

**Identificació de variants en nombre de còpia
en la síndrome DiGeorge/Velocardiofacial i
en l'esquizofrènia**

Anna Brunet Vega

Tesi doctoral

Sabadell, Juliol 2009

La ciència i l'art són dos aspectes de la creativitat humana.
El dibuix de la portada està inspirat en la imatge obtinguda amb un escàner
electrònic d'una cèl·lula mare.
Il·lustració de Montserrat Vega Castellví

Identificació de variants en nombre de còpia en la síndrome DiGeorge/Velocardiofacial i en l'esquizofrènia

Anna Brunet Vega

Memòria presentada per optar al grau de Doctora
Per la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra Míriam Guitart Feliubadaló i la codirecció del Dr. Lluís Armengol Dulcet a la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell en col·laboració amb el programa Gens i Malaltia del Centre de regulació Genòmica (CRG) de Barcelona.

Tesi doctoral adscrita al departament de Biologia
Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de
Barcelona, sota la tutoria de la Dra Maria Rosa Caballín.
Juliol 2009

Míriam Guitart Feliubadaló

Lluís Armengol Dulcet

Anna Brunet Vega

Els treballs de recerca duts a terme en aquesta tesi han estat realitzats al laboratori de recerca del UDIAT-Centre Diagnòstic de la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell i en el laboratori del programa Gens i Malaltia del Centre de Regulació Genòmica (CRG), centre integrat al Parc de recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).

Fundació
Parc Taulí
Institut Universitari UAB



La recerca duta a terme ha estat possible gràcies al suport de la Fundació Parc Taulí Institut Universitari UAB, del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) de l'Instituto Carlos III (Red de genotipación y Psiquiatria Genética) i a la col·laboració establerta amb el grup coordinat pel Dr. Xavier Estivill del programa gens i malalties del Centre de Regulació Genòmica (CRG).

Als meus pares

És clar que tot és molt relatiu
Dirac

Índex

Agraïments	xi
1. Introducció	1
1.1 El genoma humà	1
1.1.1 Seqüenciació del genoma humà	1
1.1.2 Variabilitat al genoma humà	4
1.1.2.1 Variabilitat en la seqüència i SNPs	5
1.1.2.2 Variants estructurals: CNVs	8
1.1.2.3 Identificació de variants estructurals	11
1.1.2.4 Origen de les variants estructurals	14
1.1.3 Contribució de les CNVs al fenotip i malalties humanes	17
1.1.3.1 CNVs i gens	17
1.1.3.2 CNVs i malalties humanes	21
1.2 Regió cromosòmica 22q11.2	24
1.2.1 Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial (SDG/VCF)	24
1.2.1.1 Antecedents i nomenclatura clínica	24
1.2.1.2 Característiques clíniques	25
1.2.1.3 Prevalença i diagnòstic	30
1.2.2 Síndrome de la microduplicació 22q11.2	32
1.2.3 Duplicacions segmentaries a la regió 22q11.2	33
1.2.4 Models animals i gens candidats	37
1.3 Esquizofrènia i variants en nombre de còpia	45
1.3.1 Manifestacions clíniques i diagnòstic de l'esquizofrènia	45
1.3.2 Etiologia de l'esquizofrènia	49
1.3.3 Epidemiologia genètica de l'esquizofrènia	54
1.3.3.1 Estudis de lligament	54
1.3.3.2 Estudis d'associació	55
1.3.3.3 Gens candidats en l'esquizofrènia	56
1.3.4 CNVs associades amb l'esquizofrènia	59
2. Objectius	63
3. Material i mètodes	65
3.1 Subjectes	65
3.2 Mètodes	67

3.2.1 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	67
3.2.2 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	68
3.2.3 Hibridació genòmica comparada en <i>array</i> (<i>array-CGH</i>)	73
4. Resultats	77
Estudi I	
I-A: Publicació 1	79
Microdeletion and Microduplication 22q11.2 screening in 295 Patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome. <i>American Journal of Medical Genetics Part A 140A: 2426-2432 (2006)</i>	
I-B: Publicació 2	89
Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangements among patients with schizophrenia. <i>Behavioral and Brain Functions Feb19; 4: 10 (2008)</i>	
Estudi II	
II-A: BAC arrays in patients with VCFS-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1	107
II-B: Identificació d'una microduplicació a 15q13.1 mitjançant <i>array-CGH</i> en un pacient amb esquizofrènia i trets facials dismòrfics	133
Estudi III	143
5. Discussió	145
5.1 Microdeleció i microduplicació 22q11.2	146
5.2 <i>Array-CGH</i> i noves malalties genòmiques	153
5.3 Regió 1q21.1	157
5.4 Identificació de CNVs en l'esquizofrènia	159
6. Conclusions	169
7. Referències	171
8. Abreviatures	195
Annex I	197
Rodriguez-Santiago et al., <i>Molecular Psychiatry</i> (2009) <i>Association of Common Copy Number Variants at the Glutathione-S Transferase Genes and Rare Novel Genomic Changes with Schizophrenia</i>	
Annex II	237
Protocols de laboratori	

Agraïments

Aquestes quatre pàgines pretenen donar les gràcies a tots i totes els qui heu estat al meu costat durant l'elaboració d'aquesta tesi. Afortunadament em ve al cap un munt de gent: col·laboradors, companys de feina que s'han convertit en amics, els amics que ja hi eren i estoïcament han resistit fins al final i, evidentment, la família, que mai m'ha fallat. És una gran sort tenir-vos al meu voltant, tots heu contribuït a fer possible aquesta tesi, que us podeu sentir vostra, i és ben difícil expressar només en unes ratlles tot el que representeu per mi cada un de vosaltres.

Aquesta tesi va començar al **Parc Taulí**. Vull agrair molt especialment a la **Míriam** que em donés l'oportunitat, tot just acabada la carrera, de poder viure el dia a dia del laboratori i aprendre lliçons que no estaven en cap de les assignatures de Biologia, però sobretot gràcies per haver-me despertat l'interès per la recerca, en un ambient hospitalari on els pocs recursos requereixen de grans dosis de vocació. Gràcies Míriam pel teu entusiasme i per estar al meu costat en tots els sentits. Durant aquests anys al Parc Taulí vaig coincidir també amb molta més gent que es mereix un especial reconeixement. La **Mari Carmen**, amb grans dosis de paciència, em va ensenyar els capritxos de la citogenètica, les seves lliçons de cariotip a cop de tissors m'han permès apreciar els grans avantatges de l'era informàtica!! Visca el Cytovision! Gràcies també a la **Carmeta** que sap localitzar sempre totes les mostres, és la Sherlock Holmes del laboratori i sort en tenim d'ella que recorda sempre els aniversaris de tothom. I... a dins del laboratori de recerca, una mena de món a part on ens hem anat creuant diversos personatges, vull donar les gràcies especialment al **Chema**, a la **Viqui**, a la **Laura**, a l'**Imma**, a la **Mercè**, a la **Beraguitas**, a la **doña Mariela** i a la **Neus** per ser com sou i per fer tan fàcil i amena la convivència en un espai reduït, on hem compartit des de coses materials, com la poiata, pipetes, ordinadors, taules i cadires, i també aspectes més personals com els gustos musicals! Ha estat un plaer coincidir amb tots vosaltres! I també encara dins la casa Taulí, aquesta tesi no hauria estat possible sense tots els professionals que hi han col·laborat i aportat el seu gra o muntanya de sorra. Gràcies **Elisabeth Gabau**, pel teu saber fer i saber tractar amb la gent, pel teu bon ull clínic i per respondre sempre a les meves preguntes. Gràcies també a la **Roser Guillamat** i al **Vicenç Vallès** per obrir-me camí en el camp de la psiquiatria, i a la **Trini** i a la **Laia** per tota la feina feta a l'hora de localitzar, citar i entrevistar pacients. Les vostres bases de dades són un gran tresor!

I ara ja fa uns quants anys...

...vaig ser convidada a fer una part del treball de recerca d'aquesta tesi al **Centre de Regulació Genòmica (CRG)**... Poc m'imaginava jo que m'hi quedaria tant de temps!! Al principi vaig anar a parar al departament de microarrays. Vull agrair al **Lauro** que em permetés rondar pel seu laboratori. Allà vaig tenir la sort de conèixer l'**Eva** i el **Manel**... El Manel era un noi nou que acabava d'aterrar en el laboratori de microarrays, i l'Eva ens va deixar sols uns mesos... Aleshores va ser quan vam descobrir el complex món ocult dels *arrays*, i quan vam haver d'enfrontar-nos a grans misteris encara per resoldre, com el de tancar la tapa d'una màquina de PCR!! Gràcies Eva per tornar a temps i saber-nos transmetre els teus coneixements sobre el món dels BACs i moltes gràcies Manel per intentar fer de mi una persona organitzada i per saber trobar sempre el que jo perdo de vista, és un enorme plaer treballar al teu costat!!

Després d'uns mesos al laboratori de microarrays vaig continuar la feina al **P13**, ara conegut com a **521!!!** Aquí vull agrair molt especialment al **Xavier Estivill** que m'hagi deixat formar part del seu equip. Gràcies per la teva capacitat de motivar i transmetre entusiasme per la recerca, pels teus coneixements i bons consells aportats en aquesta tesi i també per ser un científic amb dosis d'humanitat, les quals han fet possible poder compaginar el fet de treballar al CRG amb el d'acabar la tesi. I dins l'excel·lent grup de persones que configuren el P13 vull donar les gràcies especialment al **Lluís Armengol**, per haver contribuït en gran mesura a fer possible aquesta tesi. Moltes i moltes gràcies Lluís per l'esforç i hores nocturnes que hi has dedicat, en un moment en què engegaves un projecte empresarial que requeria grans dosis de la teva energia i dedicació, has trobat el temps per ajudar-me amb els teus consells, calbots i aportacions. Gràcies de nou!

I a continuació el galliner 521, amb quatre galls que intenten sobreviure entre tanta gallina... em sento afortunada i molt privilegiada d'haver-me pogut convertir en una gallina més del laboratori. Hem compartit molts dies de feina, seminaris, reunions i congressos... però a més a més hem esmorzat, dinat, sopat, berenat, fet cafès, tes i tertúlies, calçotades, "happy hours", hem cantat, hem ballat i filmat pel·lícules, hem jugat partits de vòlei, i hem anat a córrer per la platja, hem practicat l'anglès, i hem fet teràpies de grup, entre moltes altres coses que ara no cal esmentar... I tot això perquè sou gent fantàstica amb qui es pot fer de tot i feu que anar a treballar sigui un plaer! Així doncs és una gran sort poder xocar amb el **Sergi** quan vaig de l'ordinador a la pòlida, sempre està al mig! I fa tants anys que no ser si sabria fer res sense consultar-li, això sí, prèviament a la pregunta cal donar-li un copet perquè es tregui els auriculars o afluixi la música que escolta a tot drap je je... Gràcies Sergi per tots els teus bons consells i aportacions que no són pas pocs... I per allà a prop hi ha la **Lorena** florida esperant el Sergi per anar a fer un cafè, i la **Raquel** i l'**Alexander**, dos grans fixatges al laboratori que desprenen alegria i bon rotllo... ui... que ve la **Morell**, la meva nena cuca, que rondina i diu unes paraulotes que no es poden treure de context... Marta ets la millor! Ho saps... i tens una capacitat sobrenatural i una gràcia innata per rondinar, insultar i fer-te estimar al mateix temps, ets un fenomen! Sense tu el laboratori estaria perdut! I l'**Elisa**, la Docampo... la *funny girl*, la

doctora més *xaxaraxera* de tot el laboratori, la millor companya de *bodas, bautizos, comuniones* i del què calgui! I la Saus, perdó, vull dir **l'Ester**! La més guapa, que sempre té a punt bons consells per a tothom, perquè té la sort de saber posar-se a la pell dels altres, i a tu qui t'escolta? Gràcies per aguantar les meves xapes i per fer classes d'anglès tan d'hora al matí! I la **Susanita**, que és la *jarrai* més bona persona de la història, eres un encanto! I a l'altre extrem del laboratori, hi fan vida un grup de sonadetes que juguen a soldats i segrestos, l'**Elena** que amb els seus ensurts em manté alerta i així no m'adormo, l'**Eva** amb veu tranquil·la i pausada però que les mata callando... I la **Birgit**, amb qui tinc la sort de poder practicar l'idioma de l'Imperio, l'espanyol! I la **Laia**, la capitana dels Tocapilotes, amb qui hem compartit experiments dels experiments dels MLPAs... Això sí, ho tenim tot ben apuntat a la llibreta! I... qui més? Doncs gràcies a molta gent... com la **Bañez**, que ens té mal acostumats amb les seves rosquilles, o els post-docs del despatx del costat: la **Kelly** i el **Mario** sempre disposats a contestar consultes, donar ajuda i consells... o la **Silvieta**, gràcies per cantar boniques cançons. I les nenes de la nevera, la **Mariona**, la **Marga**, la **Georgia**, i la **Gratacòs** amb qui hem viscut la recerca del flamingo! I la **Yolanda**, ja et pensaves que m'havia oblidat de tu?? No... Sempre pendent de què no marxem a dinar sense ella, però ara fa uns dies que no sabem on és... *Qué pasó, qué pasó, Yolanda? Dónde estás, te busqué Yolanda...*

I tota la gent del Zulo!! A part de les gràcies per tot el suport laboral i la vostra paciència amb tots nosaltres que només fem que demanar i portar plaques, no em puc imaginar els dinars i posteriors cafès a la terrassa sense la **Puig**, el **Carles**, la **Carreras**, la **Silvia** i etc.! Les converses i debats més extravagants els he viscut amb vosaltres! Qualsevol tema us fa volar la imaginació a uns nivells inimaginables per la resta de la humanitat. Gràcies pels vostres comentaris, opinions, aclariments i hipòtesis sobre la vida real i extraterrestre. Sense vosaltres el món no podria rodar! No perdeu aquest humor!

I els que ja han volat del lab però que segueixen presents en cor i ànima! Gràcies per deixar la vostra inesborrable empremta... L'**Ester**, la **Ballana** de Torelló i els seus geranis! L'**Imma** que sense fer soroll està sempre a punt per ajudar els altres. El **Txema** que s'ha de dir que està bé i que té una lògica pròpiament genial i única, i és la millor parella de ball que he trobat mai! La **Nina**, amb qui hem compartit tantes coses de dia i de nit, amb calefacció i cafè salat inclòs! I la **Maya** que ara fa llargues estades a Hannover... Gràcies Maya pel teu cor enorme, pel teu riure i optimisme contagiós!

I tots aquestes anys al CRG han anat acompanyats de molta i molta més gent que, tot i no constar aquí han contribuït en molts moments. Gràcies a tota la gent del programa **Gens i Malalties** amb qui he compartit tant converses de passadís, com estones davant la impressora o celebracions de tesis vàries... I en el pis de sota, vull agrair molt especialment la contribució del **Benja** en aquesta tesi. Gràcies per tota la feina esquizofrènica que has aportat, per les teves mil respostes a mil preguntes, pels teus consells, pel tràfic de sondes de MLPA i per un llarg etc... de favors que no han rebut mai un no per resposta, i gràcies pel teu bon tarannà i sentit de l'humor que han fet tant fàcil la col·laboració.

I per acabar amb aquest llarg apartat d'agraïments i ja en l'àmbit més personal, vull donar les gràcies als **amics i amigues** que han patit la tesi des de fora del laboratori! Moltes gràcies a tots per la vostra paciència, suport moral i per ser el meu puntal! Sou lu mééés guapooos i guapeees del món! Gràcies a les famílies Pocapeles i tots els amics de Can Korpus, per les bones estones que hi hem passat i que hi passarem, ara que tindrem dutxa! Gràcies **Marc, Susi, Roc i Joana**, encantada de fer-vos de tieta Nuna-Bruni, i també de la negreta pobreta! Gràcies **Masipi i Tito** per ser-hi sempre que cal, i gràcies **Reixu** per portar sempre el turbio, i els **Pirulis i Piruletes** una gran família!! La **Tello**, el **Jaume**, el **Dani** i la **Tuà**, els artistes de la trope, gràcies per la vostra musica acompanyada de bona companyia, i gràcies a la **Laia** per aparèixer en qualsevol lloc i moment, especialment quan se la necessita. I a la **Marta Masip** i a la **Meri**, gràcies per no fer-me propostes deshonestes quan sabíeu que havia d'escriure, i a la **Marta Flore**, carinyu que això ja està! I a la **Sandruxi**, tan lluny i tan a prop alhora, i a la inseparable **Ferrer**, que mira que fa anys que anem pels mateixos camins, fins i tot ens hem atrevit a viatjar per terres llunyanes, on vull agrair també la bona companyia de tots els que ens han acompanyat... **David, Mònica, Roger i Marc**, és un plaer recórrer món amb vosaltres!

I **la família**, els últims però els que fa més anys que són al meu costat. Als meus **pares** qui han fet possible que jo hagi pogut dedicar tants anys a la meva formació, gràcies pel vostre suport incondicional, la vostra comprensió i afecte!! Saber que hi sou sempre és una gran sort! I a la **Neus** i al **Santi** gràcies per no fallar mai i per fer-me tieta de la nena més guapa de totes, **l'Elna**, tant plena d'energia que resulta la personeta ideal per desconnectar totalment de qualsevol mal de cap. I a **les àvies**, la Pepita i la Rosa, que tinc la gran sort de tenir encara al meu costat, gràcies per tants anys de *mimos*, no hi ha res com tenir àvies guapes com vosaltres ! I gràcies, finalment, a tots els caps de setmana de pluja!! Gràcies per omplir els pantans i fer que quedar-se a casa escrivint aquesta tesi resultés molt més fàcil.

XIN PUN

1. Introducció

1.1 El genoma humà

El **genoma humà** està constituït per uns 3.200 milions de parells nucleòtids, distribuïts en 24 cromosomes diferents (22 autosomes i 2 cromosomes sexuals) que contenen entre 20 i 25.000 gens. En aquest conjunt de milers de milions de "peces" es troba codificada la informació que es transmetrà de generació en generació i que determinarà l'expressió, altament coordinada i adaptable a l'ambient, del conjunt de les proteïnes que conformen els éssers humans.

1.1.1 Seqüenciació del genoma humà

El 1990 es va engegar el Projecte Genoma Humà (PGH). Aquest ambiciós projecte va començar de mans d'un consorci públic format per més d'una cinquantena de centres de recerca dels Estats Units, Regne Unit, Alemanya, Japó, França i Xina. Sota el lideratge de l'Institut Nacional de la Salut dels Estats Units i la fundació britànica Wellcome Trust, que es van distribuir la laboriosa tasca de d'identificar i cartografiar els 3.200 milions de bases que conformen la seqüència del genoma humà. L'estratègia adoptada per aquest consorci públic, anomenada seqüenciació jeràrquica, consistia en trencar el genoma en petits fragments de 100-200Kb i clonar-los en cromosomes artificials de llevat (YACs) o de bacteri (BACs). Aquests YACs i BACs, mapats i ordenats linealment sobre el genoma emprant l'ajuda de marcadors genètics, eren posteriorment fragmentats en trossets més petits (500pb) que se solapaven entre ells. Els fragments amb una major longitud de superposició eren seqüenciats i assemblats a partir dels successius solapaments obtinguts en l'etapa anterior.

Vuit anys més tard de l'inici del PGH, Craig Venter es va separar del projecte públic i va constituir la corporació biotecnològica Celera Genomics. Amb una inversió de 300 milions de dòlars (10 vegades inferior a la del consorci públic) van

Introducció: El genoma humà

comprar 300 unitats de potents equips d'anàlisi genètica i un sistema informàtic constituït per 1.400 ordinadors. Celera es proposava completar la seqüència del genoma humà amb molt menys temps i una inversió inferior, amb la intenció, no absent de polèmica, de patentar centenars de gens per vendre'ls a la indústria farmacèutica i demostrar així la validesa i efectivitat del seu controvertit mètode de seqüenciació anomenat "shotgun". Aquest sistema, basat en la força bruta que suposa disposar d'una gran capacitat de seqüenciació i un enorme còmput informàtic, consisteix en trossejar a l'atzar tota la seqüència d'àcid desoxiribonucleic (DNA) que compon el genoma en una infinitat de petits fragments (~2kb), generant llibreries de plasmidis que seran seqüenciades a partir dels seus extrems. Posteriorment es procedeix a l'assemblatge dels fragments per solapament de seqüències emprant sistemes informàtics que analitzaven la similitud entre les diferents cadenes. Cal mencionar, però, que aquest ambiciós objectiu privat finalment va requerir de la utilització de dades del consorci públic per a l'assignació de la posició cromosòmica dels fragments que s'anaven generant en l'assemblatge (Figura 1.1).

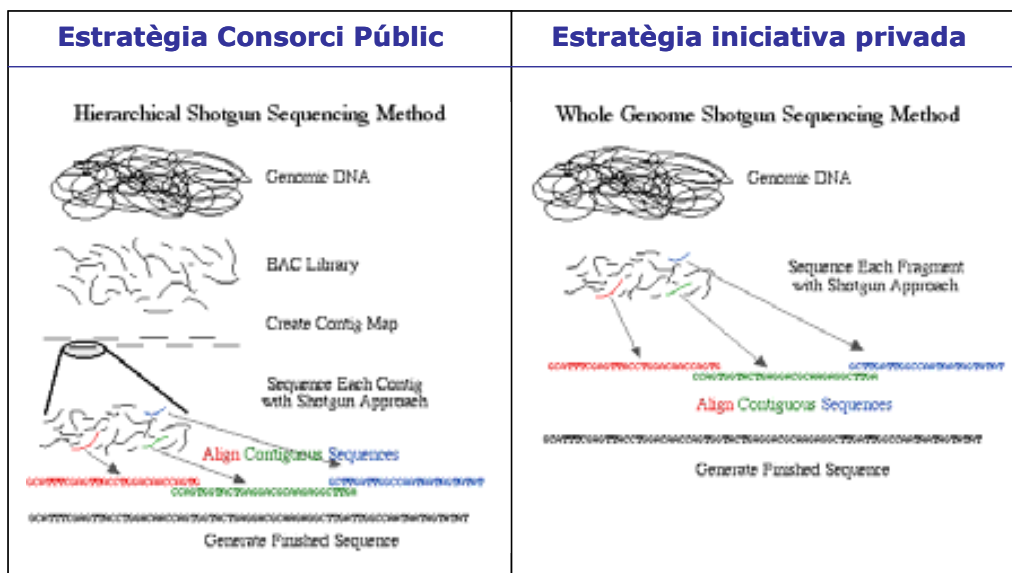


Figura 1.1: Esquema de les dues estratègies emprades per a la seqüenciació del genoma humà.

El 26 de Juny de l'any 2000, força abans del previst i després de deu anys d'investigació i d'una dura pugna entre ambdós projectes, es fa públic l'anunci de la consecució del primer esborrany de la seqüència completa del genoma humà.

