler, P., & Lamb, D. J. (2015). Male biological clock: A critical analysis of advanced paternal age. *Fertility and Sterility*, 103(6), 1402–1406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.011>
- Rao, P. N., Li, W., Vissers, L. E. L. M., Veltman, J. A., & Ophoff, R. A. (2010). Recurrent inversion events at 17q21.31 microdeletion locus are linked to the MAPT H2 haplotype. *Cytogenetic and Genome Research*, 129(4), 275–279. <https://doi.org/10.1159/000315901>
- Reichmann, J., Dobie, K., Lister, L. M., Crichton, J. H., Best, D., MacLennan, M., Read, D., Raymond, E. S., Hung, C.-C., Boyle, S., Shirahige, K., Cooke, H. J., Herbert, M., & Adams, I. R. (2020). *Tex19.1* inhibits the N-end rule pathway and maintains acetylated SMC3 cohesin and sister chromatid cohesion in oocytes. *Journal of Cell Biology*, 219(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.201702123>
- Rivera, H., Domínguez, M. G., Vásquez-Velásquez, A. I., & Lurie, I. W. (2013). De novo dup p/del q or dup q/del p rearranged chromosomes: Review of 104 cases of a distinct chromosomal mutation. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 58–63. <https://doi.org/10.1159/000351184>
- Rosiak-Gill, A., Gill, K., Jakubik, J., Fraczek, M., Patorski, L., Gaczarzewicz, D., Kurzawa, R., Kurpisz, M., & Piasecka, M. (2019). Age-related changes in human sperm DNA integrity. *Aging*, 11(15), 5399–5411. <https://doi.org/10.18632/aging.102120>
- 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>

Ryan, A. K., Goodship, J. A., Wilson, D. I., Philip, N., Levy, A., Seidel, H., Schuffenhauer, S., Oechsler, H., Belohradsky, B., Prieur, M., Aurias, A., Raymond, F. L., Clayton-Smith, J., Hatchwell, E., McKeown, C., Beemer, F. A., Dallapiccola, B., Novelli, G., Hurst, J. A., ... Scambler, P. J. (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: A European collaborative study. *Journal of Medical Genetics*, *34*(10), 798–804. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.10.798>

S

Saitta, S. C., Harris, S. E., Gaeth, A. P., Driscoll, D. A., McDonald-McGinn, D. M., Maisenbacher, M. K., Yersak, J. M., Chakraborty, P. K., Hacker, A. M., Zackai, E. H., Ashley, T., & Emmanuel, B. S. (2004). Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Human Molecular Genetics*, *13*(4), 417–428. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh041>

Sánchez, J., Fernández, R., Madruga, M., Bernabeu-Wittel, J., Antiñolo, G., & Borrego, S. (2014). Somatic and germ-line mosaicism of deletion 15q11.2-q13 in a mother of dizygotic twins with Angelman syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *164*(2), 370–376. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36281>

Sandrin-Garcia, P., Macedo, C., Martelli, L. R., Ramos, E. S., Guion-Almeida, M. L., Richieri-Costa, A., & Passos, G. A. S. (2002). Recurrent 22q11.2 deletion in a sibship suggestive of parental germline mosaicism in velocardiofacial syndrome. *Clinical Genetics*, *61*(5), 380–383. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.610511.x>

Sandrin-Garcia, P., Abramides, D. V. M., Martelli, L. R., Ramos, E. S., Richieri-Costa, A., & Passos, G. A. S. (2007). Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *303*(1–2), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9450-5>

Sansam, C. L., & Pezza, R. J. (2015). Connecting by breaking and repairing: Mechanisms of DNA strand exchange in meiotic recombination. *FEBS Journal*, *282*(13), 2431–2444. <https://doi.org/10.1111/febs.13317>

Sarbajna, S., & West, S. C. (2014). Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(9), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.003>

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>

- Sartorius, G. A., & Nieschlag, E. (2009). Paternal age and reproduction. *Human Reproduction Update*, 16(1), 65–79. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp027>
- Sasaki, M., Lange, J., & Keeney, S. (2010). Genome destabilization by homologous recombination in the germline. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 182–195. <https://doi.org/10.1038/nrm2849>
- Scherer, S. W., Gripp, K. W., Lucena, J., Nicholson, L., Bonnefont, J. P., Pérez-Jurado, L. A., & Osborne, L. R. (2005). Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Human Genetics*, 117(4), 383–388. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1325-9>
- Schmid, T. E., Grant, P. G., Marchetti, F., Weldon, R. H., Eskenazi, B., & Wyrobek, A. J. (2013). Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men. *Human Reproduction*, 28(1), 274–282. <https://doi.org/10.1093/humrep/des321>
- Seaver, L. H., Pierpont, J. W., Erickson, R. P., Donnerstein, R. L., & Cassidy, S. B. (1994). Pulmonary atresia associated with maternal 22q11.2 deletion: Possible parent of origin effect in the conotruncal anomaly face syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 31(11), 830–834. <https://doi.org/10.1136/jmg.31.11.830>
- Shaikh, T. H., Kurahashi, H., Saitta, S. C., Mizrahy O'hare, A., Hu, P., Roe, B. A., Driscoll, D. A., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Budarf, M. L., & Emanuel, B. S. (2000). Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Human Molecular Genetics*, 9(4), 489–501. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.489>
- Shapira, S. K., Mccaskill, C., Northrup, H., Spikes, A. S., Elder, F. F. B., Sutton, V. R., Korenberg, J. R., Greenberg, F., & Shaffer, L. G. (1997). Chromosome 1p36 Deletions: The Clinical Phenotype and Molecular Characterization of a Common Newly Delineated Syndrome. *Am. J. Hum. Genet*, 61(3), 642–650. <https://doi.org/10.1086/515520>
- She, X., Jiang, Z., Clark, R. A., Liu, G., Cheng, Z., Tuzun, E., Church, D. M., Sutton, G., Halpern, A. L., & 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>
- Sibbons, C., Morris, J. K., Crolla, J. A., Jacobs, P. A., & Thomas, S. (2011). De novo deletions and duplications detected by array CGH: a study of parental origin in relation to mechanisms of formation and size of imbalance. *European Journal of Human Genetics*, 20, 155–160. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.182>

- Silva, M., De Leeuw, N., Mann, • Kathy, Schuring-Blom, H., Morgan, S., Giardino, D., Rack, K., & Hastings, R. (2019). European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *European Journal of Human Genetics*, 27, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0244-x>
- Sloter, E. D., Marchetti, F., Eskenazi, B., Weldon, R. H., Nath, J., Cabrerros, D., & Wyrobek, A. J. (2007). Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertility and Sterility*, 87(5), 1077–1086. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.112>
- Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics*, 18(2), 74–82. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02592-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02592-1)
- Steinmann, K., Kluwe, L., Cooper, D. N., Brems, H., De Raedt, T., Legius, E., Mautner, V. F., & Kehrer-Sawatzki, H. (2008). Copy number variations in the NF1 gene region are infrequent and do not predispose to recurrent type-1 deletions. *European Journal of Human Genetics*, 16(5), 572–580. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5202002>


T

- Tan, T. Y., Collins, A., James, P. A., McGillivray, G., Stark, Z., Gordon, C. T., Leventer, R. J., Pope, K., Forbes, R., Crolla, J. A., Ganesamoorthy, D., Burgess, T., Bruno, D. L., Slater, H. R., Farlie, P. G., & Amor, D. J. (2011). Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(7), 1623–1633. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34051>
- Tatton-Brown, K., Douglas, J., Coleman, K., Baujat, G., Chandler, K., Clarke, A., Collins, A., Davies, S., Faravelli, F., Firth, H., Garrett, C., Hughes, H., Kerr, B., Liebelt, J., Reardon, W., Schaefer, G. B., & Splitt, M. (2005). Multiple mechanisms are implicated in the generation of 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *J Med Genet*, 42, 307–313. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.027755>
- Thomas, N. S., Durkie, M., Potts, G., Sandford, R., Van Zyl, B., Youings, S., Dennis, N. R., & Jacobs, P. A. (2006). Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11–q13 and 22q11. *European Journal of Human Genetics*, 14(7), 831–837. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201617>
- Torgasheva, A. A., & Borodin, P. M. (2010). Synapsis and recombination in inversion heterozygotes. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1676–1680. <https://doi.org/10.1042/BST0381676>