L'anunci es va fer des de la Casa Blanca amb representació dels governs americà i britànic, i amb la presència d'ambdues parts implicades: Craig Venter, president de Celera, i Francis Collins, director del PGH. Tot i aquest anunci polític, les dues versions de la seqüència del genoma humà no van sortir a la llum fins uns mesos més tard, el 15 de Febrer de 2001, quan el Consorci Públic publicava a la revista Nature (Lander et al. 2001) el resultat de la seva seqüència consens, resultant de l'assemblatge de múltiples seqüències provinents de nombrosos donants. L'endemà, l'empresa privada Celera comunicava, a través de la revista Science (Venter et al. 2001), la seva versió de la seqüència derivada del genoma de cinc individus. En ambdues publicacions el genoma humà es presenta com una seqüència haploide en què les variants genètiques no van ser anotades. Un parell d'anys més tard, el Consorci internacional per la seqüenciació del genoma humà anuncia que s'ha completat amb èxit el PGH, i és aleshores quan es disposa de la seqüència del genoma amb una major qualitat, on la majoria de forats ("gaps") estan ja més ben coberts.

L'obtenció de la seqüència del genoma humà ha suposat una de les fites més importants de la genètica humana. Actualment es coneix que el nostre genoma presenta una densitat de gens molt inferior a la que s'havia predit inicialment (tan sols un 1.5% de la seqüència conté exons codificants per proteïnes). En un 70% està constituïda per DNA extragènic i només el 30% restant per seqüències relacionades amb gens. Del total de DNA extragènic, aproximadament un 70% correspon a repeticions disperses, de manera que, més o menys, la meitat del genoma humà està compost per seqüències de DNA repetitiu. D'altra banda, del total de DNA relacionat amb els gens s'estima que el 95% correspon a DNA no codificant: pseudogens, fragments de gens, introns, seqüències UTR, etc. (Figura 1.2).

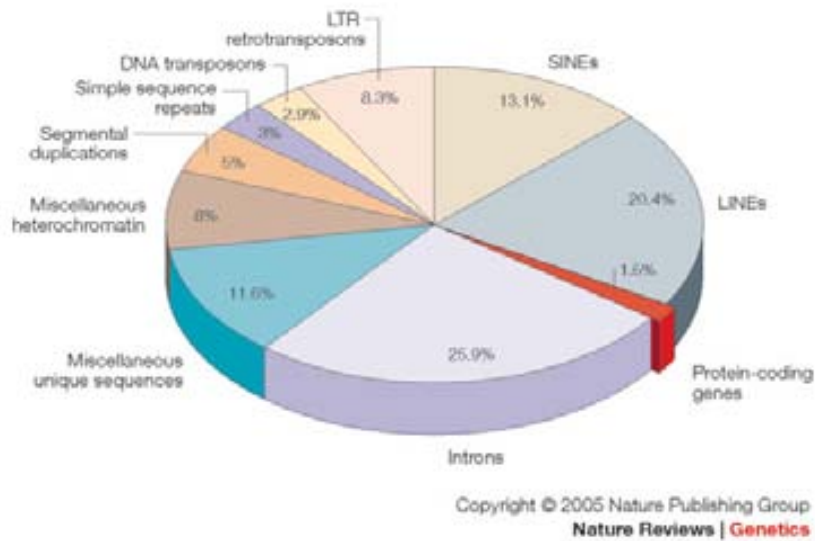


Figura 1.2: Components del genoma humà. Només l'1.5% dels 3 bilions de parells de bases codifiquen per proteïnes, mentre que aproximadament el 45% de la seqüència consisteix en "paràsits genòmics" (transposons de DNA, LTR retrotransposons, *Long and Short Interspersed Nuclear elements* [LINEs i SINEs]) i especialment els seus romanents extingits. Extret de (Gregory 2005).

1.1.2 Variabilitat al genoma humà

El Projecte Genoma Humà ha aportat a la comunitat científica una seqüència de 3 bilions de nucleòtids de referència sobre la qual explorar la variabilitat genètica en l'herència entre individus. La realització d'estudis detallats de variabilitat en el genoma d'un nombre important d'individus ha permès constatar que el grau de variació de la seqüència de DNA és de l'ordre de 10 vegades superior a la que se suposava fa algun temps (Sachidanandam et al. 2001; Hinds et al. 2005). En paral·lel amb l'evolució de tecnologies (com els *arrays* i les noves tècniques de seqüenciació) s'ha produït el descobriment de nous tipus de variacions presents en el nostre genoma que afecten a milers de Kb de DNA, trobant-se àmpliament distribuïdes al llarg de tot el genoma. Si tenim en compte aquests nous descobriments, es poden distingir dues grans fonts de variabilitat en la molècula de DNA: *Variabilitat en la seqüència* on s'inclouen els canvis a nivell de nucleòtids que componen el DNA (canvis puntuals que afecten petites porcions, de menys d'1Kb, de seqüència i que inclouen els SNPs, les insercions/delecions (in/dels), els microsatèl·lits i petites inversions, entre d'altres) i *Variants estructurals*, on s'inclouen les diferències a nivell de l'arquitectura del genoma (regions de entre

1Kb i fins a diverses Mb que varien tant en la localització i orientació, com en el nombre de còpia) (Eichler et al. 2007) (Figura 1.3). Malgrat que no és objecte d'aquesta tesi, cal tenir present l'existència de, com a mínim, una altra font de variabilitat essencial, molt més dinàmica que les anteriors, com és la variabilitat epigenètica.



Figura 1.3: Fonts de variació del genoma humà. Les variants del genoma s'han descrit a nivell citogenètic i molecular, les noves tecnologies han posat al descobert la seva importància a escala del genoma humà complert. Aquesta variabilitat implica des d'un sol nucleòtid fins a llargs segments de DNA, i inclou insercions, deleccions, translocacions i inversions de material genòmic.

1.1.2.1 Variabilitat en la seqüència i SNPs

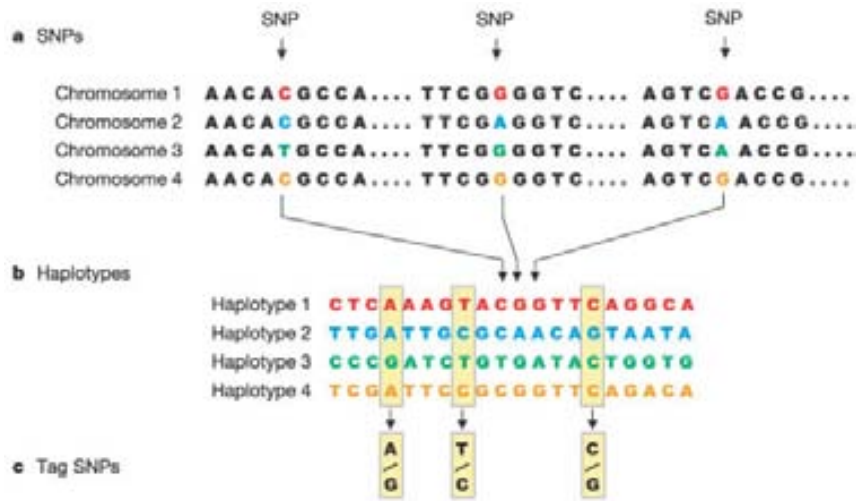
Les seqüències de DNA de dos éssers humans del mateix sexe comparteixen un percentatge elevadíssim de nucleòtids, entorn del 99,92%. El 0,08% restant (2,5Mb) està format per variants que inclouen els polimorfismes de nucleòtid simple (SNPs, de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*), diversos elements repetitius que impliquen a regions relativament curtes de DNA (com per exemple els micro- i

minisatèl·lits), i també petites (<1Kb) insercions, delecions, inversions i duplicacions.

Els SNPs són la font de variabilitat entre individus que ha estat més estudiada en els darrers anys. Un SNP és la substitució d'un nucleòtid per un altre en una posició concreta dins de la seqüència, en què ambdós al·lels són observats amb una freqüència superior a l'1% en la població. S'estima que dels aproximadament 3.2 bilions de nucleòtids que constitueixen el genoma d'un individu, uns 10 milions corresponen a SNPs comuns en l'espècie humana, això representa una mitjana d'1 SNP cada 1200 nucleòtids. Molts d'aquests SNPs presenten gradients de distribució geogràfica i la seva freqüència és radicalment diferent en comparar poblacions humanes. Alguns SNPs es localitzen en regions codificants del genoma, però no necessàriament impliquen un canvi en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna. Els SNPs en què ambdós al·lels donen lloc al mateix aminoàcid s'anomenen *sinònims*, mentre que els que resulten en una seqüència polipeptídica diferent s'anomenen *no-sinònims*. Al seu torn, un SNP no-sinònim pot ser o bé "*missense*" o bé "*nonsense*", en funció de si el canvi dona lloc a un aminoàcid diferent o si origina un codó de stop prematur. Els SNPs que no afecten nucleòtids que donen lloc a proteïnes codificants poden tenir igualment conseqüències funcionals, ja que poden alterar el "splicing" dels gens, afectar llocs d'unió de factors de transcripció o alterar seqüències de RNAs no codificants. Existeixen diferents catàlegs que recullen els SNPs identificats en el genoma humà (HAPMAP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>).

Els SNPs han estat molt utilitzats com a marcadors genètics per a la identificació de regions del genoma implicades en malalties, en els anomenats estudis d'associació global del genoma (GWAS de *Genome Wide Association Studies*). Recentment, han permès la identificació de nombrosos gens de susceptibilitat per a malalties complexes (Burmeister et al. 2008). El desenvolupament d'aquests mètodes d'anàlisi massiu de variants ha estat possible, en gran mesura, gràcies al desenvolupament de noves tecnologies de genotipat (que permeten analitzar fins a un milió de SNPs en un sol experiment) i al coneixement generat en el sí del projecte HapMap (www.hapmap.org) (Frazer et al. 2007). Aquest projecte persegueix desenvolupar un mapa d'haplotips (grups de SNPs) del genoma humà i caracteritzar els patrons de variació genètica en el genoma de diverses poblacions mundials, fent possible la selecció dels anomenats *Tag-SNPs* (o SNPs marcadors), que permeten capturar el màxim d'informació

genètica amb el mínim nombre de variants. Tot reduint el nombre de SNPs a genotipar, es redueix el cost, fent econòmicament factibles els estudis de lligament a nivell de genoma sencer (Figura 1.4). Donada la diferent freqüència de variants en diferents poblacions humanes, en població europea s'estima que genotipant uns cinc-cents mil *Tag-SNPs* es pot capturar tota la variabilitat coneguda en el genoma, mentre que en població africana se'n necessiten més d'un milió (Figura 1.4).



r^2 threshold	YRI	CEU	CHB +JPT
$r^2 \geq 0.5$	324,865	178,501	159,029
$r^2 \geq 0.8$	474,409	293,835	259,779
$r^2 = 1.0$	604,886	447,579	434,476

Figura 1.4: Tag-SNPs. El fet que certes variants estiguin en desequilibri de lligament i que, per tant, s'heretin en bloc, fa que no sigui necessari genotipar-les totes i cadascuna d'elles. Així, per exemple, si en la població europea se sap que sempre que es troba una A en el locus 4, hi ha una T en el locus 8, només genotipant el locus 4 es captura la mateixa informació genètica que si s'estiguessin genotipant els dos loci. La taula de sota indica el nombre de *TagSNPs* seleccionats per capturar tots els SNPs comuns en la fase I del HapMap (YRI: 30 trios Yoruba; CEU: 30 trios d'ancestre europeu; CHB: 45 individus no relacionats de Xina; JPT: 45 individus no relacionats de Japó.)

Els GWAS publicats fins al moment han emprat diferents plataformes o *arrays* comercials, que contenen aproximadament entre 300.000 i 500.000 d'aquests *tag-SNPs* comuns, per detectar diferències en les freqüències al·lèliques entre casos i controls (Barrett and Cardon 2006; Pe'er et al. 2006; Clark and Li 2007; Eberle et al. 2007). Per a més de 80 fenotips, incloent malalties i trets biològics diversos, els estudis del genoma global han aportat convincents

associacions estadístiques, implicant a més de 300 loci diferents del genoma humà (Shaw and Lupski 2004). Sorprenentment la majoria de gens o loci genòmics identificats en aquests GWAS no havien estat prèviament relacionats amb malalties complexes i suggereixen noves vies moleculars que posen de relleu l'existència de sub-fenotips. S'observa que quan es considera a la malaltia en el seu conjunt s'identifiquen diverses rutes o vies que poden desenvolupar la malaltia, però si s'avalua cada individu en particular només una o un subgrup d'aquestes rutes resulten implicades. Per exemple, la predisposició genètica a la diabetis tipus 2 (T2D) sembla implicar gens de rutes que afecten la formació i funció de cèl·lules- β pancreàtiques, així com rutes que afecten els nivells de glucosa i l'obesitat (Frayling 2007; Bouatia-Naji et al. 2009; Lyssenko et al. 2009).

Un altra observació resultant dels recents GWAS, és que una mateixa regió genòmica s'ha trobat associada a dues o més malalties diferents. Aquesta convergència de gens associats a múltiples malalties genera un nou concepte de xarxes que connecten gens, rutes i malalties (Goh et al. 2007), com pot ser el cas de diversos receptors d'interleuquines que han estat associats amb malalties de Crohn, esclerosi múltiple, lupus eritematós sistèmic i artritis reumatoide (Armengol et al. 2008; Lettre and Rioux 2008). O el d'un SNP al cromosoma 9p21, associat a diferents fenotips vasculars com l'infart de miocardi (Helgadottir et al. 2007; McPherson et al. 2007), l'aneurisma abdominal aòrtic i l'aneurisma entrecanal (Helgadottir et al. 2008). Aquestes troballes posen de relleu patogènies comuns en malalties en què no es sospitava, suggerint la necessitat d'un replantejament en les bases moleculars que causen les malalties humanes.

1.1.2.2 Variants estructurals: CNVs

Un dels camps de la genètica humana que ha atret gran atenció en els darrers anys és l'estudi de les variants estructurals. Aquesta font de variació inclou grans (>1Kb) insercions, delecions, i duplicacions, anomenades de forma col·lectiva variants en nombre de còpies (**CNVs**: *copy number variations*), així com variants posicionals i d'orientació, com les translocacions i les inversions (Figura 1.5).

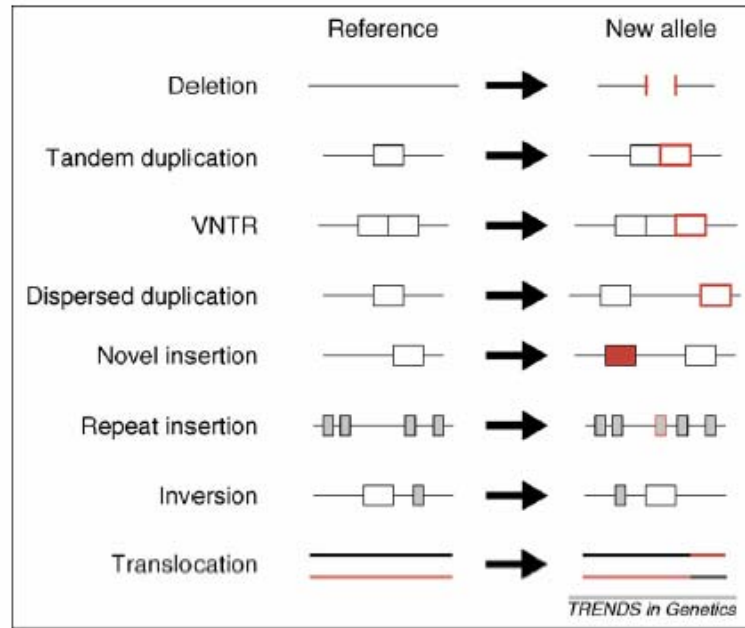


Figura 1.5: Alguns tipus de variants estructurals. Vuit tipus de variants estructurals definides en relació a la seqüència del genoma de referència. VNTR: *variable number tandem repeat*. Extret de (Hurles et al. 2008).

L'any 2004 es van publicar dos estudis pioners que, emprant BAC-arrays, van posar de relleu la gran quantitat de variants estructurals existents en el genoma humà, contribuint enormement al reconeixement de l'abast a nivell de genoma complet d'aquesta font de variació (Iafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004). Posteriorment molts altres estudis han anat descobrint l'abundància de CNVs en el genoma i el coneixement d'aquestes estructures ha anat creixent d'una forma accelerada (Sharp et al. 2005; Tuzun et al. 2005; Conrad et al. 2006; Mills et al. 2006; Redon et al. 2006; de Smith et al. 2007; Korbelt et al. 2007; Wong et al. 2007). Actualment, en la darrera actualització (Març 2009) de la base de dades de variants genòmiques (<http://projects.tcag.ca/variation>), hi ha registrades 21178 CNVs que corresponen a 6558 loci (Figura 1.6). Cal esmentar, però, que la majoria d'aquestes CNVs no han estat validades per metodologies alternatives, i que la seva llargada exacta tampoc està ben determinada.

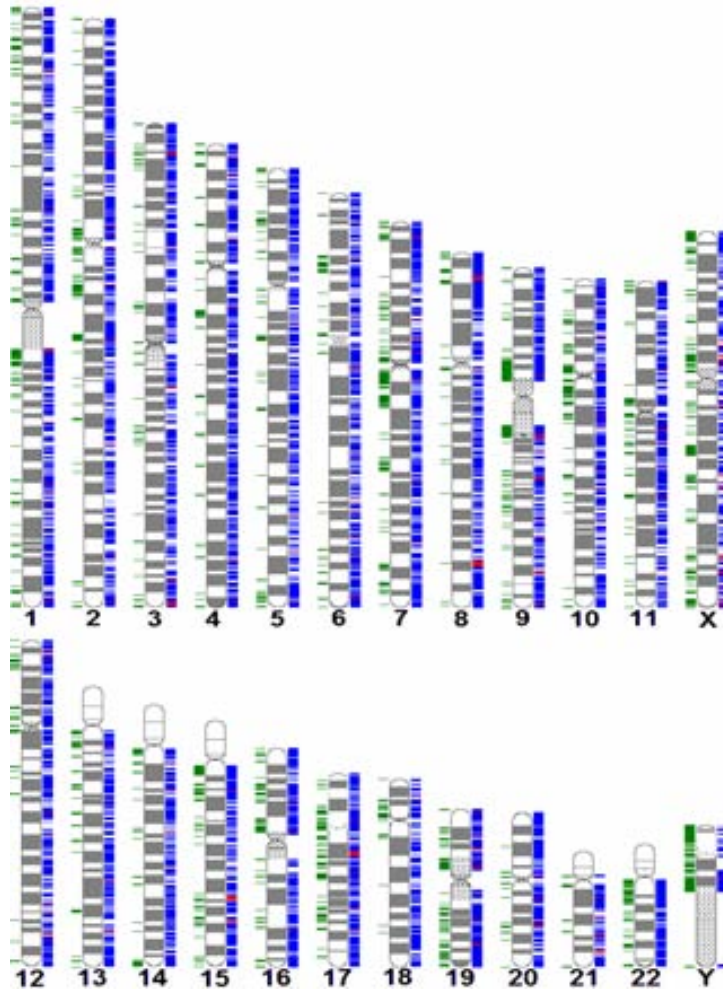


Figura 1.6: Ideograma de variants estructurals descrites en el genoma humà: Les barres blaves indiquen les CNVs identificades; les vermelles els punts de trencament d'inversions descrites i les barres verdes a l'esquerra mostren les duplicacions segmentàries. "Database of Genomic Variants" (<http://projects.tcag.ca/variation>).

Malgrat que en els darrers cinc anys s'ha avançat molt en el coneixement de les CNVs, també s'han generat molts interrogants: quin és el nombre total de CNVs en el genoma humà?, quina és la seva localització exacta?, quin és el seu contingut en gens?, i la seva freqüència en les diverses poblacions humanes?, existeixen patrons de desequilibri de lligament entre aquestes CNVs i altres variants més fàcils de reconèixer?. Resoldre aquestes qüestions permetrà entendre quina és la contribució de les variants estructurals a la variabilitat fenotípica observada entre humans i en les malalties genètiques.

1.1.2.3 Identificació de variants estructurals

El descobriment de les variants estructurals ha seguit un camí paral·lel al de l'evolució tecnològica en els mètodes d'anàlisi del genoma (Taula 1.2). Els primers guanys i pèrdues de material genètic van ser identificats a través de l'examen dels cromosomes sota el microscopi. Es van descriure alteracions de cromosomes sencers, com per exemple la trisomia 21 associada a la síndrome de Down, o d'altres anomalies que afecten a segments suficientment grans com per ser visibles en l'anàlisi del cariotip. El perfeccionament de les tècniques citogenètiques ha permès aconseguir una major resolució, i en situacions ideals es poden observar, en un cariotip, segments delecionats o duplicats d'entre 4 i 5Mb.

Als anys 90, el desenvolupament de la **hibridació in situ fluorescent (FISH)** va aportar una nova eina en la identificació de guanys o pèrdues submicroscòpiques. Aquesta tècnica, explicada en l'apartat 3.2.1 del material i mètodes, permet l'anàlisi de la majoria de les microdelecions i microduplicacions associades a malalties genòmiques conegudes així com avaluar trisomies, aneuploïdies, o guanys i pèrdues en les regions telomèriques, tant sobre els cromosomes en metafase com en cèl·lules en interfase.

El repte de poder analitzar tot el genoma amb major detall ha empès el desenvolupament de noves tècniques i aproximacions. La **hibridació genòmica comparada (CGH: *Comparative genomic hybridization*)** permet analitzar alhora tots els cromosomes i detectar guanys o pèrdues de material genòmic amb una resolució d'entre 3 i 10Mb. Els dos DNAs, marcats amb fluorocroms diferents, competeixen per hibridar sobre extensions metafàsiques de cromosomes d'un individu normal. Mesurant la proporció de fluorescència del DNA problema respecte al DNA de referència es poden determinar pèrdues i guanys relatius en la mostra problema. Aquesta tècnica va tenir un impacte important, particularment en l'estudi de reorganitzacions cromosòmiques associades a tumors i leucèmies. Tot i així, la seva resolució es veu limitada per l'aplicació de la tècnica sobre cromosomes en metafase.

Les llibreries de BACs utilitzades en la seqüenciació jeràrquica del projecte Genoma Humà van fer possible el desenvolupament dels *arrays* de BACs i la tècnica de l'**array-CGH**. Els cromosomes en metafase de la CGH clàssica es van substituir per BACs (que alberguen entre 80 i 200kb de seqüència de DNA del genoma humà) que es disposaven de manera endreçada (*array*) sobre un portaobjectes de vidre anomenat microxip de DNA o, simplement, *array*. Els primers *arrays* daten del

1997-1998 (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998), i des d'aleshores s'han desenvolupat i comercialitzat infinitat de formats i tecnologies que tenen poca cosa més en comú entre elles que la disposició ordenada de sondes sobre una matriu de vidre. Així doncs avui en dia conviuen els BAC-*arrays*, els *arrays* d'oligonucleòtids (s'empren sondes sintètiques d'oligonucleòtids d'entre 25 i 85 bp) i els SNP-*arrays*, que no es basen pròpiament en la tècnica de la CGH, ja que no es realitza una cohibridació de dos DNAs que competeixen, sinó que s'hibrida un sol DNA. Aquest darrer tipus d'*array* va ser desenvolupat inicialment per determinar la composició al·lèlica dels SNPs, però a partir de la intensitat de senyal generada per les sondes hibridades, bo i comparant-la amb les d'un altre individu o grups d'individus, permeten també identificar regions variables en nombre de còpies. Les noves generacions de SNP-*arrays* (per exemple Affymetrix 6.0 i Illumina 1M-Duo) ja s'han dissenyant per tal d'oferir aquest doble potencial d'interrogar SNPs i CNVs.