- Torres-Juan, L., Rosell, J., Sánchez-de-la-Torre, M., Fibla, J., & Heine-Suñer, D. (2007). Analysis of meiotic recombination in 22q11.2, a region that frequently undergoes deletions and duplications. *BMC Medical Genetics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-14>
- Trost, D., Wiebe, W., Uhlhaas, S., Schwindt, P., & Schwanitz, G. (2000). Investigation of meiotic rearrangements in DGS/VCFS patients with a microdeletion 22q11.2. *J Med Genet*, 37, 452–454. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.6.452>
- Tupler, R., Bortotto, L., Buhler, E. M., Alkan, M., Malik, N. J., Bosch-Al Jadooa, N., Memo, L., Maraschio, P., Tupler, R., Biihler, E. M., Alkan, M., Malik, N. J., Bosch, N., Jadooa, A., & Bortotto, L. (1992). Paternal origin of the de novo deleted chromosome 4 in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet*, 29, 53–55
- Turner, D. J., Miretti, M., Rajan, D., Fiegler, H., Carter, N. P., Blayney, M. L., Beck, S., & Hurles, M. E. (2008). Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nature Genetics*, 40(1), 90–95. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.40>
- Tutak, K., & Rozwadowska, N. (2020). Discrete roles of RNA helicases in human male germline and spermatogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 61(3), 415–419. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00558-4>

U

- Upadhyaya, M., Ruggieri, M., Maynard, J., Osborn, M., Hartog, C., Mudd, S., Penttinen, M., Cordeiro, I., Ponder, M., Ponder, B. A. J., Krawczak, M., & Cooper, D. N. (1998). Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Human Genetics*, 102(5), 591–597. <https://doi.org/10.1007/s004390050746>
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, 22(20), 5612–5621. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg541>

V

- Van Hemel, J. O., Schaap, C., Van Opstal, D., Mulder, M. P., Niermeijer, M. F., & Meijers, J. H. C. (1995). Recurrence of DiGeorge syndrome: Prenatal detection by FISH of a molecular 22q11 deletion. *Journal of Medical Genetics*, *32*(8), 657–658. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.8.657>
- 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>
- Vergés Torrella, L. (2016). *Avaluació dels factors de predisposició a la inestabilitat genòmica de la regió 22q11.2*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Verhagen, J. M. A., Diderich, K. E. M., Oudesluijs, G., Mancini, G. M. S., Eggink, A. J., Verkleij-Hagoort, A. C., Groenenberg, I. A. L., Willems, P. J., Du Plessis, F. A., De Man, S. A., Srebniak, M. I., Van Opstal, D., Hulsman, L. O. M., Van Zutven, L. J. C. M., & Wessels, M. W. (2012). Phenotypic variability of atypical 22q11.2 deletions not including TBX1. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *158* A(10), 2412–2420. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35517>
- Vervoort, L., Demaerel, W., Rengifo, L. Y., Odrzywolski, A., Vergaelen, E., Hestand, M. S., Breckpot, J., Devriendt, K., Swillen, A., McDonald-McGinn, D. M., Fiksinski, A. M., Zinkstok, J. R., Morrow, B. E., Heung, T., Vorstman, J. A. S., Bassett, A. S., Chow, E. W. C., Shashi, V., & Vermeesch, J. R. (2019). Atypical chromosome 22q11.2 deletions are complex rearrangements and have different mechanistic origins. *Human Molecular Genetics*, *28*(22), 3724–3733. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz166>
- Vittorini, S., Sacchelli, M., Iascone, M. R., Collavoli, A., Storti, S., Giusti, A., Andreani, G., Botto, N., Biagini, A., & Clerico, A. (2001). Molecular characterization of chromosome 22 deletions by short tandem repeat polymorphism (STRP) in patients with conotruncal heart defects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *39*(12), 1249–1258. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2001.201>
- Vlckova, M., Hancarova, M., Drabova, J., Slamova, Z., Koudova, M., Alanova, R., Mannik, K., Kurg, A., & Sedlacek, Z. (2014). Monozygotic twins with 17q21.31 microdeletion syndrome. *Twin Research and Human Genetics*,