La tecnologia de microarrays és la metodologia que ha permès descobrir i avançar enormement en la identificació i descripció de les variants estructurals del genoma humà, però existeixen també altres tècniques moleculars utilitzades en l'anàlisi de guanys i pèrdues de loci genòmics. Aquests mètodes resulten més econòmics i de gran utilitat en estudis més modestos que pretenen analitzar un nombre precís i limitat de loci, i a l'hora de validar els resultats obtinguts mitjançant els anàlisis d'*arrays*. Entre aquests mètodes es troba la PCR quantitativa a temps real (**qPCR**) i altres mètodes com la **QMPSF** (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments*), la **MAQ** (*Multiplex Amplicon Quantification*), MAPH (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*) i el **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que permeten valorar guanys i pèrdues en diverses regions del genoma simultàniament en un mateix experiment. Les tècniques de FISH, *array*-CGH i MLPA han estat utilitzades en diversos treballs d'aquesta tesi, i per això es troben explicades amb més detall en l'apartat 3.2 de material i mètodes.

Finalment, les **aproximacions computacionals** i la nova generació de **tecnologies de seqüenciació** es perfilen com les eines més potents en la identificació de variants en el genoma. De manera simple, les aproximacions computacionals consisteixen en alinear *in silico* dues seqüències de DNA per detectar-hi diferències. Aquests mètodes presenten dos avantatges importants, el primer és que permeten identificar reordenaments balancejats, i el segon és que no existeix un límit de resolució, podent definir variants a nivell d'un sol nucleòtid.

Per altra banda, el desenvolupament d'una nova generació de tecnologies de seqüenciació com la 454 Life Sciences (Roche) (Margulies et al. 2005) o la SOLID (<http://solid.appliedbiosystems.com/> - Applied Biosystems) està reduint el temps i el cost de la seqüenciació a nivell genòmic, posant en mans dels científics una eina que ajudarà a una ràpida evolució en la identificació de la variabilitat genòmica. Combinant aquesta gran capacitat de seqüenciació amb l'estratègia del **mapatge d'extrems seqüenciats**, s'han desenvolupat aproximacions computacionals on els punts d'ancoratge deriven de les seqüències terminals dels clons (per exemple fòsmids) de llibreries genòmiques obtingudes a partir de genomes individuals. El maig del 2008, emprant aquesta estratègia es va explorar la variació en els genomes de vuit individus de diverses ètnies. Es va construir una llibreria genòmica per a cada un dels individus, mitjançant el clonatge de fragments de DNA de tamany predeterminat en fòsmids (Donahue and Ebling 2007), dels quals es van seqüenciar els extrems. Enfrontant aquests extrems seqüenciats contra el genoma de referència, i a partir de les discrepàncies en la mida i/o orientació d'aquestes respecte el genoma de referència van identificar potencials variants estructurals, que després van validar amb diferents mètodes (Kidd et al. 2008).

Taula 1.2: Mètodes per detectar variants estructurals en el genoma humà. Recull dels tipus de variants estructurals que es poden identificar amb els principals mètodes descrits així com els límits de detecció, que s'indiquen entre parèntesis.

Mètode	Translocació	Inversió	CNVs (> 1Kb)	Variants petites (< 1Kb)
Anàlisi de tot el genoma				
Cariotip	Si (> 5Mb)	Si (> 5Mb)	Si (> 5Mb)	No
BAC-array	No	No	Si (> 50kb)	No
Oligonuclòtid-array	No	No	Si (> 35Kb)	No
SNP-array	No	No	Si	Si (SNPs)
Aproximació computacional+seqüenciació	Si	Si	Si	Si
Mapatge per seqüenciació d'extrems (fòsmids)	Si	Si (punts de trencament)	Si (> 8kb delecions; >40Kb insercions)	No
Anàlisi de regions diana				
Genotipació de microsatèl·lits	No	No	Si	Si
MAPH	No	No	Si	Si
MLPA	No	No	Si	Si
QMPSF / MAQ	No	No	Si	Si
Real-time (QPCR)	No	No	Si	Si
FISH	Si	Si	Si	No

1.1.2.4 Origen de les variants estructurals

Existeixen tres mecanismes principals que poden originar variants estructurals en el genoma humà: 1) recombinació homòloga no al·lèlica (*NAHR: nonallelic homologous recombination*), 2) fusió d'extrems no homòlegs, NHEJ (*Non-homologous end joining*), 3) 'FoSTeS' (*Fork Stalling and Template Switching*) basat en mecanismes de replicació del DNA.

La recombinació homòloga no al·lèlica **NAHR** és causada per l'alineament i subseqüent encreuament entre dues seqüències de DNA no al·lèliques que comparteixen una elevada similitud entre elles. Aquests reordenaments, que es poden produir tant en meiosis com en mitosis, tenen com a substrat les duplicacions segmentàries (DS), també anomenades *Low copy repeats* (LCRs), que són blocs de seqüència de DNA de més d'1Kb, que es troben representades més d'una vegada per genoma haploide i que tenen una identitat superior al 90%. S'estima que aproximadament el 5% de la seqüència del genoma humà consisteix en DS (Bailey et al. 2002; She et al. 2004). Aquestes estructures poden contenir seqüències repetitives, estructures reconegudes de intró-exó, així com gens sencers o segments de gens. En les regions pericentromèriques i en els intervals subtelomèrics s'estima que entre un 11 i un 45% de la seqüència de DNA està formada per DS. Un 50% de les CNVs descrites en el genoma es troben solapant amb DS (Cooper et al. 2007), fet que apunta a alguna relació entre ambdós tipus d'estructures. L'estructura genòmica de les còpies paràlogues de les DS (tamany, grau d'identitat, orientació, distància i localització cromosòmica) determina el resultat dels processos de NAHR. Els mecanismes de NAHR poden implicar els dos cromosomes homòlegs (intercromosòmic), les dues cromàtides d'un mateix cromosoma (intracromosòmic) i, fins i tot, DS localitzades en una mateixa cromàtide (Stankiewicz and Lupski 2002). Els resultats de la recombinació seran delecions, duplicacions, translocacions o inversions que poden afectar fragments de tamany molt variable (Figura 1.7).

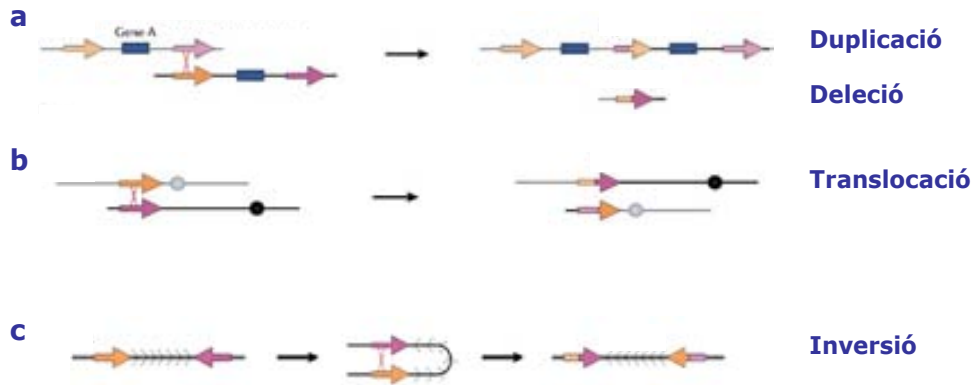


Figura 1.7: NAHR entre duplicacions segmentàries/LCRs: Durant la meiosi o mitosi es poden produir errors en l'alineament entre DS, la qual cosa conduiria a un entrecruament erroni que donaria lloc a les variants estructurals; a) Quan les dues duplicacions segmentàries es troben localitzades en el mateix cromosoma i en la mateixa direcció, la NAHR entre elles generarà duplicacions i/o deleccions, b) La NAHR entre DS localitzades en cromosomes diferents donarà lloc a translocacions cromosòmiques i c) quan l'entrecruament es produeix entre DS amb orientacions oposades es generen inversions.

La majoria de processos de NAHR es creu que s'originen de forma esporàdica en la població general. La relativa freqüència amb la que s'identifiquen deleccions i duplicacions en el genoma, flanquejades per DS i mediades per aquest mecanisme de NAHR, ha generat un interès creixent en l'anàlisi d'aquestes regions ja que poden tenir una important rellevància clínica. Un major coneixement del mecanisme de NAHR, combinat amb un acurat mapatge de les DS en el genoma humà està contribuint a predir les regions més inestables i susceptibles de generar reordenaments cromosòmics que podrien encobrir malalties genòmiques (Sharp et al. 2005; Sharp et al. 2006).

Entre els altres mecanismes que poden originar variants estructurals trobem el *Non-homologous end joining-NHEJ* que és un dels mecanismes principals emprats per les cèl·lules eucariotes per a la reparació dels trencaments de doble cadena del DNA (Figura 1.8) (Roth et al. 1985; Lieber et al. 2003; Weterings and van Gent 2004). En les cèl·lules humanes és utilitzat de forma rutinària per reparar tant els trencaments fisiològics com els patològics per exemple causats per radiacions ionitzants. Els punts de trencament dels reordenaments originats per NHEJ cauen sovint sobre elements repetitius com LTR, LINE, *Alu*, MIR i MER2 (Nobile et al., 2002; Toffolatti et al., 2002). A més a més motius de seqüències com TTTAAA, que poden causar trencaments de doble cadena o curvatures del DNA, es troben sovint en aquests punts (Nobile et al., 2002; Toffolatti et al., 2002). S'ha observat que anomalies en aquest procés de NHEJ són responsables d'un 15% de les immunodeficiències severes humanes (Schwarz et al. 2003), i aquest

mecanisme també és considerat el responsable de la fusió de cromosomes translocats en el càncer (Lieber 2008).

Més recentment s'ha descrit un altre mecanismes anomenat '**FoSTeS**' (*Fork stalling and template switching*) basat en la replicació del DNA (Figura 1.8) (Slack et al. 2006) i que permetria explicar reordenaments complexes, com els observats en el locus de la distròfia muscular de Duchenne (DMD) (Zhang et al. 2008) o les duplicacions en tàndem descrites en els gens *PLP1* i *LMNB1* (Woodward et al. 2005; Lee et al. 2006; Padiath et al. 2006). El FoSTeS es creu que podria ser l'origen de complexes duplicacions i delecions de CNVs, especialment en aquelles regions on la generació de CNVs no es pugui explicar per mecanismes de NAHR ni NHEJ.

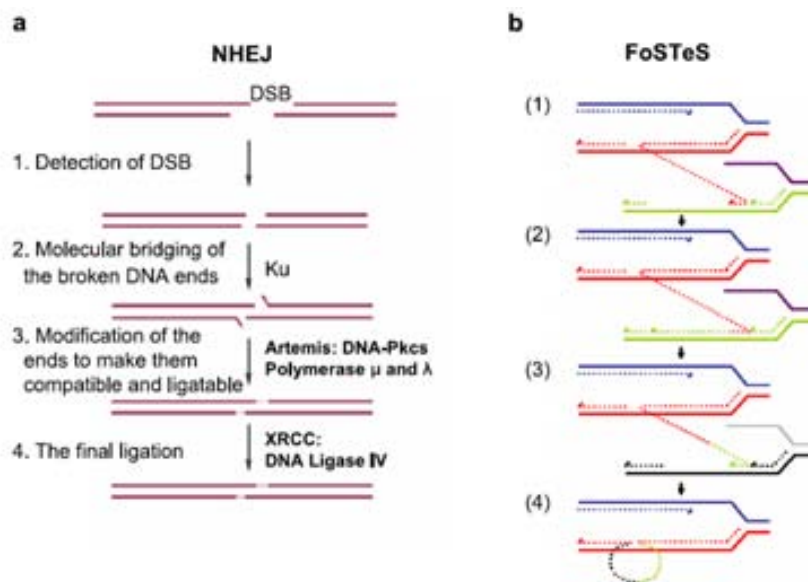


Figura 1.8: Mecanismes de reordenament genòmic NHEJ i FoSTeS.

A) El mecanisme de NHEJ es produeix en quatre etapes (Adaptat de (Lieber et al. 2003)). Es detecta un trencament de la doble cadena de DNA (*DSB: double-strand DNA break*), es genera un pont molecular d'ambdós extrems trencats i les modificacions necessàries en els extrems (addició o deleció d'algunes bases) per fer-los compatibles i poder procedir a la lligació, i finalment el pas de lligació. Les dues línies gruixudes mostren les dues cadenes de DNA amb el trencament, i els segments prims del mig representen les modificacions que han patit els extrems abans de la lligació final. La maquinària d'enzims que catalitzen cada pas està simplificada i estreta de les referències (Kirchhoff et al. 2007; Lieber 2008). **B)** Esquema adaptat de (Lee et al. 2007). Després de formar-se l'embús de replicació (línies contínues en blau fosc i vermell), la cadena motlle (línia puntejada vermella) s'allibera i s'anella a una segona força (línies contínues en verd i lila) per la via de la microhomologia (1) seguida de (2) l'extensió de la segona força que ara serà la "principal" i la síntesi de DNA (línia puntejada verda). Després de què la força s'alliberi (3) la força original (línies contínues en blau fosc i vermell) que està fent de motlle a les cadenes (vermella i verda, en línia puntejada) pot envair a una tercera força (línies en gris i negra). Les línies puntejades representen la nova cadena de DNA sintetitzada. Aquesta sèrie d'una força de replicació que s'allibera i envaeix a una altra cadena motlle pot produir-se varies vegades (ex FoSTeS x2, FoSTeS x3 ...etc) abans del punt (4) on es recupera la replicació original. Esquema estret de (Gu et al. 2008).

1.1.3 Contribució de les CNVs al fenotip i malalties humanes

La recent apreciació de les CNVs com una font àmplia i freqüent de variació en el genoma humà aporta un revolucionari coneixament en el camp de la genètica clínica, genètica de poblacions i epidemiologia. Mitjançant diversos mecanismes moleculars que inclouen les alteracions en la dosi gènica, la interrupció de gens, la fusió de gens, o efectes posicionals, entre d'altres, aquestes variants poden estar implicades en malalties Mendelianes, malalties genòmiques (Lupski et al., 1998), o malalties complexes.

1.1.3.1 CNVs i gens

La distribució de CNVs al llarg del genoma no sembla a l'atzar ja que s'han identificat diversos "punts calents" en què s'acumulen, com per exemple els telòmers o regions centromèriques (Cooper et al. 2007). També sembla que no hi ha proporcionalitat entre el tamany dels cromosomes i el nombre de variants que s'hi ha identificat. El cromosoma 18, per exemple, només conté un 19,8% de CNVs mentre que el contingut en els cromosomes 16, 17, 19 i 22 és de més del 41% en cada un d'ells (Iafrate et al. 2004).

També s'ha observat un enriquiment en CNVs en regions del genoma riques en gens, i una major densitat d'exons en les regions on s'hi localitzen CNVs (Cooper et al. 2007), i aquestes observacions també s'han descrit en el genoma de rata (Guryev et al. 2008). Cal esmentar però, com han suggerit alguns autors (Redon et al. 2006; Korbelt et al. 2007), que aquests càlculs podrien estar esbiaixats pel tipus de tecnologia emprada, ja que en la identificació de CNVs sovint s'han utilitzat *arrays* que contenen una major densitat de sondes que solapen amb gens. Actualment la xifra de gens continguts en CNVs és de més de 7000 (de Smith et al. 2008) i diversos estudis han descrit un enriquiment en determinades categories de gens. Entre aquestes, hi trobem gens implicats en la resposta immune (Feuk et al. 2006) i gens relacionats amb la percepció d'estímuls provinents de l'entorn, com els receptors olfactoris, els receptors del gust i diversos gens relacionats amb la vista i l'oïda (Redon et al. 2006; de Smith et al. 2007; Wong et al. 2007). També s'ha identificat una elevada presència de gens implicats en el processament neurofisiològic i el desenvolupament del cervell (de Smith et al. 2007). Per exemple el clúster de gens de les protocaderines en el cromosoma 5, és particularment ric en CNVs. Aquests gens es creu que tenen un paper en la complexa generació de les

connexions sinàptiques (Cooper et al. 2007), suggerint un impacte de les CNVs en la funció del cervell i la intel·ligència. Aquestes CNVs, que impliquen a gens relacionats amb la resposta a l'ambient i en el neurodesenvolupament, poden haver estat influïdes per la selecció natural, tenint un paper en l'adaptabilitat i capacitat de resposta als estímuls externs (Feuk et al. 2006). Totes aquestes observacions suggereixen que aquestes variants poden estar contribuint de forma rellevant a la diversitat humana i que poden tenir un paper important en malalties humanes, incloent les malalties monogèniques, infeccions, desordres autoimmunes i altres malalties complexes amb una component hereditària.

La següent qüestió que es planteja és, doncs, esbrinar com aquestes variants poden afectar l'expressió dels gens i si aquest efecte es reflecteix en el fenotip. S'ha estimat que les CNVs són responsables del 17,7% de la variació en l'expressió genètica heretada (Stranger et al. 2007). Els canvis en l'expressió originats per una CNV poden ser diferents d'un gen a un altre; per exemple en tres gens comunament delecionats com són el *GSTT1*, *GSTM1* i *UGT2B17*, s'ha vist que els canvis de dosi expliquen el 88%, 75% i 26% de la variació en els nivells d'expressió respectius (McCarroll et al. 2006). Però s'ha observat també que no tots els canvis en el nombre de còpies dels gens es corresponen amb canvis en els nivells d'expressió, un altre exemple són els gens de les alfa-defensines, que no mostren una relació entre els nivells totals de mRNA i el nombre de còpies (Aldred et al. 2005). En el requadre 1, es recullen diverses situacions que il·lustren com les CNVs poden alterar l'expressió dels gens. Stranger i col·laboradors (2007) van descriure que la meitat dels efectes de les CNVs sobre l'expressió dels gens són degudes a disruptcions en les seqüències codificants, com la pèrdua d'exons, efectes en els elements reguladors o altres regions funcionals. Les CNVs també poden originar nous gens resultants d'una fusió, i en aquest sentit Korbel i col·laboradors (2007) van identificar un nou gen resultant de la fusió entre les regions codificants de dos gens de receptors olfactoris (*OR51A4* i *OR51A2*). Un altre exemple seria la fusió entre el gen *PRSS1* i *PRSS2*, que es creu responsable d'una pancreatitis hereditària identificada en una família francesa (Masson et al. 2008). Finalment, també existeixen evidències que les CNVs poden tenir efectes sobre gens localitzats a grans distàncies >2Mb (Stranger et al., 2007). La delecio d'un gen repressor pot conduir a un increment en els nivells de transcripció d'un altre gen, mentre que duplicacions en les seqüències del promotor en direcció 3' poden disminuir els nivells d'expressió a causa de l'alteració de la posició entre el promotor i el gen

(Rodríguez-Revenga et al. 2007). Per exemple una petita duplicació del promotor del gen *PLP1* en direcció 3' silencia la seva expressió i causa un fenotip de paraplegia espàstica tipus II, molt similar a l'originat per mutacions en el gen (Lee et al. 2006).

Requadre 1. Les variants estructurals poden resultar benignes, predisposar a la malaltia, causar influències subtils en el fenotip (per exemple modificant la capacitat de resposta a medicaments o predisposar a la malaltia a les següents generacions. En funció de com el CNV efecte als gens existeixen diverses vies que poden conduir al fenotip patològic.

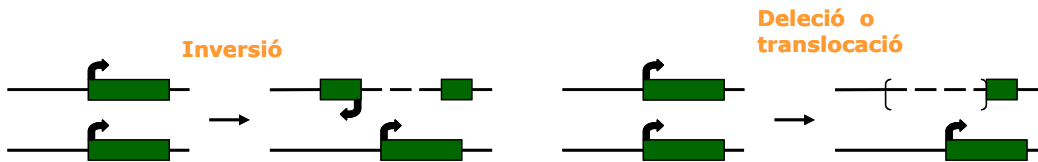
a) Gens inclosos a dins d'una variant estructural

- Els gens sensibles a dosi inclosos dins d'una variant estructural poden causar la malaltia a través d'una duplicació o deleció.
- Els gens no sensibles a dosi també poden causar la malaltia, quan la seva deleció desemmascara una mutació recessiva en el gen del cromosoma homòleg.



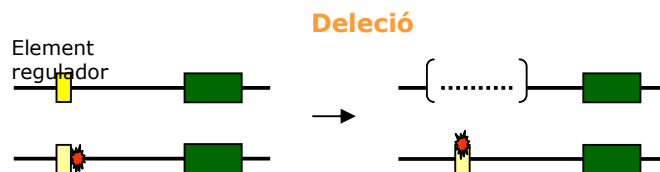
b) Gens que solapen amb variants estructurals

- Gen interromput per una inversió, translocació o deleció poden originant una reducció en l'expressió del gen.
- Un punt de trencament pot desencadenar en la formació d'un nou transcript resultant de la fusió de dos gens.



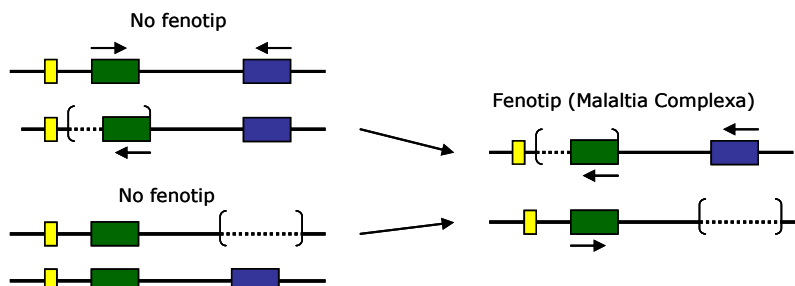
c) Gens que flanquegen variants estructurals. Efecte posicional

- Per exemple una deleció, inversió o translocació que inclogui un element regulador pot alterar l'expressió d'un gen que no es troba pròpiament dins la variant estructural.
- La deleció del promotor pot desemmascarar un polimorfisme funcional que pot tenir conseqüències en l'expressió.



d) Gens implicats en desordres complexos

Les variants estructurals poden funcionar com al·lels de susceptibilitat, quan es combinen diferents factors genètics que desencadena el fenotip.



1.1.3.2 CNVs i malalties humanes

Aproximadament la meitat dels gens que solapen amb CNVs es troben representats en la base de dades OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), que recull el coneixement actual sobre gens associats amb malalties Mendelianes, malalties genòmiques i malalties complexes (de Smith et al. 2008).