17(5), 405–410. <https://doi.org/10.1017/thg.2014.29>

W

- Wapner, R. J., Martin, C. L., Levy, B., Ballif, B. C., Eng, C. M., Zachary, J. M., Savage, M., Platt, L. D., Saltzman, D., Grobman, W. A., Klugman, S., Scholl, T., Simpson, J. L., McCall, K., Aggarwal, V. S., Bunke, B., Nahum, O., Patel, A., Lamb, A. N., ... Jackson, L. (2012). *Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis*, 367(23), 2175–2184 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203382>
- Wieczorek, D., Krause, M., Majewski, F., Albrecht, B., Horn, D., Riess, O., & Gillissen-Kaesbach, G. (2000). Effect of the size of the deletion and clinical manifestation in Wolf-Hirschhorn syndrome: Analysis of 13 patients with a de novo deletion. *European Journal of Human Genetics*, 8(7), 519–526. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200498>
- Wiener-Megnazi, Z., Auslender, R., & Dirnfeld, M. (2012). Advanced paternal age and reproductive outcome. *Asian Journal of Andrology*, 14, 69–76. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.69>
- Wise, C. A., Garcia, C. A., Davis, S. N., Heju, Z., Pentao, L., Patel, P. I., & Lupski, J. R. (1993). Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *American Journal of Human Genetics*, 53(4), 853–863.
- Wu, Y. Q., Heilstedt, H. A., Bedell, J. A., May, K. M., Starkey, D. E., McPherson, J. D., Shapira, S. K., & Shaffer, L. G. (1999). Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 313–321. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.2.313>
- Wu, Y. Q., Sutton, V. R., Nickerson, E., Lupski, J. R., Potocki, L., Korenberg, J. R., Greenberg, F., Tassabehji, M., & Shaffer, L. G. (1998). Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *American Journal of Medical Genetics*, 78(1), 82–89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980616\)78:1<82::AID-AJMG17>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980616)78:1<82::AID-AJMG17>3.0.CO;2-K)
- Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S., Arnheim, N., Tiemann-Boege, I., Jabs, E. W., Glaser, R. L., Pearson, F. S., & Evenson, D. (2006). Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm: Commentary. *PNAS*, 103(25), 9601–9606. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000238646.91712.3e>

Y

- Yang, S. P., Bidichandani, S. I., Figuera, L. E., Juyal, R. C., Saxon, P. J., Baldini, A., & Patel, P. I. (1997). Molecular analysis of deletion (17)(p11.2p11.2) in a Family segregating a 17p paracentric inversion: Implications for carriers of paracentric inversions. *American Journal of Human Genetics*, *60*(5), 1184–1193.
- Yang, S. P., Figuera, L. E., Juyal, R. C., Saxon, P. J., Baldini, A., & Patel, P. (1997). Molecular Analysis of Deletion (17)(p11.2p11.2) in a Family Segregating a 17p Paracentric Inversion: Implications for Carriers of Paracentric Inversions. *Am. J. Hum. Genet*, *60*(5), 1184–1193.
- Yao, C., Yang, C., Zhao, L., Li, P., Tian, R., Chen, H., Guo, Y., Huang, Y., Zhi, E., Zhai, J., Sun, H., Zhang, J., Hong, Y., Zhang, L., Ji, Z., Zhang, F., Zhou, Z., & Li, Z. (2020). Bi-allelic SHOC1 loss-of-function mutations cause meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *Journal of Medical Genetics*, *0*, jmedgenet-2020-107042. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2020-107042>

Z

- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., Auerbach, A. D., & Andreassen, P. R. (2010). FANCD1/BRIP1 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses. *Chromosoma*, *119*(6), 637–649. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0285-6>
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., Yu, X., & Author, C. B. (2009). PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr Biol*, *19*(6), 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>
- Zhang, L., Lu, H. H. S., Chung, W. Y., Yang, J., & Li, W. H. (2005). Patterns of segmental duplication in the human genome. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(1), 135–141. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh262>