Les primeres evidències de què les alteracions en nombre de còpia podien influir en el fenotip, provenen de malalties esporàdiques originades per variants estructurals, majoritàriament *de novo*, les quals s'anomenen col·lectivament **malalties genòmiques**, en contraposició a les malalties genètiques clàssiques en què el fenotip anormal és atribuïble a mutacions puntuals (Lupski 1998; Lupski and Stankiewicz 2005; Lupski 2006). Actualment l'anàlisi mitjançant *arrays* permet avaluar la presència de guanys i pèrdues al llarg de tot el genoma amb una elevada resolució. L'ús d'aquesta tecnologia en l'anàlisi d'amples sèries de pacients amb retard mental, retard del desenvolupament, autisme, o anomalies congènites ha posat de relleu noves microdeleccions i microduplicacions que podrien estar implicades en l'etiologia d'un 7-16% dels casos amb aquests trastorns (de Vries et al. 2005; Friedman et al. 2006; Jacquemont et al. 2006; Szatmari et al. 2007; Marshall et al. 2008). Així, des del 2005 s'han descrit 18 noves malalties genòmiques que impliquen a 12 regions del genoma (Taula 1.3), nombre que representa més del doble de les descrites en els previs 20 anys. Aquesta mateixa capacitat de detectar alteracions, també ha conduït a identificar moltes variants rares en pacients amb un significat clínic incert. Per tal de determinar-ne la patogenicitat, és clau la identificació d'individus amb una mateixa CNV i un fenotip similar. En aquest sentit, la base de dades DECIPHER (**D**atabases of **C**hromosomal **I**mbalance and **P**henotype in **H**umans using **E**nsembl **R**esources; <https://decipher.sanger.ac.uk>) recull aquestes microdeleccions i microduplicacions del genoma humà identificades en pacients amb diverses patologies amb l'objectiu d'unificar les troballes i contribuir a determinar els efectes fenotípics d'aquestes CNVs. A mesura que es va dibuixant el mapa de CNVs en cohorts de pacients aparentment sans, també es van incorporant aquestes dades per a la discriminació de variants benignes i patològiques.

Taula 1.3: Noves malalties genòmiques i fenotips associats. Malalties genòmiques descrites en els darrers 4 anys (Mefford and Eichler 2009). Coordenades del Build 36.

Locus	Del o dup	Coordenades (Mb)	Tamany	Fenotip associat	Gens candidats
1q21.1	del	Chr1:144.10-144.69	500 Kb	Síndrome de TAR (<i>Thrombocytopenia absent radius</i>).	PIAS3, Lix1L
1q21.1	del dup	Chr1:145.0-146.35	1.35 Mb	<u>Del</u> : Fenotip variable: RM lleu-greu, microcefàlia, defecte cardíac congènit Esquizofrènia. <u>Dup</u> : macrocefàlia, retard mitjà o moderat, trets autistes.	GJA5, GJA8, HYDIN2
3q29	del dup	Chr3:197.4-198.9	1.5 Mb	<u>Del</u> : RM lleu o moderat, microcefàlia, trets dismòrfics lleus. <u>Dup</u> : RM mitjà o moderat.	PAK2, DLG3
10q22-q23	del	Chr10:81.12-89.07	7.95 Mb	Anomalies cognitives i de conducta de severitat diversa que inclouen dificultats d'aprenentatge, en la parla i el llenguatge i retard en el desenvolupament.	NRG3, GRID1, BMPR1, ASNCG, GLUD1
15q13.3	del dup	Chr15:28.7-30.2	1.5 Mb	<u>Del</u> : fenotip variable: RM moderat-greu, dismorfisme lleu, anomalies digitals, autisme, esquizofrènia, epilèpsia general idiopàtica. <u>Dup</u> : retard lleu-moderat.	CHRNA7
15q24	del	Chr15:72.2-73.8	1.8 Mb	RM lleu-moderat, línia de cabell anterior alta, fenestres palpebrals avall, íltrim llarg, anomalies digitals, anomalies genitals, pell laxa.	MAN2C1, CYP11A1, STRA6
16p13.11	del dup	Chr16:15.4-16.4	1 Mb	<u>Del</u> : RM, autisme, anomalies cerebrals. <u>Dup</u> : RM, autisme, penetrància decreixent.	NDE1, NTAN
16p11.2	del dup	Chr16:29.50-30.10	600 Kb	<u>Del</u> : autisme, trastorns psiquiàtrics i del llenguatge. <u>Dup</u> : autisme, trastorns psiquiàtrics i del llenguatge.	MAPK3, MAZ, DOC2A, SEZ6L2, HIRIP3
16p11.2-p12.2	del	Chr16:22.0-28.0	6 Mb	Retard sever del desenvolupament, hipotonia, cara plana, fissures palpebrals baixes, orelles posteriors rotades.	molts gens
17q12	del	Chr17:31.8-33.3	1.5 Mb	Anomalies renals, de severes a lleus.	HNF1B
17q21.31	del	Chr17:41.0-41.7	700 Kb	Retard del desenvolupament moderat-sever, hipotonia, cara allargada, nas tubular o de pera, punta nasal bulbosa, conducta amigable	MAPT
22q11.2 (distal)	del dup	Chr22:19.8-22.0	2.2 Mb	<u>Del</u> : naixement prematur, retard de creixement, problemes d'aprenentatge i/o retard desenvolupament, anomalies esquelètiques. <u>Dup</u> : RM lleu-moderat, trets dismòrfics	MAPK1

Apart d'aquests noves malalties genòmiques, l'anàlisi de CNVs a nivell de tot el genoma està posant al descobert tant CNVs rars com CNVs comuns (freqüència > 1%) implicades en diverses malalties complexes. En aquest context les CNVs rars poden ser considerades com a mutacions que afecten al nombre de còpies amb una freqüència al·lèlica <1%. S'han descrit duplicacions i triplicacions del gen *SNCA* (α -sinucleïna) en pacients amb Parkinson hereditari (Singleton et al. 2003; Chartier-Harlin et al. 2004), o casos d'Alzheimer familiar d'aparició tempra, causats per la duplicació del gen *APP* (precursor amiloide de la proteïna A4 beta) (Cabrejo et al. 2006; Rovelet-Lecrux et al. 2006; Sleegers et al. 2006). Malgrat que aquest tipus de CNVs rars permeten explicar l'origen genètic d'un baix percentatge

dels casos amb aquests trastorns, poden contribuir a definir noves vies patofisiològiques en les malalties complexes.

D'altra banda, diverses CNVs comunes han estat associades amb malalties complexes. Malgrat que alguns estudis no han pogut ser replicats i la seva validesa està actualment en entredit, el primer exemple va ser el descobriment d'una associació entre el nombre de còpies del gen *CCL3L1* i la susceptibilitat a la infecció amb el virus de la immunodeficiència humana-1 (HIV-1) i al desenvolupament de la síndrome d'immunodeficiència humana (SIDA) (Gonzalez et al. 2005). Es va observar que els individus que, en relació a la seva ètnia, presenten un baix nombre de còpies del gen de la quimioquina tenen una major susceptibilitat a desenvolupar la SIDA. En les mostres genotipades del projecte HapMap s'ha observat que aquesta regió mostra una elevada variabilitat, tant en nombre de còpies del gen *CCL3L1* com en l'estructura genòmica entre individus de diferents poblacions (Redon et al. 2006). Recentment s'ha descrit també una associació entre les diferències en el nombre de còpies del gen *CCL3L1* i susceptibilitat a l'artritis reumatoide (McKinney et al. 2008). Un altre exemple seria l'estudi en què es demostra que una reducció en el nombre de còpies del gen *FCGR3B* incrementa el risc de patir glomerulonefritis d'origen autoimmune (Aitman et al. 2006). Aquest gen, que té un paper en la regulació de la resposta inflamatòria i immune, també ha estat associat amb el lupus eritematòs disseminat i a d'altres malalties autoimmunes sistèmiques, com la vasculitis ANCA-positiu (Fanciulli et al. 2007).

1.2. Regió cromosòmica 22q11.2

1.2.1 Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial (SDG/VCF)

Les síndromes de DiGeorge (SDG) i Velocardiofacial (SVCF) estan causades per la mateixa microdeleció intersticial en heterozigosi a la banda cromosòmica 22q11.2. Es tracta d'una síndrome que ha rebut diferents noms, reflectint l'àmplia variabilitat fenotípica associada.

1.2.1.1 Antecedents i nomenclatura clínica

La **síndrome de DiGeorge** (OMIM 188400) va ser descrita el 1965 pel Dr. Angelo DiGeorge, que va identificar un grup de pacients d'edat pediàtrica amb uns trets fenotípics compartits: absència de timus i carència de glàndules paratiroides, que provoca baixos nivells de calci en sang. Posteriorment va descriure un elevat percentatge d'anomalies cardíques congènites en aquests infants (DiGeorge i Harley 1965). Per la seva banda, la **síndrome Velocardiofacial** (OMIM 192430) va ser descrita el 1978 pel Dr. Robert Shprintzen, com un trastorn familiar que combina tres trets fenotípics: "velo" que fa referència a les anomalies del paladar, "cardio" associat a defectes cardíacs conotruncals i "facial" que engloba els trets facials característics que presenten els pacients amb aquesta síndrome. El 1992 es va identificar que la causa genètica d'aquestes dues síndromes era la mateixa, una microdeleció a la regió cromosòmica 22q11.2 (Scambler et al., 1992).

La **síndrome de Cayler**, també coneguda com a "asymmetric crying facies", (OMIM 125520) és una malaltia molt poc freqüent caracteritzada per defectes cardíacs congènits i un desenvolupament anòmal de la musculatura del llavi superior, que es manifesta en l'etapa neonatal quan l'infant plora o somriu. Altres anomalies associades inclouen defectes en l'esquelet, el tracte genitourinari, característiques facials (hipertelorisme, epicantus, pont nasal pla, fissures palpebrals estretes) o un retard mental i motor, entre d'altres. El 1993, Burn i col·laboradors van identificar la microdeleció 22q11.2 en pacients amb aquesta síndrome (Wilson et al. 1993). La confirmació d'aquesta associació en treballs posteriors va portar a altres autors a proposar que aquesta síndrome és una manifestació més de l'ample espectre fenotípic de la microdeleció 22q11.2 (Giannotti et al. 1994).

A més d'aquestes síndromes, existeixen també pacients amb la síndrome de **CHARGE** (Coloboma, Heart, Atresia, Radiation of growth, Genitourinary problems and Ear abnormalities) i amb la **síndrome Optiz-GBBB** (hipertelorisme, fístula traqueo-esofàgica, fenadura labial i/o palatina, dificultats per empassar, un plor ronc, defectes genitourinaris, retard mental i defectes cardíacs congènits) que també presenten la microdeleció a 22q11.2 (McDonald-McGinn et al. 1995; Fryburg et al. 1996; Lacassie and Arriaza 1996). Aquestes síndromes sovint també s'inclouen com anomalies associades a aquesta microdeleció, engrandint encara més la llista de presentacions clíniques associades a la mateixa anomalia genètica.

Actualment, doncs, no existeix un consens en la nomenclatura de la síndrome associada a la microdeleció 22q11.2, però sembla existir la tendència a reservar el terme Síndrome DiGeorge als casos de diagnòstic neonatal amb presentació de hipoplàsia de timus i hipoparatiroidisme associat a una hipocalcèmia, mentre que el diagnòstic de Síndrome Velocardiofacial, s'empra per a la resta de pacients, sense afectació de timus, sovint diagnosticats al llarg de la infància o en l'adolescència quan els trets fenotípics de la síndrome resulten més evidents. A més d'aquests diagnòstics a nivell clínic, la literatura actual es refereix sovint a aquest grup de malalties com a **síndrome de la deleció 22q11** i el debat sobre quina nomenclatura és la més idònia continua viu. En una revisió publicada l'any passat, RJ Shprintzen (2008) discuteix extensament sobre la confusió clínica que pot generar aquesta nomenclatura múltiple, on defensa i encoratja a utilitzar un sol terme, el de síndrome Velocardiofacial basant-se en la seva facilitat, claredat i simplicitat (Shprintzen 2008). En aquesta tesi s'utilitza el terme síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial, abreujat com a SDG/VCF, ja que engloba les dues nomenclatures originals de la síndrome, que són les més utilitzades en el diagnòstic mèdic d'aquesta malaltia genòmica.

1.2.1.2 Característiques clíniques

Els antecedents referents a la nomenclatura de les síndromes associades a la microdeleció 22q11.2 ja reflecteixen la complexitat clínica i l'enorme variabilitat fenotípica d'aquests pacients. Actualment la llista de característiques clíniques associades a la SDG/VCF inclou més de 180 trets fenotípics, recollits en una revisió de Robin i Shprintzen (Robin and Shprintzen 2005). Malgrat cap de les

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

característiques clíniques és present en el 100% dels casos i no existeix cap pacient que presenti tots els trets fenotípics associats a la síndrome, existeixen certes característiques que es consideren com els principals indicadors de sospita clínica de SDG/VCF (Taula 1.4) (Ryan et al. 1997; Hay 2007; Sullivan 2007; Shprintzen 2008).

Taula 1.4: Freqüències de les principals característiques clíniques associades a la SDG/VCF

Característica clínica	Freqüència
Defecte cardiovascular congènit	49-83%
Tetralogia de Fallot	17-22%
Interrupció de l'arc aòrtic	14-15%
Comunicació interventricular (CIV)	13-14%
Truncus arteriós	7-9%
Hipocalcèmia neonatal	17-64%
Deficiències immunològiques	50-77%
Anomalies del paladar	69-99%
Paladar fes/leporí	9-11%
Fenedura submucosa	5-16%
Insuficiència velofaríngia	27-92%
Anomalies renals	31-37%
Absent o displàsic	17%
Obstrucció	10%
Reflux	4%
Anomalies esquelètiques	15-20%
Dificultats d'aprenentatge	70-90%
Retard en el llenguatge	79-84%
Retard en el desenvolupament	45-75%
Problemes de conducta i psiquiàtrics	9-50%
Dèficit d'atenció i hiperactivitat	25%
Esquizofrènia	6-30%

- **Defecte cardiovascular congènit**

Les anomalies cardíques afecten a un 49-83% dels pacients amb microdeleció 22q11.2, la majoria són defectes conotruncals, tot i que sovint també s'observen anomalies en els vasos de sortida del cor. A més de les recollides a la Taula 1.4, s'inclouen altres anomalies com una artèria subclàvia aberrant o un arc aòrtic dret i anomalies cardíques més greus com una estenosi de la vàlvula pulmonar, defectes septals auriculars, un canal atrioventricular, la transposició de grans vasos, un doble arc aòrtic, absència de vàlvula pulmonar, i/o una coartació d'aorta, doble sortida del ventricle dret i la persistència del ductus arteriós, entre d'altres.

Estudis en sèries de pacients amb defectes cardíacs congènits descriuen que la microdeleció 22q11.2 es troba en un 10% dels individus amb defectes del septe ventricular (McElhinney et al. 2003), en un 15% dels casos amb Tetralogia de Fallot

(Botto et al. 2003) i en un 35% dels pacients amb defectes conotruncals en general (Rauch et al. 2004). Davant d'aquests percentatges, alguns autors suggereixen l'anàlisi de la microdeleció en tots els pacients nomenats amb aquests tipus de cardiopaties (Shprintzen 2008), mentre que altres autors són partidaris d'analitzar només aquells casos que presentin altres característiques clíniques extracardíaques com per exemple: dismorfisme facial amb dificultats d'aprenentatge (microdeleció en el 82,4%) o anomalies en la veu, com una hipernasalitat (microdeleció en el 81,6%) (Fung et al. 2008).

- **Hipocalcèmia neonatal**

La hipocalcèmia és el resultat d'una disfunció en les glàndules paratiroides, i és un bon predictor de la microdeleció 22q11.2 en l'etapa neonatal (Bassett et al. 2005). Amb el temps, la majoria de pacients normalitzen els nivells de calci, per això resulta difícil determinar la freqüència d'aquesta anomalia.

- **Deficiències immunològiques**

En un percentatge elevat d'individus amb la microdeleció 22q11.2 apareixen desordres relacionats amb el sistema immunitari. Resulten freqüents les infeccions que afecten a les vies respiratòries superiors, otitis i sinusitis i, en casos més severs, s'ha descrit pneumònia i bronquitis que persisteixen al llarg de la infància. Una altra conseqüència de les deficiències immunològiques d'aquests pacients són les malalties autoimmunes, observades en un 9% dels pacients amb la SDG/VCF (Jawad et al. 2001). S'inclouen, l'hipertiroïdisme, la trombocitopènia immune (200 vegades més freqüent que en la població general), l'anèmia hemolítica autoimmune, la monoartritis (o artritis autoimmune juvenil - 20 vegades més alta que en la població general), el vitiligen la neutropènia autoimmunitària, l'anèmia aplàstica i el desordre celíac (Davies et al. 2001; Oskarsdottir et al. 2005).

- **Anomalies del paladar**

Una altra característica molt típica dels pacients amb la microdeleció 22q11.2 són les anomalies congènites del paladar. Tot i que inicialment es va descriure el paladar fes (Shprintzen et al. 1978), actualment s'ha vist que les formes més comunes són la fenedura submucosa, que consisteix en una manca de soldadura de

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

les crestes palatines en la part posterior del paladar i la insuficiència velofaríngia, (IVF) que es manifesta en la incapacitat del vel del paladar per cloure l'obertura nasofaríngia. Aquestes anomalies sovint poden passar inadvertides ja que requereixen de l'observació amb un nasofaringoscopi i d'un especialista en el diagnòstic d'anomalies al paladar, per això la seva freqüència està poc definida (McDonald-McGinn et al. 1997; Ryan et al. 1997; Botto et al. 2003; Oskarsdottir et al. 2005). Tot i així, aquestes anomalies del paladar sovint van associades a altres característiques més evidents d'identificar; com ara els problemes d'alimentació, dificultats de succió i freqüent regurgitació nasal present en un 74% dels pacients durant la infància (Oskarsdottir et al. 2005). Els individus de més edat mostren una hipernasalitat al parlar, ja que l'aire s'escapa pel nas durant la producció de sons orals, això ocasiona dificultats en la pronunciació dels sons nasals, i una veu com de refredat molt característica entre els pacients amb la SDG/VCF.

- **Característiques facials**

Els pacients amb la SDG/VCF no mostren una aparença facial anòmala com es pot donar en moltes altres síndromes i per això es parla d'unes característiques o trets facials "típics", que els fan semblants entre ells. La valoració d'aquestes característiques facials resulta variable en funció de l'edat i del grup humà al qual pertanyen els pacients, i reconèixer-les depèn també de l'ull clínic de l'especialista que les avalua i no sempre apareixen recollides en les sèries de pacients publicades (aquest fet fa difícil establir-ne la freqüència i per aquest motiu no es mostren en la Taula 1.4). Tot seguit es fa una descripció dels trets facials, d'acord amb l'edat dels pacients (Bassett et al. 2005; Robin and Shprintzen 2005; Pagon 2006; Hay 2007). i en la Figura 1.9 es mostren algunes fotos de pacients amb la microdeleció 22q11.2

- En nadons: micrognàtia, orelles d'implantació baixa, telecantus amb fenedures palpebrals estretes, els ulls amb una inclinació característica que pot ser tant cap amunt com cap avall i la boca relativament petita amb els llavis primers.

- En la resta de pacients persisteixen algunes de les característiques anteriors però a més s'han n'han descrit d'altres com la cara allargada, hipertelorisme (la parpella superior adquireix una forma que recorda una caputxa),

una configuració nasal distintiva (rectangular i amb una punta bulbosa i una línia divisòria), anomalies a les orelles, boca petita i retrognàtia.



Figura 1.9: Característiques facials de pacients amb la SDG/VCF. Fotografies de pacients amb la microdeleció 22q11.2 que il·lustren algunes de les característiques facials típiques: orelles prominents, ulls petits, parpella superior en forma de caputxa i nas rectangular amb punta bulbosa.

- **Manifestacions neurològiques**

Els **problemes d'aprenentatge i desenvolupament** varien també en funció de l'edat. Les dificultats motores i la hipotonia són comuns en nadons, mentre que posteriorment apareixen problemes d'aprenentatge i retard en el llenguatge. La majoria dels pacients manifesten importants limitacions en les habilitats comunicatives relacionades amb la parla, l'adquisició de vocabulari i l'aprenentatge de diferents sons vocals (Solot et al. 2000; Persson et al. 2006). Les dificultats d'aprenentatge consisteixen en problemes d'abstracció, comprensió lectura, habilitats aritmètiques i executives (Moss et al. 1999). Sovint presenten un coeficient intel·lectual baix (CI entre 50 i 80), i una major puntuació en les funcions verbals que en les de procediment. S'ha postulat que aquests problemes cognitius sorgeixen de problemes visuo-espacials (Hay 2007). Els pacients adults tenen un CI entre 45 i 95 però la majoria mostren una història de dificultats d'aprenentatge en edat escolar i manifesten dèficits en habilitats visuo-perceptives, problemes de resolució i planificació, i en els pensaments abstractes i socials (Bassett et al. 2005).

Els **problemes de conducta** també són freqüents en individus amb la SDG/VCF. El trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat (TDAH) s'ha descrit en un 35-55% dels casos (Gothelf et al. 2004), aproximadament un 11% dels infants presenten trets autistes i un retard del desenvolupament més sever (Fine et al. 2005). Apareixen sovint desordres afectius com el trastorn bipolar i la depressió (Arnold et al. 2001). En pacients adolescents i adults la freqüència de **trastorns psiquiàtrics** és 25 vegades superior a la de la població general (Karayiorgou et al. 1995; Usiskin et al. 1999). El més comú és l'esquizofrènia, present en un 30-58% dels individus (Bassett et al. 2005; Gothelf et al. 2007), però també s'han descrit altres trastorns com desordres emocionals i d'ansietat (Karayiorgou et al. 1995; Karayiorgou et al. 1996; Cohen et al. 1999).

1.2.1.3 Prevalença i diagnòstic

- **Prevalença**

La incidència global estimada de la microdeleció 22q11.2 se situa al voltant de 1:4000-6000 naixements, essent la microdeleció intersticial més freqüent en humans, i el segon desordre cromosòmic més comú després de la síndrome de Down. En un estudi poblacional realitzat a Atlanta es van identificar 43 nens amb microdeleció 22q11.2 en una sèrie de 255.849 naixements, establint una prevalença global de 1 en 6000, però observant que aquesta era de 1 en 6500 en la població blanca, negra i asiàtica i 1 en 3800 entre els hispans (Botto et al. 2003). Existeixen altres estimacions, realitzades amb la població de Nova York, que estableix una freqüència molt més elevada de 1:2000 naixements (Shprintzen et al. 2005; Shprintzen 2008).

- **Diagnòstic**

Quan un pacient manifesta diverses de les característiques clíniques descrites anteriorment (Taula 1.4) sorgeix la sospita de la SDG/VCF. Existeixen, però, dos fets que dificulten el diagnòstic clínic: el primer és la considerable variabilitat fenotípica en l'expressió de la síndrome, i el segon que la majoria de les característiques clíniques (com la cardiopatia, anomalies al paladar, retard mental, problemes immunes i el retard del desenvolupament) són comunes en moltes altres

síndromes. Per aquests motius el reconeixement de la SDG/VCF depèn considerablement de l'habilitat i experiència del clínic per reconèixer les diverses entitats, mentre que el diagnòstic final del pacient depèn en gran mesura dels resultats de les anàlisis genètiques. Davant de la sospita clínica de SDG/VCF, la primera determinació és la de la microdeleció; en cas de no ser present, s'acostumen a seguir explorant altres possibles orígens.

La primera sospita de l'associació entra aquesta malaltia genòmica i la regió 22q11.2 es va establir a partir de l'observació de diverses translocacions que afectaven a la banda 22q11.2 (de la Chapelle et al. 1981; Kelley et al. 1982; Greenberg et al. 1984; Augusseau et al. 1986). Uns anys més tard, amb el perfeccionament de les tècniques de citogenètica, es van obtenir cromosomes més llargs i bandes d'alta resolució (més de 800 bandes per haplotip), fent possible, en situacions molt òptimes, l'observació de les 3Mb implicades en aquesta microdeleció (Wilson et al. 1992). El pas més important es va produir amb el desenvolupament de la tècnica de la FISH i el disseny de sondes específiques per a la regió 22q11.2, gràcies a la qual es pot avaluar amb tota certesa la presència de la microdeleció 22q11.2 sobre els cromosomes en metafase o nuclis interfàsics.

Diversos grups han avaluat la utilització d'altres tècniques, com el MLPA, la PCR quantitativa o el *array*-CGH (Mantripragada et al. 2004; Tokuyasu et al. 2007; Brunet et al. 2008; Jalali et al. 2008; Yang et al. 2009), com a eines eficients en la identificació d'alteracions cromosòmiques com la microdeleció 22q11.2. Entre els avantatges d'aquestes tècniques trobem la capacitat d'identificar diferències en el tamany de les microdeleccions, així com microdeleccions atípiques que no es detectarien amb la sonda comercial de FISH (Vorstman et al. 2006; Sivertsen et al. 2007). La tècnica de la MLPA ofereix una interessant opció per la seva relació cost-efectivitat. Actualment l'empresa propietària de la tecnologia, MRC-Holland, té al mercat tres kits per a l'anàlisi la regió 22q11.2 (P023-B, P324 i P250), dissenyats per poder identificar tots els tipus de variants de nombre de còpia conegudes; així, per exemple el kit P324 inclou 12 sondes localitzades en el gen *TBX1* que permeten identificar petites delecions d'aquest gen, i el P250 incorpora sondes que flanquegen els LCRs dels extrems de la deleció més comú de 3Mb per permetre la detecció de petites diferències en els punts de trencament de la microdeleció 22q11.2 (Jalali et al., 2008). Malgrat que la tècnica de MLPA va guanyant adeptes,

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

en la pràctica rutinària, la tècnica més utilitzada per al diagnòstic de la microdeleció 22q11.2 és la FISH, probablement perquè és la més accessible als laboratoris de citogenètica.

1.2.2 Síndrome de la microduplicació 22q11.2

El 1999 es va descriure el primer cas amb una microduplicació a la regió 22q11.2, recíproca del fragment delecionat en la SDG/VCF, en un nen de 4 anys amb un modest retard en el desenvolupament, insuficiència velofaríngea i retard en el llenguatge (Edelmann et al. 1999). Quatre anys més tard, l'anàlisi mitjançant FISH de 653 casos amb clínica de SDG/VCF, permetia identificar 13 casos més, 10 no emparentats (1,5%), establint-se d'aquesta manera una nova malaltia genòmica: la síndrome de la microduplicació 22q11.2 (Ensenauer et al. 2003). Des d'aleshores s'han descrit a la literatura 92 casos amb aquesta microduplicació, dels quals 45 corresponen a individus emparentats, reflectint una elevada freqüència de microduplicacions familiars.

Les característiques clíniques associades a aquest reordenament també són molt variables: des de casos sense cap característica clínica evident, fins a pacients amb múltiples anomalies severes. Les característiques més freqüents (vegeu Taula 1.5) són: trets facials lleugerament dismòrfics (parpelles altes, ulls separats amb fenestres palpebrals cap avall i celles d'implantació alta), dèficit cognitiu (que inclou des de lleus problemes d'aprenentatge i/o llenguatge fins al retard mental moderat), insuficiència velofaríngea amb o sense paladar fes, retard en el creixement, pèrdua d'oïda, anomalies urogenitals, defectes cardíacs i problemes psiquiàtrics (que inclouen trastorns de la conducta, com ara el dèficit d'atenció i la hiperactivitat, comportament agressiu i/o desordre autista). Altres característiques observades amb menys freqüència inclouen la hipotonia, aplàsia de timus, escoliosi, anomalies esquelètiques als dits del peu o infeccions freqüents com otitis, (Ensenauer et al. 2003; Hased et al. 2004; Portnoi et al. 2005; Yobb et al. 2005; Ou et al. 2008; Portnoi 2009).

Taula 1.5: Principals característiques clíniques associades a la microduplicació 22q11.2

Característica clínica	Freqüència
Trets facials dismòrfics	63/79 (79,7%)
Defecte cardíac congènit	12/80 (15%)
Tetralogia de Fallot	4/12
Anomalies de l'arc aòrtic	3/12
Hipoplàsia ventricle esquerre	3/12
Cardiopatia complexa	1/12
Anomalies del paladar	8/47 (17%)
Fenedura palatina	31/77 (40,2%)
Insuficiència velofaríngea	15/75 (20%)
Pèrdua d'oïda	15/77 (19,4%)
Anomalies urogenitals	21/79 (26,5%)
Retard en el creixement	59/76 (77,6%)
Dèficits cognitius	10/73 (13,6%)
Problemes psiquiàtrics	

Malgrat que el coneixement que tenim d'aquesta nova síndrome és molt recent, les dades apunten que la microduplicació 22q11.2 és molt menys freqüent que la microdeleció recíproca, aproximadament la meitat (Ou et al. 2008; Turner et al. 2008). Una possible explicació per aquest fet podria ser una penetrància molt reduïda que es traduiria en l'existència d'un important nombre de portadors que no requerissin d'atenció mèdica i que, per tant, no serien diagnosticats. Una altra explicació que s'ha donat a aquesta baixa freqüència fa referència a limitacions de la metodologia emprada en el seu diagnòstic: la majoria dels casos recollits en la literatura han estat estudiats mitjançant FISH; en l'anàlisi de FISH en metafases, donada la proximitat dels dos senyals, aquests poden sobreposar-se i passar inadvertides, confonent-se amb un senyal únic.

1.2.3 Duplicacions segmentàries a la regió 22q11.2

La regió 22q11.2 presenta una elevada incidència de reorganitzacions cromosòmiques. Entre les més freqüents, destaquen les detectades en neoplàsies com poden ser la t(9;22) (cromosoma Philadelphia) associada a la leucèmia limfocítica aguda i a la mieloide crònica, la t(8;22) en el limfoma de Burkitt, i la t(11;22) en el sarcoma d'Ewing, fins a anomalies constitucionals com les duplicacions de la regió proximal 22q observades en la síndrome del Cat Eye, les translocacions t(11;22) que originen síndromes causades per cromosomes extres

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

derivats d'una segregació cromosòmica $der(22)t(11;22)$ i les síndromes associades a la microdeleció intersticial 22q11.2 (SDG/VCF) o a la seva microduplicació recíproca.

Al cromosoma 22 s'hi localitzen diversos blocs de duplicacions segmentàries anomenats, de manera genèrica, LCR22. En concret, a la banda q11.2, s'han identificat fins a vuit blocs d'aquest grup de duplicons, que ocupen l'11% de la regió i s'anomenen, de centròmer a telòmer, i de manera consecutiva LCR22-A fins a LCR22-H (Figura 1.10). L'estudi de regions sintèniques en altres espècies revela que el genoma de ratolí no conté aquests blocs de duplicons (Bailey et al. 2004), però sí que són presents en la resta d'espècies de primats (Shaikh et al. 2000). S'ha suggerit que el complex mosaic de gens i pseudogens que configuren aquests LCR22s es podrien haver originat per la duplicació de gens i per fenòmens de recombinació entre seqüències *Alu* flanquejants durant l'evolució dels primats (Babcock et al. 2003).

La majoria dels pacients amb la microdeleció 22q11.2 (97-98%) presenta el punt de trencament més centromèric en el LCR22-A, mentre que la localització de l'altre "breakpoint" és més variable: en un 86% dels casos es troba en el LCR22-D (produint una deleció d'unes 3Mb), i en un 7% dels casos es localitza al LCR22-B (generant una deleció d'aproximadament 1.5Mb). S'han descrit pacients amb la SDG/VCF i reordenaments atípics en què els punts de trencament afecten altres LCR22s, i també, però en casos molt rars, es localitzen fora dels LCR22s (Nogueira et al. 2008). Pel que fa a les microduplicacions descrites a la regió 22q11.2, la majoria afecten la regió de 3Mb compresa entre els LCR22-A i D, però també se n'han identificat entre els LCR22-A i B (1.5Mb), així com segments més grans entre els LCR22-A i E (~4Mb) o els LCR22-A i G (~6Mb) (Ensenauer et al. 2003; Portnoi et al. 2005; Alberti et al. 2007; Ou et al. 2008; Yu et al. 2008).

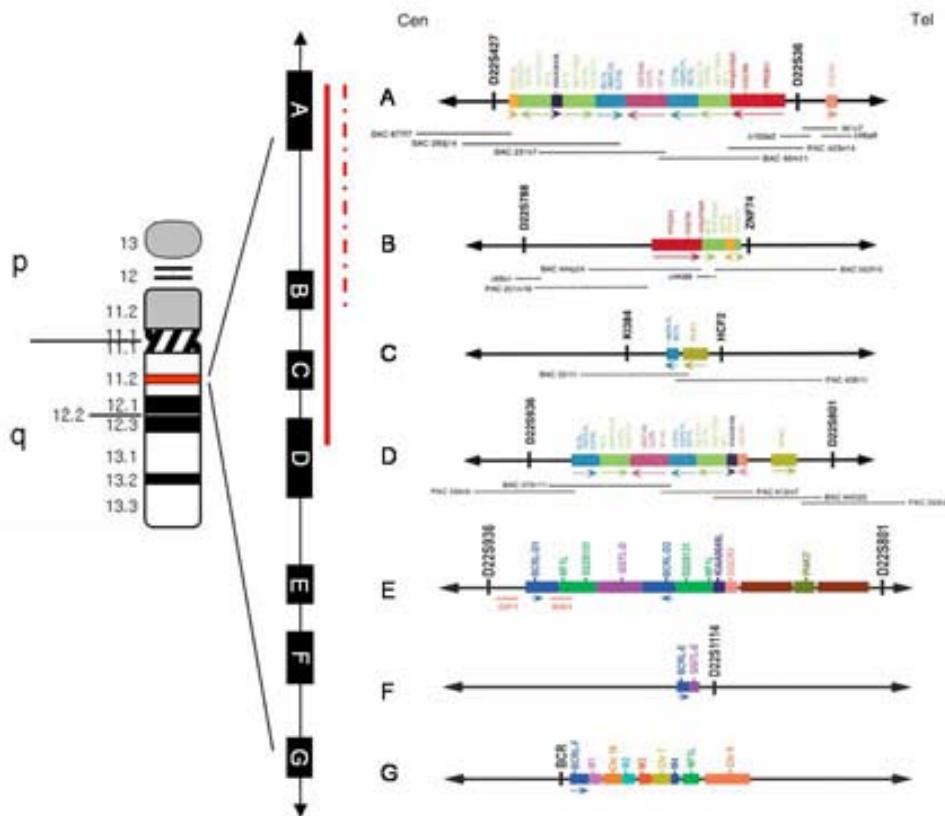


Figura 1.10: LCR22s de la regió 22q11.2. Organització dels LCR22 (A-H) situats de centròmer a telòmer. Representació dels blocs duplicats de cada LCR22 en rectangles de colors, els mòduls homòlegs es representen en un mateix color. Destacar el bloc BCRL que està representat en blau en tots els LCR22s, excepte en el LCR22-B. La línia vermella contínua indica les ~3Mb més freqüentment delecionades i duplicades en aquesta regió; i la línia vermella discontinua senyala el segment de 1,5Mb afectat en un percentatge molt menor de casos [Estructura i organització dels LCR22s: (Shaikh et al. 2000; Shaikh et al. 2007)]

Els LCR22-A i D són els més llargs i cadascun consta de 240Kb de seqüència genòmica amb una elevada identitat (>98%). Aquests dos LCR22s es troben orientats en la mateixa direcció i la recombinació meiótica intercromosòmica entre ells és l'origen més tant de la microdeleció com de la microduplicació recíproca de 3Mb. S'ha descrit que la recombinació homòloga no al·lèlica, que dona lloc a les microdelecions i microduplicacions a la regió, és d'origen intracromosòmic en un 87% i intercromosòmic en el 13% restant (Edelmann et al. 1999; Shaikh et al. 2001; Shaikh et al. 2007; Torres-Juan et al. 2007).

El LCR22-B, implicat en les delecions i duplicacions d'1.5Mb, és una de les regions del genoma més propenses a generar reordenaments cromosòmics. Els punts de trencament de diverses translocacions constitucionals recurrents t(11;22)

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

i t(17;22) es localitzen en aquest LCR22 (en concret els trencaments es produeixen dins de diferents gaps encara existents en la seqüència del genoma humà (hg19)), suggerint que aquest LCR conté algun tipus de seqüència recalitrant al clonatge. Recentment s'ha pogut clonar una part d'aquest gap i es tracta de 595pb de repeticions palindròmiques riques en AT (Kurahashi et al. 2007). Aquestes estructures semblen estar implicades en les translocacions descrites en aquesta regió (Kurahashi et al. 2003; Gotter et al. 2004), però la seva implicació en la generació de les delecions i duplicacions està per determinar.

Els quatre LCRs més distals, LCR22-E fins al LCR22-H, son més petits i presenten menys mòduls duplicats així com un menor grau d'identitat de seqüència. Tot i que aquests LCR22s rarament han estat associats a reorganitzacions d'aquesta regió, s'han descrit quatre casos amb una microdeleció de 1.4Mb implicant els LCR22-D i LCR22-E, i dos pacients amb una microdeleció de 2.1 Mb compresa entre el LCR22-D i el LCR22-F. Aquests sis pacients amb microdelecions *de novo* atípiques presentaven també característiques clíniques relacionades amb la SDG/VCF. També s'han descrit quatre pacients amb trets suggestius de SDG/VCF i amb tumor rabdoide amb deleció entre el LCR22-D i LCR22-G. (Ravnan et al. 1996; Amati et al. 1999; Rauch et al. 1999; Saitta et al. 1999; Ben-Shachar et al. 2008; Emanuel 2008; Jalali et al. 2008).

La complexitat i el tamany dels LCR22s implicats en les delecions i duplicacions recurrents dificulta la localització precisa dels punts de trencament d'aquests reordenaments (Sharp et al. 2005; Conrad et al. 2006; Wong et al. 2007). Tot i així, mitjançant tècniques com la qPCR o el MLPA, s'ha descrit que la deleció de 3Mb compresa entre el LCR22-A i LCR22-D no és idèntica en tots els pacients. El punt de trencament de l'extrem LCR22-A es localitza en la majoria dels pacients entre el gen *USP18* (no delecionat) i el gen *PRODH* (delecionat), però existeixen alguns casos amb el gen *PRODH* no delecionat i per tant el punt de trencament desplaçat cap el següent gen *DGCR2* (delecionat). A l'altre extrem, dins del LCR22-D, també s'observa que majoritàriament el punt de trencament se situa entre *D22S936* (delecionat) i *HIC2* (no delecionat), definint un interval de 3,1Mb, però un 6,5% de casos presenten també deleció de *HIC2* (Weksberg et al. 2007; Jalali et al. 2008). Aquestes variants en els punts de trencament poden ser d'utilitat

per explicar els mecanismes de reordenament que afecten a aquests pacients així com per intentar trobar explicacions en la variabilitat fenotípica.

Recentment, un estudi realitzat en dos pacients amb delecions atípiques que compartien el punt de trencament sobre el LCR22-E ha permès identificar un trencament a 8Kb del mòdul duplicat que conté el pseudogen BCR-like (BCRL), suggerint que aquest bloc estaria implicat en la predisposició als reordenaments. De fet les seqüències que conformen els blocs BCRL de dins els LCR22s ja havien estat considerades prèviament com a punts calents dels reordenaments entre els LCR22-A i D (Pavlicek et al. 2005). Aquests blocs BCRL es localitzen en tots els LCR22 (vegeu Figura 1.10) a excepció del LCR22-B (del que no es disposa de la seqüència completa), i s'ha postulat que la seva orientació podria predir quins d'aquests LCR22s poden estar implicats en els mecanismes de recombinació homòloga no al·lèlica que originen les microdelecions i microduplicacions (Shaffer and Lupski 2000).

1.2.4 Models animals i gens candidats

La majoria de les estructures i teixits principalment afectats en els pacients amb la microdeleció 22q11.2 (timus, glàndula paratiroide, artèries de l'arc branquial i cara) deriven de les mateixes estructures embrionàries (arcs faringis). Les cèl·lules de la cresta neural migren des de la seva posició adjacent al tub neural i participen en la formació dels dos arcs faringis i estructures derivades (Figura 1.11). Experiments amb models animals als que se suprimeix la cresta premigratòria o es pertorben les funcions de la cresta neural, generen una bona fenocòpia de la síndrome de DiGeorge (Kirby et al. 1983; Kirby and Bockman 1984; Lindsay and Baldini 2001; Merscher et al. 2001). També les mutacions en gens implicats en el desenvolupament de la cresta neural en ratolins, com *Pax3* i *endothelin-1*, causen malformacions molt similars a les que s'observen en els pacients amb la microdeleció 22q11.2.

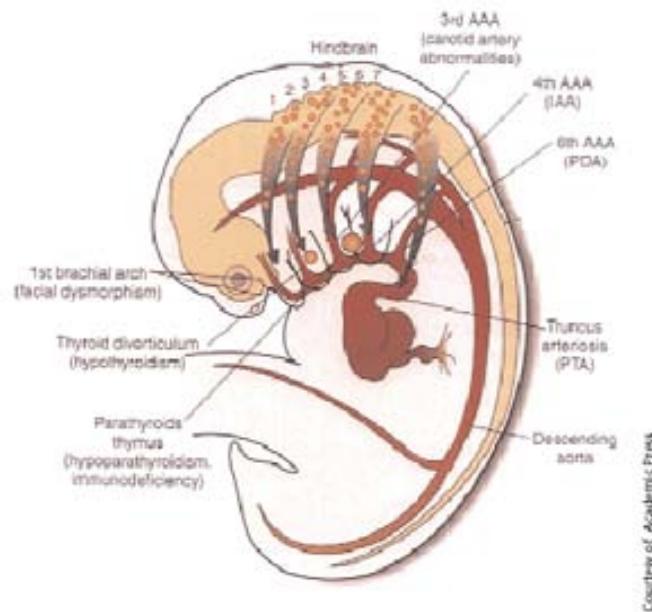


Figura 1.11: Contribució de les cèl·lules de la cresta neural a les estructures afectades en la SDG/VCF. Aquesta figura representa un embrió humà a les 4-6 setmanes de gestació. Les fletxes grises indiquen la migració de les cèl·lules de la cresta neural cap al sistema d'arcs branquials i les malformacions dels vasos de sortida associades amb la disrupció d'aquest procés.

Igual que en el cas dels humans, la seqüenciació del genoma de ratolí ha facilitat enormement els estudis experimentals amb aquest model animal (Dunham et al. 1999; Lund et al. 1999). La regió 22q11.2 del genoma humà (HSA22) i la regió sintènica del ratolí, situada en el cromosoma 16 (MMU16), són molt similars en el seu contingut de gens, tot i que hi ha algunes diferències en l'organització genòmica. Per a l'estudi de gens candidats s'han generat delecions i duplicacions en la regió sintènica del cromosoma 16 (MMU16) de ratolí. Lindsay et al. (1999) van generar el primer model de ratolí amb una microdeleció d'1.2Mb en homozigosi (anomenat Df1) que afecta 20 gens ortòlegs (des d'Es2 fins a Ufd1l) continguts en la microdeleció humana d'1.5Mb. El model Lgdel, a diferència de Df1, té delecionats alguns gens més de la regió, com el *HIRA* (vegeu Figura 1.12). Un 10% d'aquests ratolins (Df1 i Lgdel) moren en el període perinatal, mentre que la resta resulten viables i fèrtils. Els defectes en l'arc aòrtic apareixen en un 30% dels casos, causats per un desenvolupament anòmal de les artèries derivades dels quarts arcs faringis. Aquests defectes en l'arc aòrtic s'ha vist que es poden corregir si el ratolí amb la microdeleció és també portador de la duplicació recíproca en l'altre al·lel del cromosoma 16. L'estudi de ratolins amb delecions en heterozigosi de menor tamany (Df2, Df3 i Df4) ha mostrat que les anomalies de l'arc aòrtic eren presents

en tots excepte en el Df2, permetent així delimitar la regió crítica per als defectes cardiovasculars entre els gens Hira i Comt, en un segment que abraça fins a 12 gens (Kimber et al. 1999; Puech et al. 2000).

Les anomalies neuroconductuals, que poden estar relacionades amb les dificultats d'aprenentatge i les malalties psiquiàtriques dels pacients amb la microdeleció 22q11.2, també s'han estudiat en aquests models murins. S'han realitzat diversos tests de conducta avaluant aspectes relacionats amb l'ansietat, la pèrdua de sociabilitat o la disminució de la memòria de treball. En general els resultats mostren dèficits específics relacionats amb el processament de la informació, en l'aprenentatge, els records i la transmissió de la informació sensorial al sistema motor. Alguns dels assaigs de conducta realitzats en els models de ratolí s'han centrat en mesurar la inhibició pre-pols (PPI: *prepulse inhibition*) de resposta als sobresalts, que es refereix a la capacitat que té un pre-estímul dèbil per inhibir transitòriament la resposta a un següent estímul sensorial fort i proper. El model de ratolí Df1 mostra una resposta anòmala al test condicionat de la por i una reducció de PPI rellevant, similar a la que presenten els pacients amb esquizofrènia (Paylor et al. 2001; Sobin et al. 2005a; Sobin et al. 2005b).

La majoria d'estudis amb models animals s'han centrat en analitzar els efectes fenotípics produïts per la disminució de dosi d'aquests gens, mentre que es coneix molt menys sobre els efectes dels augments de dosi. En aquest sentit, s'ha observat que l'excés de dosi d'una regió d'unes 200Kb en un transgènic de quatre gens humans (*PNUTL*, *GP11BB*, *TBX1* i *WDR14*) produeix causa un fenotip similar a la SDG/VCF, amb un paladar fes, defectes cardíacs conotruncals, hipoplàsia del timus, i defectes a les orelles (Funke et al. 2001; Merscher et al. 2001). Els estudis conductuals en aquest model de ratolí van demostrar que una sobreexpressió d'aquesta regió produïa una sensibilització espontània a la hiperactivitat i una pèrdua d'habitució que podien ser revertits si el ratolí era tractat amb antipsicòtics; també es van descriure anomalies en les conductes de nidificació d'aquests animals (Hiroi et al. 2005). La rellevància d'aquestes anomalies en la conducta dels ratolins i la relació que poden tenir amb els trastorns neuropsiquiàtrics en humans portadors de la microduplicació 22q11.2 no està clara, però les poques dades de què disposem suggereixen que els individus amb la

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

microduplicació 22q11.2 podrien ser més susceptibles a patir trastorns neuropsiquiàtrics.

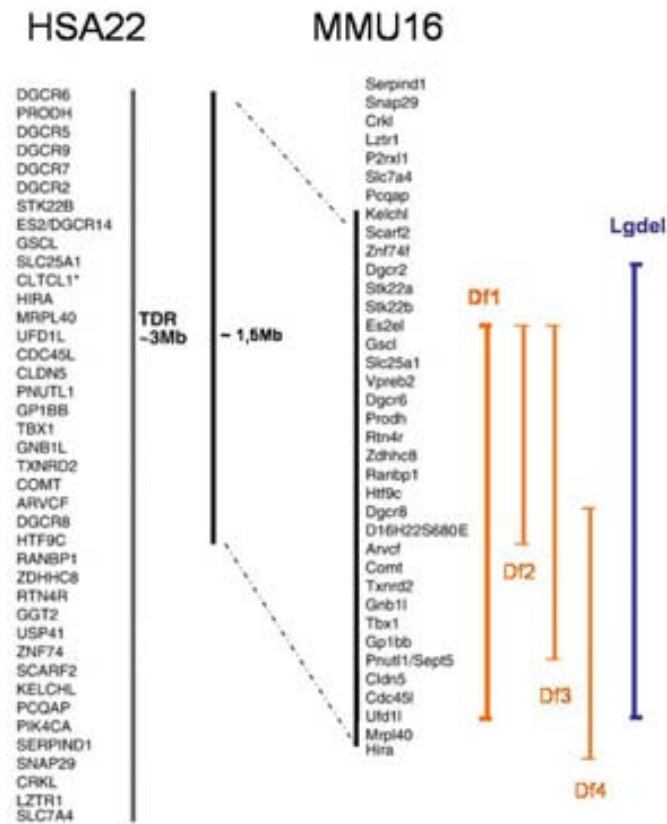


Figura 1.12: Localització dels gens en la regió sintènica del cromosoma 16 (MMU16) de ratolí, respecta a la regió 22q11.2 humana (HSA22). Les barres negres indiquen els gens inclosos dins la delecció típica de 3Mb humana (TDR ~3Mb) i la regió mínima de ~1,5Mb. Les barres de la dreta mostren la regió deleccionada en els diferents models de ratolí Df i Lgd1.

La majoria de les microdeleccions i microduplicacions a 22q11.2 afecten una regió d'unes 3Mb, en què hi ha continguts fins a 42 gens. La inexistència de diferències clíniques entre els pacients amb la delecció típica i la delecció de 1.5Mb, apunta a què els 22 gens localitzats entre els LCR22-A i B serien els principals responsables dels trets fenotípics associats als reordenaments en aquesta regió (vegeu Figura 1.12). A continuació es fa una revisió breu dels gens d'aquesta regió que s'han postulat com a més rellevants en relació a la SDG/VCF i a l'esquizofrènia, una de les alteracions neuropsiquiàtriques que apareix amb major freqüència associada a la síndrome.

El gen **TBX1** (*T-box isoform B*) és un membre de la família de factors de transcripció que contenen T-box i s'expressa a nivells elevats en els arcs faringis durant el desenvolupament embrionari (Chapman et al. 1996). La seva expressió, dosi-depenent, es necessita pel desenvolupament normal de les artèries dels arcs faringis. En models murins s'ha vist que la deleció d'una còpia de *Tbx1* afecta el desenvolupament de les artèries dels quarts arcs faringis i origina anomalies de l'arc aòrtic, mentre que la mutació en homozigosi malmet severament el sistema arterial d'aquestes estructures embrionàries, desencadenant una aplàsia de timus i glàndules paratiroides, malformacions majors a les orelles, defectes facials, anomalies al paladar, *truncus arteriosus* i defectes cardíacs més severos, que sovint resulten letals en l'etapa perinatal (Jerome and Papaioannou 2001; Lindsay et al. 2001; Merscher et al. 2001). Recentment s'ha demostrat que restablint l'expressió de *Tbx1* es poden revertir els danys (Theveniau-Ruissy et al. 2008). Tot i que el gen **TBX1** es considera un dels principals responsables del fenotip de les alteracions cardíques de la SDG/VCF, s'han identificat pocs casos amb reorganitzacions genètiques o mutacions en aquest gen (Gong et al. 2001; Lindsay and Baldini 2001; Conti et al. 2003; Zhang et al. 2008). Altres treballs han estudiat la contribució d'aquest gen en pacients amb trastorns psiquiàtrics (esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major) i no s'ha trobat cap associació significativa per cap dels SNPs analitzats (Funke et al. 2007). Tot i així, l'haploinsuficiència dels gens *Tbx1* i *Gnb1l* en ratolins causa un dèficit en la inhibició pre-pols, suggerint que el gen *Tbx1* podria ser un bon candidat per a desordres psiquiàtrics (Paylor and Lindsay 2006).

Pel que fa a la resta de gens de la regió 22q11.2 pels que s'han construït models de ratolins KO (knockOut), les conseqüències fenotípiques semblen lleus. És el cas del gen **GSCL** (gooseoid-like), que també s'expressa durant l'embriogènesi i en teixits adults com el cervell, l'ull, el timus, la regió tiroïdal, l'estómac i els testicles. Els KO per *Gscl* són aparentment normals. El gen **HIRA** s'expressa durant el desenvolupament del tub neural del ratolí (Wilming et al. 1997). Els ratolins *Hira*^{+/-} són aparentment normals, mentre que els *Hira*^{-/-} presenten un ampli quadre de malformacions i moren en etapa embrionària,. Atenuacions antisentit de l'expressió del gen **HIRA** en embrions de pollastre provoquen un increment en la incidència de *truncus arteriosus* persistent (Farrell et al. 1999). El gen **UFD1L**

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

s'expressa en els arcs branquials, massa frontonasal i tractes de sortida del cor. La identificació d'un pacient amb un microdeleció que només afectava el gen *UFD1L* i el veí *CDC45L* va fer suggerir als seus autors que aquests dos gens podien ser responsables de la SDG/VCF (Yamagishi et al. 1999). Treballs posteriors estudiant pacients amb clínica de SDG/VCF però sense la microdeleció 22q11.2, no van permetre identificar cap mutació en aquests gens (Wadey et al. 1999).

Pel que fa a *CRKL*, els ratolins *Crkol*^{+/-} són normals i viables, però els mutants *Crkol*^{-/-} moren en etapa embrionària i desenvolupen un fenotip semblant al de la SDG/VCF, incloent defectes conotruncals i de l'arc aòrtic, timus i anomalies craniofacials (Guris et al. 2001).

Mutacions en gens responsables del metabolisme dels neurotransmissors dopamina i glutamat (*COMT*, *PRODH* i *ZDHHC8*) poden tenir un paper rellevant en l'etiologia dels desordres psiquiàtrics associats a la SDG/VCF (Lindsay et al. 1999). El gen *COMT* (Catechol-Omethyltransferase) codifica per un enzim crític en el catabolisme de la dopamina en el córtex prefrontal, regió fortament implicada en l'esquizofrènia. S'ha descrit un polimorfisme comú que origina la substitució d'una valina per una metionina (Val/Met) i mentre l'al·lel Val codifica per una forma d'enzim altament activa, l'al·lel Met produeix un enzim amb baixa activitat (Lachman et al. 1996). Estudis d'associació entre el gen *COMT* i l'esquizofrènia han produït resultats inconsistents que per una banda apunten a una associació significativa amb l'al·lel Val (Li et al. 1996; Kunugi et al. 1997; Egan et al. 2001; Shifman et al. 2002; Glatt et al. 2003), però que altres investigadors no han pogut observar (Daniels et al. 1996; Ohmori et al. 1998; Liou et al. 2001). Per altra banda, els pacients amb la microdeleció 22q11.2 i hemizigots per la forma Val, mostren un empitjorament en els tests de cognició i memòria de treball (Bearden et al. 2004), mentre que els hemizigots per l'al·lel Met presenten un major dèficit cognitiu i un increment en la severitat de la psicosis (Gothelf et al. 2007).

El gen *PRODH* (Proline dehydrogenase 1) codifica per un enzim mitocondrial que catalitza el primer pas de la conversió de la prolina en glutamat. En anàlisis de SNPs es va identificar una associació entre l'esquizofrènia i un SNP de la regió 3' del gen (Li et al. 2004), però altres estudis no han pogut corroborar aquesta associació (Fan et al. 2003; Williams et al. 2003; Li and He 2006). S'han descrit, però, mutacions en el gen *PRODH* en tres pacients amb esquizofrènia (d'un total de 63),

que s'associen amb un augment dels nivells de prolina en plasma i que segreguen amb la malaltia en famílies franceses (Jacquet et al. 2002). Ratolins *Prodh*^{+/-} mostren alteracions neuroquímiques regionals en el cervell acompanyades de dèficit sensoriomotor en el gateig (Gogos et al. 1999; Paterlini et al. 2005). En un altre estudi d'associació es descriuen evidències d'epistasi entre la variant Val del gen *COMT* i dos al·lels mutats del gen *PRODH*, relacionades amb un increment en la densitat de matèria blanca en el lòbul frontal inferior esquerre (Zinkstok et al. 2008).

En el gen ***ZDHHC8*** (*zinc finger DHHC domain containing 8*), que s'expressa en l'hipocamp i el cortex, s'han descrit cinc SNPs associats amb l'esquizofrènia en població xinesa (Mukai et al. 2004), que en estudis posteriors no s'han pogut replicar (Glaser et al. 2005; Otani et al. 2005). Estudis amb ratolins suggereixen que aquest gen podria estar implicat en la reducció en la densitat d'espines dendrítiques i sinapsis glutaminèrgiques que s'observa en el model de ratolí per la deleció 22q11.2 (Df1) i que els ratolins transgènics *Zdhhc8*^{+/-} i *Zdhhc8*^{-/-} mostren una reducció de neurones del 40% i 43% respectivament (Mukai et al. 2008).

La conclusió dels nombrosos estudis dels gens de la regió 22q11.2, és que ni l'haploinsuficiència d'un sol gen ni l'acció de diversos gens contigus poden explicar el complex i variable espectre fenotípic associat amb aquesta microdeleció. Probablement, doncs, es tracta d'una malaltia sensible a la dosi gènica, on un cert grup de gens amb una expressió reduïda a la meitat són incapaçs de mantenir les seves funcions normals. Determinar la contribució combinatòria dels 22 gens delecionats i les interaccions amb altres gens és un repte complicat que caldrà afrontar en els propers anys. Alguns treballs han demostrat interaccions complexes entre els gens de la regió 22q11.2 com la modulació de l'expressió de *Hira* i *Tbx1* per part de *Dgcr6* en un model de pollastre (Hierck et al. 2004) o la ja esmentada relació entre variants del gen *PRODH* i *COMT*. En aquesta direcció, Meechan i col·laboradors, van utilitzar eines bioinformàtiques així com mètodes de biologia cel·lular per intentar definir quins subgrups de gens estan regulats de manera coordinada i quins grups de gens participen en processos cel·lulars comuns. Aquest autor, analitzant els 26 gens en el bloc de sintènia del cromosoma 16 del ratolí, proposa un model que defineix tres grups de gens funcionals que podrien tenir conseqüències fenotípiques específiques en diferents estadis del desenvolupament

Introducció: Regió cromosòmica 22q11.2

(Figura 1.13) (Meechan et al. 2007). Aquest model, tot i ser preliminar, resulta interessant pel fet que suggereix una connexió entre l'alteració en la dosi de conjunts de gens de la regió 22q11.2 i les diferents manifestacions fenotípiques que es presenten en la SDG/VCF, en aquest cas la vulnerabilitat a l'esquizofrènia.

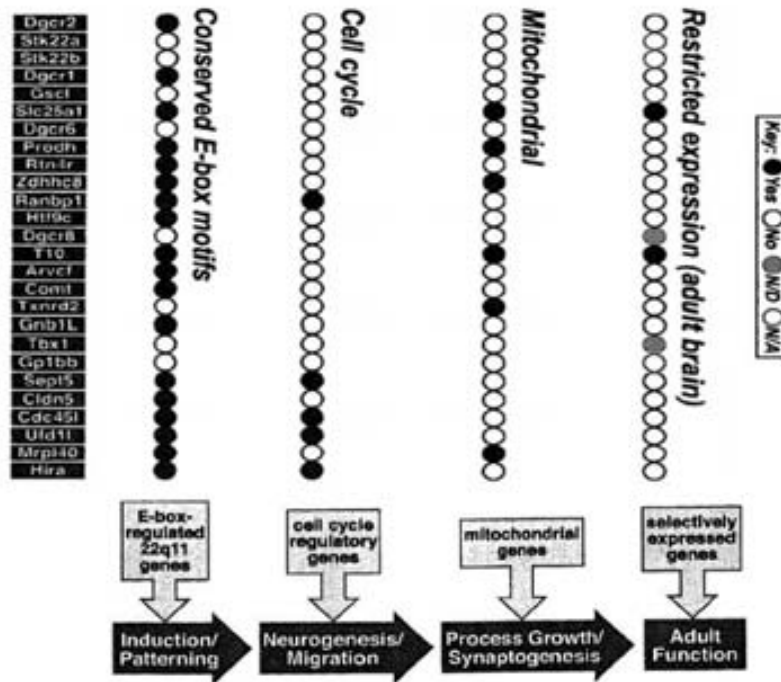


Figura 1.13: Subgrups de gens funcionals: El model de (Meechan et al. 2007) proposa tres subgrups de gens funcionals, 18 gens amb motius d'unió E-box altament conservats, 5 gens associats amb el control del cicle cel·lular, 6 gens amb seqüències aparentment de localització mitocondrial i 4 gens que mostren una expressió restringida en cervell adult. A sota de cada un d'aquests grups de gens es representen esquemàticament les principals fases del desenvolupament neuronal i el potencial impacte funcional que podria tenir la disminució en la dosi de cada grup de gens.

1.3 Esquizofrènia i variants en nombre de còpia

La paraula esquizofrènia va ser definida per Bleuler l'any 1908 i deriva del grec, *schizo*: "divisió" o "escisió" i *phrenos*: "ment". Aquest terme descriu un trastorn mental que afecta la percepció, pensaments i emocions, afectant de manera greu l'activitat social del individu. Es tracta d'una malaltia amb una alta incidència en la població (~1%).

1.3.1 Manifestacions clíniques i diagnòstic de l'esquizofrènia

Existeixen una gran varietat de símptomes indicadors de l'esquizofrènia: les al·lucinacions, els deliris, els trastorns del pensament i llenguatge, les alteracions motores i les alteracions de l'emotivitat (Taula 1.6). Cap d'aquests símptomes és patognomònic de la malaltia i la seva combinació pot ser diferent en la diversitat d'individus.

Taula 1.6: Principals símptomes psíquics de l'esquizofrènia.

Al·lucinacions sensoriperceptives o pseudoperceptives
Al·lucinacions visuals, olfactivas, tàctils o auditives, amb veus que parlen entre sí, o amb el propi pacient.
Deliris
Idees delirants i il·lògiques. Creences delirants de grandiloquència, sentiment de culpabilitat, sentiments de gelosia, idees persecutòries, pensaments místico-religiosos, sensació que terceres persones llegeixen el pensament i intercedeixen en les seves decisions.
Trastorn formal del pensament i llenguatge
Manca de concentració, rigidesa, disgregació, incoherència, distractibilitat en el discurs, extravagància, falta d'espontaneïtat, falta de coherència en el llenguatge, abús de neologismes d'invenió pròpia, estereotípies verbals, mutisme, jargonafàsia, manerismes verbals.
Alteracions motores
Afectació del to muscular i dels reflexes posturals: estupor catatònic (passivitat davant estímuls exteriors), catalèpsia amb flexibilitat cèria (rigidesa en la postura i en els membres) i estereotípies cinèsiques (repetició de moviments de manera constant).
Alteracions de la emotivitat
Embotament afectiu i incoherència emocional; disminució, exageració o transformació de l'afectivitat (paratímies); explosions afectivo-emocionals (crisi de còlera, por, alegria, tristesa...), símptomes depressius. Alteracions de la conducta i personalitat.

La simptomatologia de l'esquizofrènia es pot classificar en els anomenats "símptomes positius" (exacerbacions del comportament normal) i "símptomes negatius" (absència o disminució del comportament normal). Els símptomes

positius s'agrupen sota el terme **psicosi** i típicament comprenen deliris, al·lucinacions i trastorns del pensament. Els símptomes negatius poden incloure dificultat en la parla, emocions impròpies (incoherència afectiva) o pèrdua d'aquestes, i falta de motivació. A més a més poden aparèixer problemes de disminució neurocognitiva, que prenen forma de reducció o deteriorament de funcions psicològiques bàsiques tals com la memòria, l'atenció, la resolució de problemes i la cognició social. Es tracta doncs d'un trastorn que compromet seriosament les funcions essencials de la persona, com la vivència de la seva individualitat, singularitat i domini de sí mateixa. El malalt creu que els seus pensaments, sentiments i actes són coneguts per altres persones i poden presentar-se idees delirants sobre l'existència de forces naturals o sobrenaturals, capaces d'influir de manera estranya i aliena en els actes i pensaments de l'individu afectat, que s'arriba a considerar el centre de tot allò que succeeix.

Els símptomes de l'esquizofrènia es manifesten habitualment a finals de l'adolescència o a principis de l'edat adulta, malgrat alguns pacients manifesten trets cognitius i de conducta durant la infància. L'edat mitjana d'aparició de la malaltia se situa entre els 15 i 25 anys en homes i entre els 25 i 35 anys en dones (Castle and Murray 1991), essent poc freqüent que es desenvolupi la malaltia més enllà dels 45, tot i que en les dones s'ha descrit un segon pic després de la menopausa. Es considera una evolució més o menys típica aquella que s'inicia amb una fase premòrbida entre el naixement i els 10 anys, seguida d'un període prodròmic entre els 10 i 20 anys, on acostumen a aparèixer alguns símptomes negatius que desencadenen problemes com per exemple la interrupció dels estudis, o conflictes en el camp de les relacions socials amb la família, amistats o parella. Després comença l'etapa de progressió del trastorn, on apareixen els primers episodis crítics aguts amb símptomes més cridaners (deliris i al·lucinacions), tot i que aquests no són els més importants per realitzar el diagnòstic. Aquests episodis mostren un temps d'evolució variable, des d'algunes setmanes fins a diversos mesos, depenent també del tractament mèdic. L'últim període és d'estabilització i/o esgotament, cap als 40 anys, quan predomina la simptomatologia negativa i s'aguditzen els dèficits cognitius.

El diagnòstic de l'esquizofrènia es basa en la història clínica i en l'examen psicopatològic, en què s'avalua el comportament del pacient i els símptomes. A diferència d'altres malalties no existeix una prova biològica o test específic, el resultat positiu de la qual confirmi el diagnòstic. Malgrat això, hi ha una sèrie

d'exploracions que, en qualsevol pacient en què se sospiti aquesta malaltia, poden ajudar a establir el diagnòstic i el pronòstic de cada cas. De la necessitat d'unificar el diagnòstic i registre d'aquests pacients i permetre una millor comunicació entre els professionals, es van elaborar diversos manuals que recullen els criteris diagnòstics per diferents malalties psiquiàtriques: el *Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders* (DSM) de l'Associació Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association - APA*), i el *Clasificación internacional de las enfermedades* (CIE) de la Organització Mundial de la Salut (OMS). El DSM-IV-TR (on TR significa Text Revisat) és l'última versió modificada, publicada per l'APA l'any 2000, i la CIE-10 ho és de l'OMS i data del 1994. Per bé que ambdues classificacions són bàsicament similars, hi ha diferències en alguns trastorns i en el nom que els donen. Per exemple, l'"esquizofrènia tipus desorganitzat" del DSM equival a "esquizofrènia hebefrènica" de la CIE. S'espera que en un futur s'unifiquin ambdues classificacions. Cada cert temps, les classificacions es revisen d'acord amb els avenços que han suposat les investigacions i experiències clíniques, per tal d'ajustar els criteris o modificar-los. Actualment s'han creat comitès d'experts que estudien propostes de modificacions en la classificació dels trastorns mentals, que possiblement seran objecte de revisió en el proper DSM-V i, posteriorment, en la CIE-11.

Segons els criteris DSM-IV una persona és diagnosticada amb esquizofrènia, quan manifesta un mínim de dos dels criteris recollits a la Taula 1.7 i aquests persisteixen durant un mínim d'un mes i no deriven d'una altra malaltia orgànica, ni dels efectes d'una substància tòxica. En l'actualitat el manual DSM-IV classifica l'esquizofrènia en cinc tipus, que són els següents:

- **Tipus paranoide:** predominen els deliris i al·lucinacions (el DSM exigeix que no hi hagi discurs desorganitzat ni afectivitat inapropiada o plana).
- **Tipus desorganitzat:** predomina el discurs i comportament desorganitzat, i una afectivitat inapropiada o plana.
- **Tipus catatònic:** amb importants alteracions psicomotores tals com la flexibilitat cèria, que pot arribar fins a l'estupor catatònic.
- **Tipus indiferenciat:** hi ha símptomes psicòtics, però no compleixen criteris del tipus paranoide, desorganitzat o catatònic.
- **Tipus residual:** on els símptomes positius estan presents només en baixa intensitat.

Taula 1.7: Criteris diagnòstics DSM-IV per l'esquizofrènia. El 2000 es va publicar una revisió anomenada DSM-IV-TR, on les categories diagnòstiques i la majoria dels criteris específics no es van modificar.

Criteris diagnòstics DSM-IV per l'esquizofrènia
<p>A) Síntomes característics: Dos (o més) dels següents, cada un dels quals presents durant una part significativa d'un període d'un mes (o menys, si s'ha tractat amb èxit).</p> <ul style="list-style-type: none">• Deliris• Al·lucinacions• Discurs desorganitzat (ex. Freqüents descarrilaments o incoherència).• Comportament catatònic o greument desorganitzat• Síntomes negatius, p.ex. aplanament afectiu (falta o disminució de resposta emocional), al·lògia (falta o disminució de la parla), o abúlia (falta o disminució de la motivació).
<p>B) Disfunció social/laboral: Durant una part significativa del temps des del inici de l'alteració, una o varies àrees importants de l'activitat, com són el treball, les relacions interpersonals o la cura d'un mateix, estan clarament per sota del nivell previ al inici del trastorn (o, quan el inici és a la infància o adolescència, fracàs per aconseguir el nivell esperat de rendiment interpersonal, acadèmic o laboral)</p>
<p>C) Duració: Persisteixen signes continus de l'alteració durant almenys sis mesos. Aquest període de sis mesos ha d'incloure almenys un mes de símptomes (o menys, si s'ha tractat amb èxit) que compleixin el criteri A, i poden incloure períodes prodròmics i residuals. Durant aquests períodes, els signes de l'alteració poden manifestar-se només pels símptomes negatius o per dos o més dels símptomes de la llista del Criteri A, presents de forma atenuada (p.ex., creences rares, experiències perceptives no habituals).</p>
<p>Els altres criteris (D,E i F) permeten excloure que el trastorn derivi de trastorns afectius o de l'estat d'ànim, de trastorns per us de substàncies psicoactives o condicions mèdiques i de trastorns generalitzats de desenvolupament.</p>

L'heterogeneïtat en els símptomes, el curs i l'evolució de la malaltia en diferents pacients planteja el dubte de si l'esquizofrènia és una sola entitat nosològica amb manifestacions clíniques variables, o un grup de síndromes, cadascun d'ells amb una base patofisiologia pròpia. Entre la combinació de símptomes associats a l'esquizofrènia es troben trets compartits amb altres trastorns psiquiàtrics, com poden ser els deliris i les al·lucinacions en el trastorn bipolar i la depressió. A més a més, determinades manifestacions clíniques són variacions extremes de trets de personalitat presents també en la població no malalta. Tot això configura un panorama complex on es dibuixa un solapament entre la simptomatologia de l'esquizofrènia i altres trastorns psiquiàtrics, i també amb certs trets de personalitat comuns en la població no malalta, com es mostra a la Figura 1.14. Aquesta condició, sumada al fet que no existeix una prova diagnòstica per les malalties psiquiàtriques, dificulta una acurada definició dels límits fenotípics de l'esquizofrènia i alguns autors suggereixen que el diagnòstic clínic de l'esquizofrènia podria no reflectir la seva etiologia genètica, podent esser

aquesta una dels principals dificultats en la recerca de les bases genètiques de la malaltia (Burmeister 2008; Jablensky 2006).

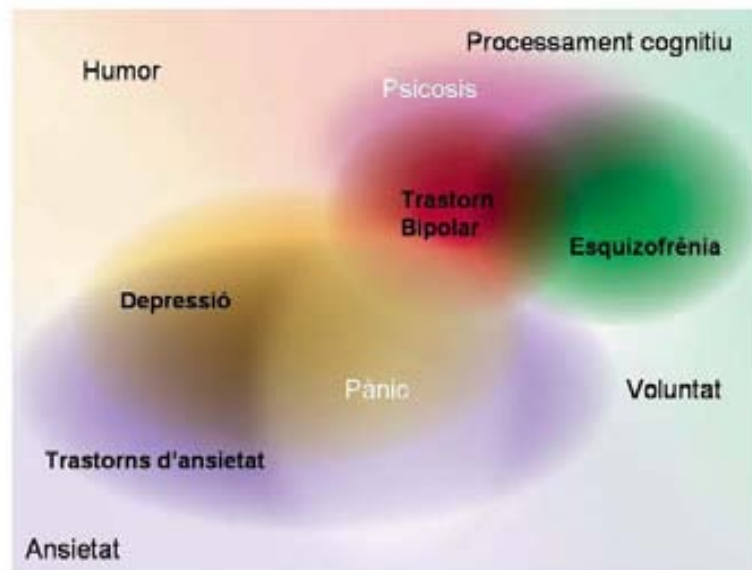


Figura 1.14: Convergència entre trets de personalitat i trastorns psiquiàtrics. Aquesta figura il·lustra com la vulnerabilitat a les malalties psiquiàtriques pot emergir de variacions extremes de trets de personalitat que es troben presents en la població general, com són l'estat d'ànim o humor, l'ansietat, la voluntat i el processament cognitiu. La combinació d'aquests trets de personalitat amb altres factors genètics i ambientals de risc per les malalties psiquiàtriques poden desencadenar els diversos trastorns psiquiàtrics il·lustrats com: l'esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió i trastorns d'ansietat. La psicosis i el pànic són característiques patològiques que no representen una categoria diagnòstica, però que s'associen amb molts trastorns psiquiàtrics. Donat que la representació és en dos dimensions, les interaccions i superposicions existents són encara majors, així per exemple la depressió i l'ansietat també es troben presents en l'esquizofrènia.

1.3.2 Etiologia de l'esquizofrènia

Més d'un segle després de la seva definició i malgrat la intensa investigació desenvolupada, la recerca de les causes de l'esquizofrènia segueix ben vigent. Estudis epidemiològics, farmacològics i neurobiològics han aportat indicis sobre la naturalesa d'aquesta malaltia i actualment existeix un consens en considerar a l'esquizofrènia com un trastorn del neurodesenvolupament, en què, probablement, hi estan implicades disfuncions sinàptiques i connexions neuronals anòmales (Harrison 1999; McGrath 2007).

El procés implicat en el desenvolupament de l'esquizofrènia és complex, i s'han proposat nombroses teories que han donat lloc a diverses hipòtesis entre les quals predomina la hipòtesi dels neurotransmissors dopamina, glutamat i GABA. Des dels anys cinquanta s'ha sostingut que l'esquizofrènia prové d'un excés d'alliberació de dopamina en el sistema límbic i els lòbuls frontals (van Rossum

1967; Meltzer and Stahl 1976). Les evidències principals d'aquesta hipòtesi provenen de l'observació de què les drogues antipsicòtiques, que bloquegen l'acció dels receptors D2 que transporten la dopamina cap a l'interior de la cèl·lula, permeten controlar els símptomes positius de la malaltia (Baumeister and Francis 2002). Una revisió més actual d'aquesta hipòtesi proposa, però, un model bastant més complex que contempla un increment de transmissions dopaminèrgiques en el gangli basal associades amb la psicosis aguda i un dèficit de dopamina al còrtex dorsolateral prefrontal implicat en la memòria de treball i responsable del dany cognitiu crònic (Abi-Dargham et al. 2000; Weinberger et al. 2001). Més recentment diversos estudis psicofarmacològics han aportat evidències d'anomalies en altres neurotransmissors del cervell de pacients amb esquizofrènia, que inclouen la serotonina, la histamina, la muscarina, el glutamat, el GABA i els receptors adrenèrgics (Kalkman et al. 2001). Actualment l'èmfasi està centrat en l'estudi sobre el sistema de neurotransmissors associats amb les projeccions neuronals i interneuronals que utilitzen el glutamat i el GABA. Respecte el sistema GABA, diversos estudis postmortem han aportat evidències d'una disfunció de les interneurons inhibidores en l'esquizofrènia (Benes 2000) i la hipòtesi del glutamat proposa que una baixa activitat dels receptors de glutamat tipus NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) podria contribuir a la psicosis (Olney and Farber 1995). Els nivells de glutamat s'han trobat reduïts en pacients amb esquizofrènia, i els seus antagonistes s'ha observat que estimulen els trets psicòtics en individus normals (Kim et al. 1980; Kornhuber 1992). Així doncs, una activació dels receptors de glutamat alleuja els trets psicòtics (Javitt and Zukin 1991; Jentsch and Roth 1999; Goff and Coyle 2001). Aquests tres neurotransmissors conflueixen en un complex circuit neuronal on les fibres dopaminèrgiques es projecten abundantment en el còrtex frontal i formen connexions sinàptiques amb el tronc de les espines cel·lulars piramidals, que també reben estímuls excitadors glutamaèrgics, i amb dendrites de neurones GABAèrgiques. Actualment es considera que tots tres neurotransmissors estan implicats en les anomalies del processament cortical en els pacients amb esquizofrènia (Benes 2009).

Paral·lelament a aquestes hipòtesi dels neurotransmissors, diversos estudis d'epidemiologia han posat de relleu que les primeres etapes del desenvolupament fetal del individu poden estar implicades en el procés patogènic de l'esquizofrènia. Aquest fet va conduir a diversos autors a proposar que l'esquizofrènia és una malaltia del neurodesenvolupament. El model del neurodesenvolupament proposa

que una sèrie de lesions cerebrals, fixades ja des de les primeres etapes del desenvolupament fetal, interaccionen amb certes esdeveniments de maduració normals que s'esdevindran més tard en del desenvolupament del individu (Weinberger 1987; Cardno et al. 1999; Singh et al. 2004; Rapoport et al. 2005). Aquest model, que és el més acceptat actualment, es veu recolzat per diverses observacions que han descrit anomalies en les funcions del cervell, ja presents en les etapes inicials de la vida, en individus que posteriorment han desenvolupat la malaltia. Un exemple és la major freqüència d'esdeveniments pre o perinatals potencialment nocius que acompanyen aquests individus comparats amb un grup control, o l'alt percentatge de dèficits neuropsicològics i motors que exhibeixen els infants *pre-esquizofrènics* (Torrey et al. 1994), així com també els resultats dels estudis de neuroimatge que mostren un allargament ventricular i reduccions en el volum cortical abans que es manifesti la malaltia (Lawrie et al. 1999; Pantelis et al. 2003). Les lesions resultants en el cervell madur adult derivades d'aquestes anomalies en el neurodesenvolupament poden ser disfuncions en la connectivitat del circuit neuronal, que encaixarien amb les hipòtesis dels neurotransmissors anteriorment exposades.

• Factors genètics

La càrrega genètica dels individus confereix una diferent susceptibilitat a l'hora de desenvolupar la malaltia. Els resultats de diversos estudis familiars, de bessons i d'adopció demostren clarament un risc de morbiditat més elevat entre els familiars de pacients amb diverses malalties psiquiàtriques (Shih et al. 2004). En el cas de l'esquizofrènia, els estudis realitzats en bessons indiquen que la concordança entre bessons monozigòtics és més elevada (50-53%) que entre bessons dizigòtics (4-15%) (Shih et al. 2004), i en referència als familiars de pacients afectes s'observa una correlació clara entre el risc i el grau de parentesc (Figura 1.15). Totes aquestes dades situen l'heretabilitat de l'esquizofrènia en un 80% (Sullivan et al. 2003).

Una altra dada d'interès derivada dels estudis familiars en l'esquizofrènia és l'anàlisi de la seva relació amb altres trastorns psiquiàtrics. Alguns treballs han identificat evidències significatives d'un risc major de trastorn bipolar (Tsuang et al. 1980) i de trastorn esquizoafectiu (Kendler et al. 1998) entre descendents d'individus amb esquizofrènia (Andreasen et al. 1987; Valles et al. 2000). Malauradament, però, no tots els estudis coincideixen en els resultats, i la

morbilitat entre aquests trastorns no està clara, com recull la revisió de (Shih et al. 2004), que justifica l'escassa homogeneïtat en els criteris diagnòstics i perfils de símptomes dels diferents estudis com una de les causes principals en les diferències de resultats.

A l'hora d'establir les bases genètiques de la malaltia, sorgeixen una sèrie de qüestions bàsiques: quins són els gens implicats en la malaltia? quin efecte tenen? es tracta de varis components amb un efecte petit?, on la seva composició i suma desencadena la malaltia? o n'hi ha alguns que tenen un paper més important en la susceptibilitat a la malaltia?. Aquests interrogants són part dels reptes actuals de la investigació genètica en psiquiatria, que pretén identificar els gens implicats, així com comprendre la seva interacció amb els factors ambientals.

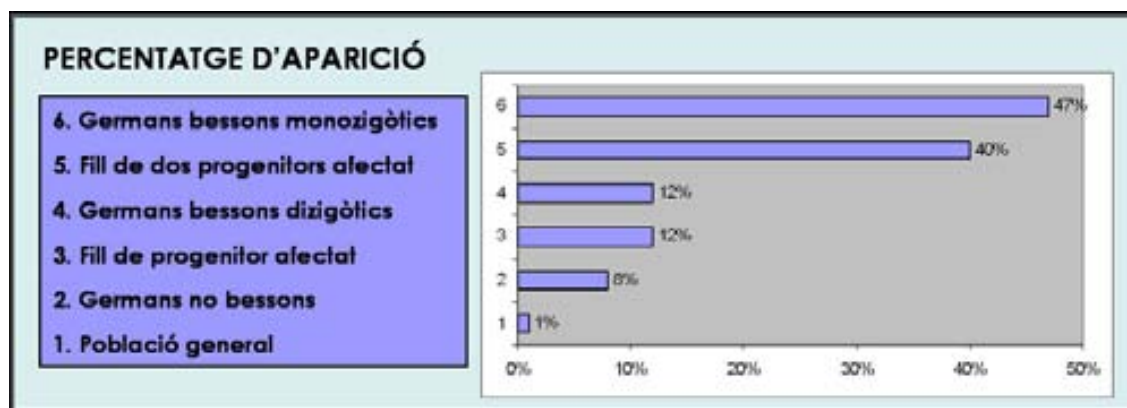


Figura 1.15: Percentatge d'aparició de l'esquizofrènia. Aquest gràfic mostra el diferent risc de desenvolupar esquizofrènia entre els familiars d'un pacient afectat.

• Factors ambientals

Existeixen diverses etapes en el desenvolupament en les que l'exposició a factors ambientals poden conferir un major risc per l'esquizofrènia. En etapa prenatal, s'han descrit diverses situacions biològiques relacionades amb la mare que s'associen a un major risc per a la descendència. Entre aquestes s'inclouen infeccions per virus, com la rubeola o la grip, el fet de pertànyer a una classe social baixa (Dohrenwend et al. 1992), o una malnutrició materna. En models de ratolí s'ha observat que l'activació del sistema immunitari durant la gestació causa anomalies en la mielinització i desenvolupament axonal de l'hipocamp de la descendència (Makinodan et al. 2008). També en models de ratolí, s'ha descrit que la infecció amb el virus "influenza" (virus de la grip) durant la gestació, pot crear

anomalies cerebrals similars a les observades en l'autisme i l'esquizofrènia (O'Donovan et al. 2009).

En l'etapa perinatal existeixen estudis que descriuen una major afectació entre individus amb problemes obstètrics (Lewis and Murray 1987). Per exemple, la hipòxia fetal ha estat associada amb una reducció de la matèria gris i un increment de fluid cerebrospinal en pacients amb esquizofrènia i els seus fills (Cannon et al. 1993).

En etapes posteriors del desenvolupament de l'individu, els esdeveniments vitals actuen com a moduladors del curs de la malaltia i poden precipitar-ne el desencadenament o recaiguda, principalment en persones amb predisposició genètica. L'estrès influeix sobre els nivells de glutamat i dopamina, essent un factor ambiental que pot modular l'aparició de la malaltia (Palomo et al. 2004). A més a més la dopamina també es pot desregular a través de processos de sensibilització, com a resultat de la ingesta de substàncies psicoactives. Per aquest motiu l'estrès combinat amb l'abús de drogues i l'adversitat social durant l'adolescència poden impulsar el dany en el neurodesenvolupament i fer brotar la malaltia (Howes et al. 2004).

En aquesta complexa interacció entre factors genètics i ambientals cap d'ells és suficient per al desenvolupament de la malaltia, probablement perquè tots ells hi contribueixen de manera discreta (Figura 1.16).

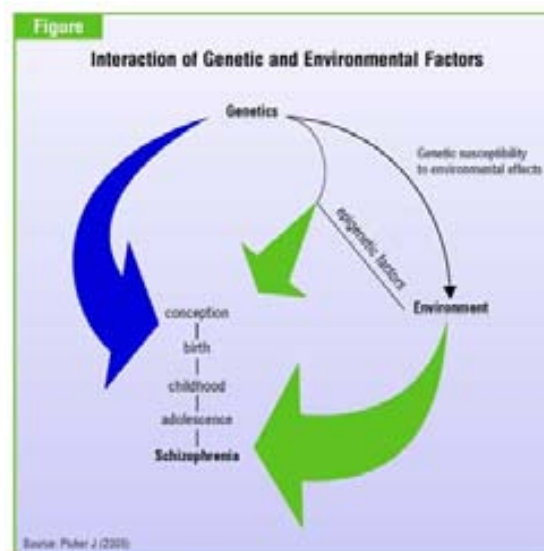


Figura 1.16: Interacció entre factors genètics i ambientals. L'herència de l'esquizofrènia és el resultat de la conglomeració de factors genètics i ambientals que intervenen ja des de la concepció del individu i que influiran en el desenvolupament de la malaltia. Els factors ambientals i els genètics poden també manifestar-se presentant mutacions epigenètiques

1.3.3 Epidemiologia genètica de l'esquizofrènia

Les estratègies emprades per a la identificació dels gens de susceptibilitat per a malalties complexes, com és el cas de l'esquizofrènia, s'han basat en dues metodologies: els estudis de lligament i els d'associació.

1.3.3.1 Estudis de lligament

Els estudis de lligament són un mètode basat en l'anàlisi de famílies amb individus afectes i individus sans, en què s'estudia la co-segregació entre la malaltia i diferents tipus de marcadors genètics de localització cromosòmica coneguda. Igual que en les malalties monogèniques, en les malalties complexes, aquelles regions cromosòmiques que contenen un gen implicat en la malaltia, mostren una incidència més alta d'al·lels compartits entre els individus afectes de la família de la que caldria esperar per recombinació meiótica en la regió cromosòmica d'estudi.

Els primers estudis de lligament es van basar en petits nombres de famílies que contenien múltiples individus afectats, amb la intenció de detectar al·lels d'alta penetrància que segreguessin amb la malaltia, però aquesta aproximació no va resultar fructífera i els estudis es van anar encaminant cap a l'anàlisi d'amples pedigrís amb l'objectiu de poder capturar al·lels que, tot i no ser altament penetrants, tinguessin un efecte moderat en el risc (doble o triple en individus portadors). Desafortunadament els estudis de lligament, tot i haver aportat evidències significatives de lligament en diverses regions del genoma, resulten poc consistents en la replicació (Owen et al. 2005). Aquesta elevada incapacitat de replicar els resultats entre mostres independents s'atribueix a la possibilitat que existeixi una combinació de petits efectes genètics rellevants per l'esquizofrènia i que aquests no puguin ser detectats per estudis de lligament perquè es requeriria l'anàlisi de tamany mostrals molt elevats (Suarez and Hampe 1994). Aquesta limitació s'ha intentat pal·liar amb els estudis de meta-anàlisis, que coincideixen en la descripció d'algunes regions (Taula 1.8).

Aquests meta-anàlisis descriuen l'existència de més regions nominals lligades a l'esquizofrènia de les que seria d'esperar per recombinació, i aquest excés de senyals de lligament reflecteix l'existència de regions genòmiques que podrien estar enriquides en efectes dèbils comuns o llargues regions que podrien acumular diversos tipus d'efectes poc comuns (Porteous 2008).

Taula 1.8: Recull de metanàlisis d'estudis de lligament en esquizofrènia.

<i>Estudi i fenotip</i>	<i>Nº Famílies</i>	<i>Nº individus afectats</i>	<i>Locus</i>
<i>Badner and Gershon, 2002</i>			
Esquizofrènia i trastorn esquizoafectiu	681	1929	8p,13q,22q
Trastorn bipolar, esquizoafectiu i depressió unipolar	353	1228	13q,22q
<i>Lewis et al., 2003</i>			
Esquizofrènia i trastorn esquizoafectiu	1208	2945	2q 1q,3p,5q,6p,8p,11q,14p,22q
<i>Ng et al., 2008</i>			
Esquizofrènia i trastorns relacionats	3255	7413	2q,5q 1pq,2q,3q,4q,5q,8p,10q
<i>Holmans et al., 2009</i>			
Esquizofrènia	807	1900	8p21
(Esquizofrènia amb ancestre europeu)	(707)	(1615)	(8p21, 8q24, 9q34,12q24)

1.3.3.2 Estudis d'associació

Els estudis d'associació cerquen trobar una diferència significativa en la freqüència d'un determinat al·lel d'un marcador entre persones que comparteixen un fenotip en comparació amb una població que no el presenti. Comparats amb els estudis de lligament aquests tipus d'anàlisis tenen un major poder a l'hora de detectar al·lells amb un efecte de risc menor (Risch and Merikangas 1996). Entre els estudis d'associació s'hi troben els estudis anomenats de *cas-control* i els estudis d'associació familiar. En els estudis cas-control es comparen les freqüències al·lèliques, genotípiques o haplotípiques d'una sèrie d'individus afectes no relacionats contra una sèrie de controls. Aquests estudis es veuen afectats per fenòmens d'estratificació poblacional, que es produeixen quan casos i controls tenen diferents freqüències al·lèliques a causa de la diversitat en el bagatge genètic de la població a la que pertanyen, independentment de l'afectació per la malaltia. En canvi, els estudis familiars utilitzen nuclis familiars per comparar la proporció dels al·lells transmesos a la descendència afecta i no afecta respecta als no transmesos, mitjançant diversos tests com el (TDT, *transmission disequilibrium test* i FBAT *family based association study*) i no es veuen afectats per l'estratificació poblacional.

L'aproximació més comú en els estudis d'associació ha estat la d'analitzar gens funcionalment candidats, seleccionats perquè els seus productes poden tenir un efecte en la patofisiologia de l'esquizofrènia. En la literatura trobem centenars de treballs focalitzats en gens implicats en la fisiologia del sistema nerviós central i en les vies de neurotransmissió, amb nombroses dificultats, però, a l'hora de replicar associacions positives. També en aquests estudis s'apunta a la grandària de

la mostra com a responsable d'aquesta limitació. Molts pocs treballs inclouen més de 1000 individus i els resultats poc conclouents en els estudis de gens candidats poden reflectir un baix poder per detectar variants genètiques amb un efecte petit en la malaltia (amb *odds ratio* inferiors a 1,15). Una altra aproximació dels estudis d'associació ha estat la de prioritzar l'anàlisi de gens localitzats en regions descrites per estudis de lligament, aquesta estratègia ha donat certs fruits com es veurà més endavant en l'apartat de gens candidats.

Actualment és possible un nou abordatge en els estudis d'associació, que consisteix en la genotipació de centenars de milers de SNPs que cobreixen la major part de la variabilitat del genoma, són els anomenats estudis globals d'associació (GWAS, *Genome Wide Association Studies*). Tal i com hem vist anteriorment, aquestes estratègies són possibles gràcies al desenvolupament de plataformes de genotipació a gran escala i a la informació derivada pel projecte HapMap. Aquests tipus d'estudis tenen un elevat cost econòmic i requereixen genotipar grans nombres de mostres de pacients i controls per tal d'aconseguir suficient poder estadístic.

1.3.3.3 Gens candidats en l'esquizofrènia

Actualment, la quantitat d'informació generada a partir dels estudis genètics sobre esquizofrènia és enorme. Amb la finalitat de recollir tots aquests resultats publicats, es va crear la base de dades "Schizophrenia Forum" (<http://www.schizophreniaforum.org>) (Allen et al. 2008). En la seva última revisió (Maig de 2009) s'inclouen 1439 estudis, 7094 variants i 787 gens. Entre tots aquests gens candidats existeix una selecció de 30 gens anomenats "top results" que són els que es mostren en la Figura 1.17. Cal esmentar, però, que les "odds ratios" (ORs) al·lèliques d'aquests gens són en general molt modestes, entre 1.06-1.34, pels al·lèls de risc i entre 0.69-0.94 pels de protecció, a l'igual que en altres estudis genètics a gran escala de malalties complexes (Ioannidis et al. 2001; Lohmueller et al. 2003; Bertram et al. 2007), posant de relleu la necessitat d'augmentar considerablement la mida de la mostra per poder detectar o excloure gens candidats amb suficient seguretat.

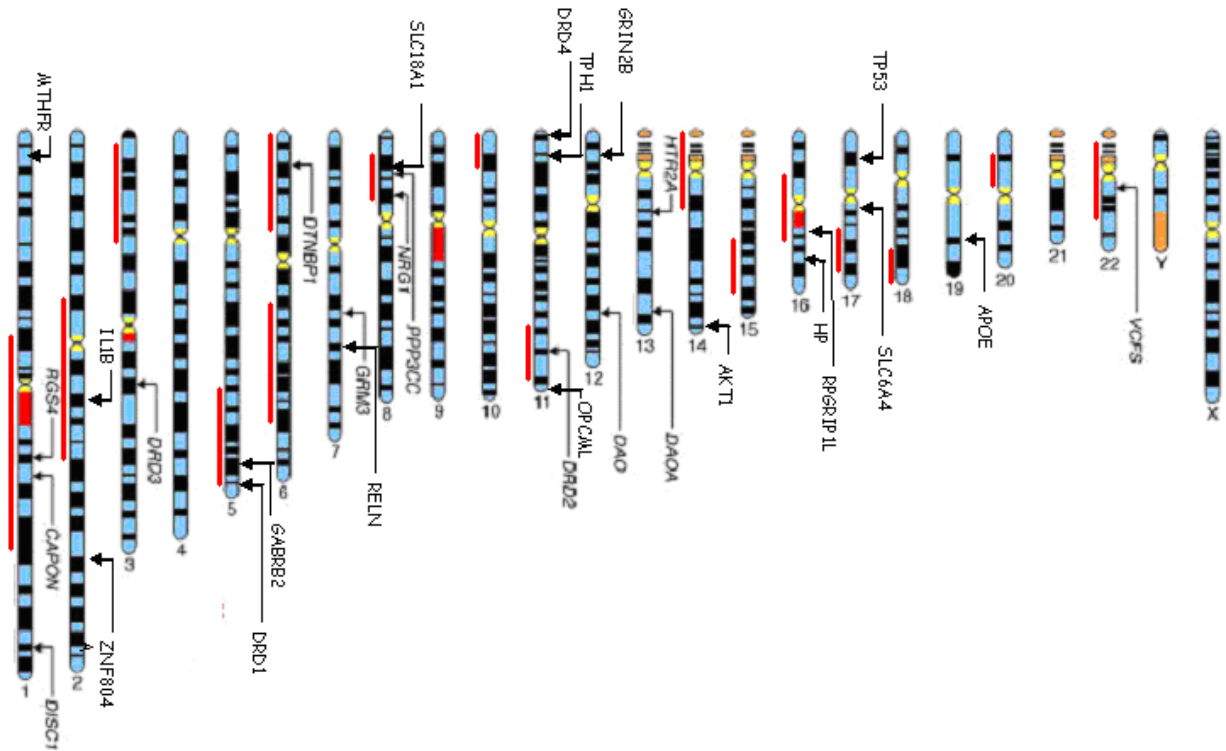


Figura 1.17: Ideograma de les principals regions i gens associats amb l'esquizofrènia. Localització de les potencials regions de lligament, indicades amb barres vermelles a l'esquerra dels cromosomes, i els gens amb resultats d'associació més prometedors. (Revisió de (Kirov et al. 2005), actualitzada amb la informació de la base de dades <http://www.schizophreniaforum.org/> - Updated 7 May 2009).

Malgrat que la inconsistència en la replicació dels resultats dels estudis genètics en el camp de l'esquizofrènia generi un raonable dubte sobre els veritables gens implicats en la malaltia, existeixen certs resultats més consistents que d'altres, com per exemple els que resulten de la combinació dels resultats obtinguts en estudis de lligament i d'associació: *NRG1* (*neuregulin 1*) localitzat en la regió 8p21-p22, *DTNBP1* (*Dysbindin*) a la regió 6p22-p24 i *DAOA* (D-amino oxidase activator) a la regió 13q32-34, (Straub et al. 1995; Wang et al. 1995; Craddock et al. 2005; Owen et al. 2005). Entre els 30 gens seleccionats en la base de dades "Schizophrenia Forum" destaquen també *TPH1* i *DRD2*, associats a la malaltia amb una $P < 0.001$. Aquests dos gens han estat identificats en mostres petites de pacients (473 i 879 casos respectivament), tot i així la seva funcionalitat els fa interessants candidats. El gen *TPH1* codifica per un dels dos enzims triptòfan hidroxilasa, els nivells d'aquest enzim limiten la síntesi de serotonina, un neurotransmissor diana de varis dels antipsicòtics de segona generació. La variant identificada en el receptor de la dopamina (*DRD2*), tot i ser un SNP sinònim (rs6277), sembla alterar l'estabilitat del mRNA i l'eficiència en la síntesi del receptor (Duan et al. 2003).

Darrerament, les estratègies de GWAS estan aportant fruits en la identificació de gens implicats en l'esquizofrènia. S'han publicat sis estudis de GWAS utilitzant diferents tipus de xips, tres d'ells s'han realitzat emprant mostres individuals i els altres tres emprant barreges (*pools*) de mostres. En el primer dels tres estudis, basat en genotips individuals (178 pacients i 144 controls), el resultat més significatiu ($p=3.7 \times 10^{-7}$) es va obtenir en una regió equidistant (350Kb) a dos gens: *colony stimulating factor 2 receptor alpha (CSF2RA)* i *short stature homeobox isoform b (SHOX)*. *CSF2RA* és una subunitat d'un receptor de citoquines que regula granulòcits i macròfags, mentre que el *SHOX* és un factor putatiu de transcripció absent en algunes persones de baixa estatura. La seqüenciació de *CSF2RA* i el seu gen veí, *interleukin 3 receptor alpha (IL3RA)*, en una cohort de casos independents i controls, va permetre la identificació de dos haplotips intrònics comuns i de diverses variants noves i rares (de tipus "missense") associades amb l'esquizofrènia (Lencz et al. 2007). En el segon estudi amb genotips individuals (Sullivan et al. 2008), la mostra era més gran (738 casos i 733 controls) però cap de les troballes va assolir la significació requerida per un estudi de genoma complet (Dudbridge and Gusnanto 2008). El darrer GWAS, basat en genotips individuals de 479 casos i 2937 controls del Regne Unit (O'Donovan et al. 2009), i amb un seguiment seqüencial dels 12 loci que presentaven el valor de p més baix ($P < 10^{-5}$) en una mostra de major tamany (6829 casos i 9897 controls d'Europa, Estats Units, Austràlia, Israel, Japó i Xina), va identificar un locus proper al gen *zinc finger protein 804A (ZNF804A)* amb una significació que augmentava al incloure pacients amb trastorn bipolar. El total de mostres genotipades en aquests tres GWAS resulta encara petit (1500 casos) i el poder per capturar petits efectes genètics és encara limitat.

Els altres tres GWAS publicats, van utilitzar barreges de DNAs de pacients i controls que van ser processats com un sol experiment (Mah et al. 2006; Kirov et al. 2008b; Shifman et al. 2008). Tots tres estudis descriuen troballes més interessants que consistents. De tots tres destaca l'estudi de Shifman et al. que és el que aporta evidències més significatives, d'una associació, específica en les dones, entre el gen *reelin (RELN)* i l'esquizofrènia. Aquesta associació seria compatible amb la hipòtesis que considera l'esquizofrènia com un trastorn del desenvolupament, ja que aquest gen està implicat en la corticogènesi i també amb una forma autosòmica recessiva de lisencefàlia (Hong et al. 2000).

1.3.4 CNVs associades amb l'esquizofrènia

L'anàlisi del cariotip va aportar els primers indicis d'anomalies cromosòmiques associades amb l'esquizofrènia (Bassett et al. 2000), en algunes famílies s'han identificat translocacions i/o delecions específiques que segreguen amb la malaltia, com per exemple la t(1;11)(q43;q21) (Millar et al. 2000), o la t(18;21)(p11.1;p11.1) (Smith et al. 1996). El clàssic exemple d'una alteració cromosòmica associada amb l'esquizofrènia fa referència a la microdeleció 22q11.2, on els problemes afectius i malalties psiquiàtriques greus apareixen en aproximadament el 30% dels pacients amb la SDG/VCF (Bassett et al. 2000).

Moltes de les CNVs caracteritzades en el genoma humà mostren un enriquiment en gens implicats en el desenvolupament del cervell (de Smith et al. 2007). Una proporció d'aquestes variants podrien estar contribuint a la susceptibilitat a trastorns neurològics i psiquiàtrics, com el desordre bipolar i l'esquizofrènia. Recentment l'aplicació de tecnologies de més resolució, com els *arrays*, en l'anàlisi de pacients amb esquizofrènia, està posant de relleu noves CNVs que podrien estar implicades en la malaltia. Un dels primers treballs va ser el publicat per Wilson i col·laboradors (Wilson et al. 2006) en què, mitjançant un *array* de BACs, van analitzar el DNA obtingut del cervell de 35 pacients amb esquizofrènia i 35 amb trastorn bipolar. Es van identificar quatre loci amb aberracions en el nombre de còpies, tant en els casos amb esquizofrènia com en els de trastorn bipolar, que no apareixien en controls. Aquests loci contenien gens (*EFNA5*, *GLUR7*, *CACNG2* i *AKAP5*) codificants per proteïnes amb funcions neuronals, implicats (els tres últims) en la via de senyalització del glutamat (Wilson et al. 2006). Un segon treball, utilitzant també la tècnica de microarrays, va descriure 35 CNVs identificades en 30 pacients amb esquizofrènia, essent les més freqüents un guany parcial a Xq23 (52%) i una pèrdua a 3q13.12 (32%) (Moon et al. 2006).

En el 2008 es van publicar noves evidències que implicaven diverses CNVs en l'etiologia de l'esquizofrènia. Kirov i col·laboradors van analitzar 93 individus amb esquizofrènia mitjançant BAC-*arrays* i van descriure 13 CNVs potencialment patogèniques, essent les més interessants una microduplicació *de novo* a 15q13.1 (que afecta els gens *APBA2*, *NDNL2* i *TJP1*), i una microdeleció a la regió 2p16.3 que inclou al promotor i el primer exó del gen de la Neurexina 1 (*NRXN1*), identificada en tres membres de la mateixa família amb diagnòstic d'esquizofrènia (Kirov et al. 2008a). En un altre treball, publicat per Friedman i col·laboradors, es

van identificar, en tres pacients independents amb esquizofrènia i epilèpsia, delecions genòmiques de diferents mides que incloïen el gen *CNTNAP2* (7q36.1), mentre que cap dels 512 controls estudiats mostrava aquesta variant estructural (Friedman et al. 2008). Recentment, Walsh i col·laboradors han aportat dades i reflexions interessants sobre la implicació que poden tenir aquestes CNVs rares en l'etiologia de l'esquizofrènia (Walsh et al. 2008). En l'anàlisi de 150 pacients i 260 controls mitjançant *arrays*, van identificar variants que delecionen o dupliquen gens en el 15% dels casos i només en el 5% dels controls, posant de relleu un excés de CNVs entre els individus amb esquizofrènia. Una altra observació aportada per aquest treball fa referència al tipus de gens afectats per aquestes CNVs: entre els 24 gens truncats per CNVs en pacients, s'observa una sobrerepresentació de gens implicats en vies importants del desenvolupament del cervell, com la senyalització de les neuroregulines, la senyalització ERK/MAPK o la potenciació sinàptica a llarg termini, (*ERBB4*, *MAG12*, *DLG2*, *PRKCD*, *PRKAG2*, *PTK2*, *CAVI*, *GRM7*, *SLC1A3*, *PTPRM* i *LAMA1*). A més a més, la majoria d'aquests gens havien estat prèviament vinculats amb l'esquizofrènia (Lewis and Gonzalez-Burgos 2006; Norton et al. 2006). Finalment, en els casos en què disposaven de mostra dels progenitors, van determinar que la majoria d'aquestes CNVs són heretades, suggerint que es tracta de variants estructurals amb una baixa penetrància, ja que el progenitor transmissor no exhibeix símptomes d'esquizofrènia. Aquesta última observació va en direcció oposada als resultats obtinguts per Xu i col·laboradors (2008), en què l'anàlisi de 359 pacients amb esquizofrènia va detectar 19 CNVs entre els casos esporàdics, de les quals 17 eren *de novo* i tres corresponien a microdelecions a 22q11.2. També van poder establir que la freqüència de CNVs *de novo* en casos esporàdics d'esquizofrènia se situa en un 10%, mentre que queda en un 1,3% en controls.

Finalment, dos treballs que han estudiat mostres de tamany considerable (1433 casos i 33250 controls, i 3391 casos i 3181 controls, respectivament), han descrit una associació entre diverses CNVs rares i l'esquizofrènia (2008; Stefansson et al. 2008). Ambdós estudis coincideixen en dos loci, una deleción a 1q21.1 (144.9-146.3Mb) i una deleción a 15q13.2 (28-31Mb), que mostren un fort efecte sobre el risc de patir esquizofrènia (ORs de 6,6-14,8 i 17,9-11,5 respectivament). La deleción 1q21.1 també ha estat associada amb altres fenotips, en concret s'ha observat en pacients amb microcefàlia, diverses anomalies congènites i del neurodesenvolupament, incloent retard mental, autisme i dèficit d'atenció i

hiperactivitat (Brunetti-Pierri et al. 2008; Mefford et al. 2008). Ambdues regions contenen múltiples gens candidats per a la malaltia; en concret, a la regió 15q13.2 s'hi localitza el gen del receptor nicotínic alfa 7 (*CHRNA7*), que ha estat implicat en l'esquizofrènia i el retard mental (Erdogan et al. 2007), i en estudis amb models de ratolí suggereix un paper en la memòria de treball (Fernandes et al. 2006). A més d'aquestes dues CNVs, Stefansson i col·laboradors (2008) també descriuen una deleció a 15q11.2 (20,3-20,7Mb) en 26 de 4178 casos (0,55%) i en 79 de 41.194 controls (0.19%) (OR de 2,73). Aquesta deleció, pròxima a l'extrem terminal de la deleció associada amb la síndrome d'Angelman i Prader-Willi, inclou el gen *CYFIP1* que interactua amb la proteïna FMRP (*fragile X mental retardation*) i amb la Rho GTPase Rac1, que està implicada en el desenvolupament i manteniment d'estructures neuronals.

Actualment, doncs, es van acumulant evidències que múltiples CNVs rares, generalment *de novo*, contribueixen a la component genètica de susceptibilitat per a l'esquizofrènia. Aquesta observació coincideix amb les troballes descrites en altres trastorns del neurodesenvolupament que inclouen l'autisme i el retard mental (de Vries et al. 2005; Jacquemont et al. 2006; Sebat et al. 2007; Stankiewicz and Beaudet 2007; Szatmari et al. 2007). Per altra banda, s'observa un cert solapament entre diverses de les CNVs identificades en pacients amb esquizofrènia i les associades a casos amb retard mental, autisme i trastorn de dèficit d'atenció (Mefford et al. 2008; Burbach and van der Zwaag 2009). Aquest fet reforça l'existència de mecanismes de pleiotropia, segons els quals múltiples malalties o símptomes associats podrien derivar d'una mutació en un mateix locus i on l'expressió fenotípica final vindria condicionada per la presència d'altres al·lels modificadors genètics i/o factors ambientals.

2. Objectius

El treball de recerca d'aquesta tesi té com objectiu general la **identificació de variants en nombre de còpia implicades en l'etiologia de la SDG/VCF i candidates per l'esquizofrènia, tret psiquiàtric més comunament associat a la síndrome**. Per tal d'assolir aquest coneixement s'han plantejat els objectius específics següents:

1. Determinació de la presència de la microdeleció 22q11.2, i la seva microduplicació recíproca, en dos grups de pacients:

- A) Pacients amb característiques fenotípiques de la SDG/VCF.
- B) Pacients adults amb diagnòstic d'esquizofrènia.

2. Identificació de noves CNVs implicades en l'etiopatogènia de dos grups de pacients sense anomalies en la regió 22q11.2

- A) Pacients amb fenotip de la SDG/VCF.
- B) Individus amb esquizofrènia i trets facials dismòrfics associats a la SDG/VCF

3. Estudi del nombre de còpia de gens candidats localitzats en CNVs en pacients amb esquizofrènia i en població no afecta.

3. Material i mètodes

3.1 Subjectes

Els subjectes d'estudi són:

Pacients amb fenotip de la síndrome DiGeorge/Velocardiofacial

Per l'anàlisi de FISH de la microdeleció i microduplicació de la regió 22q11.2 es van incloure tots els casos amb característiques clíniques de la SDG/VCF que havien estat derivats al laboratori de genètica de la CSPT (Corporació Sanitària Parc Taulí) en als darrers anys. Aquesta sèrie consta de 295 pacients i el seu fenotip es troba descrita en la publicació de l'estudi I-A. D'aquesta sèrie es van seleccionar 18 pacients amb trets clínics típics de la SDG/VCF sense alteració a la regió 22q11.2 per l'anàlisi d'*array*-CGH (estudi II-A).

Pacients amb esquizofrènia

El nostre grup ha estat desenvolupant en els darrers anys diferents projectes relacionats amb l'estudi genètic de l'esquizofrènia, emmarcat en la xarxa temàtica d'investigacions sanitàries: "Plataforma de genotipación para la identificación de factores genéticos implicados en la susceptibilidad y en la respuesta farmacológica de las enfermedades mentales" (RGPG) (2003-2006), (www.rgpg.net). Un dels objectius d'aquesta xarxa, que constava d'onze grups d'investigació de diferents llocs d'Espanya, era la creació d'un banc de mostres (DNA i línies cel·lulars) de malalts amb patologia psiquiàtrica, associat a una base de dades clíniques. Es van estandarditzar i consensuar protocols de treball amb criteris diagnòstics comuns i específics per cada patologia i es van uniformitzar els procediments de laboratori per l'extracció i conservació de mostres.

Durant els quatre anys de funcionament de la xarxa, en el grup de la CSPT juntament amb el de la CST (Consorci sanitari de Terrassa), es van reclutar mostres biològiques (sèrum, plasma, DNA i línies cel·lulars) de 234 pacients amb

Material i mètodes: Subjectes

esquizofrènia. Actualment es disposa d'un inventari exhaustiu de totes les mostres vinculades a la base de dades clínica comuna realitzada amb el programa Access on hi han recollides les següents variables: identificació de la mostra (nº pacient, grup, centre, entrevistador, data i lloc de l'entrevista); dades socio-demogràfiques (sexe, data de naixement, adoptat, situació laboral, lloc de naixement, ètnia i estat civil); dades clíniques (diagnòstics, malalties mèdiques associades, antecedents familiars, "S Paul life experience scale", consum de drogues i temptatives de suïcidi) i totes les variables específiques per esquizofrènia (Edimburgo, *Brief Psychiatric Rating Scale* - BPRS, *Positive and negative syndrome scale* - PANSS, tractament general, antipsicòtics i efectes secundaris).

Aquestes mostres es van utilitzar en els estudis següents:

En l'estudi I-B, anàlisi de la regió 22q11.2 mitjançant MLPA, es van incloure tots els pacients amb esquizofrènia recollits fins el moment (190 casos), on aproximadament el 70% eren homes i el 30% dones amb una mitjana d'edat de 46,52 anys \pm 17.08 DS.

En l'estudi II-B, anàlisi d'*array*-CGH, es van seleccionar de la sèrie anterior 11 individus amb esquizofrènia i trets dismòrfics associats a la SDG/VCF.

En l'estudi III, anàlisi per MLPA de 140 gens localitzats en CNVs, es van incloure 654 pacients amb esquizofrènia dels quals 196 casos eren del nostre banc de mostres i 458 procedien d'un altre grup de la xarxa: Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata, Reus.

Mostres d'individus control

Les mostres d'individus control, pertanyen al Centre de Regulació Genòmica de Barcelona, concretament del programa de Gens i Malalties del Centre de Regulació Genòmica (CRG) de Barcelona i en l'estudi III també s'inclouen mostres control procedents de l'Institut Universitari de Psiquiatria Pere Mata de Reus

3.2 Mètodes

En el desenvolupament dels objectius s'han utilitzat principalment tres tècniques diferents que ens han permès valorar guanys i pèrdues de material genòmic. La tècnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), la tècnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) i els *arrays* de CGH (*comparative genomic Hybridization*). Els materials i mètodes utilitzats en aquesta tesi estan recollits en cada un dels articles de l'apartat de resultats, tot i així a continuació es fa un resum de les tres tècniques.

3.2.1 Hibridació *in situ* Fluorescent (FISH)

La tècnica de FISH consisteix en una desnaturalització del DNA genòmic (cromosomes en metafase o nuclis interfàsics), i de la sonda (seqüència de DNA complementaria a la regió que volem interrogar i que està marcada amb un fluorocrom), seguida d'una posterior renaturalització del DNA. D'aquesta manera, quan és torna a formar la doble cadena de DNA, la sonda hibrida amb la seva regió homòloga o complementaria. El senyal fluorescent de la sonda s'analitza mitjançant un microscopi de fluorescència. La presència o absència de la regió del genoma en estudi vindrà determinada pel nombre de senyals observats. La resolució d'aquesta tècnica es veu determinada per la llargada de la sonda que s'utilitza i pel fet de què només s'analitza la regió que és complementaria a aquesta sonda.

Actualment gràcies a les llibreries de BACs, (*Bacterial Artificial Chromosome*) generades a partir del Projecte Genoma Humà, resulta relativament senzill dissenyar sondes complementaries a quasi qualsevol regió del genoma. Diverses cases comercials han llençat al mercat *kits* que contenen els reactius i sondes necessàries per l'anàlisi de la majoria de les microdeleccions i microduplicacions associades a malalties genòmiques conegudes. En aquesta tesi s'ha aplicat la tècnica de FISH en dues situacions diferents:

1- Per analitzar la regió 22q11.2 associada a la SDG/VCF, es va utilitzar el Kit comercial de Vysis (Abbot) que conté una barreja de dues sondes que corresponen a dos loci d'hibridació: la sonda de la regió 22q11.2 de 110Kb, marcada amb un fluorocrom d'espectre vermell, que hibrida a la regió 3' no codificant del gen TUPLE1(HIRA), i que inclou els següents loci: D22S553, D22S609 i D22S942; i una altre sonda marcada amb un fluorocrom d'espectre verd que hibrida amb la regió

terminal 22q13.3, aquest segon senyal serveix de control per identificar els cromosomes 22. El protocol seguit va ser el recomanat per la pròpia casa comercial.

2- Per validar els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi amb *arrays* de BACs. En aquest cas es van preparar les sondes en el laboratori a partir del marcatge directe dels BACs de la regió d'interès. Protocol recollit a l'annex II.

3.2.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La tècnica de MLPA va ser descrita el 2002 per Schouten i col·laboradors com una nova metodologia per analitzar guanys i pèrdues de fins a 40 regions diferents del genoma en una mateixa reacció (Schouten et al. 2002).

Aquesta tècnica s'ha aplicat en diferents treballs:

1- Per l'anàlisi de la regió 22q11.2, es va utilitzar un kit comercial de MRC-Holland, concretament la SALSA P023 MLPA-DiGeorge (estudi I-B), així com una barreja de sondes de disseny propi.

2- Per validar, replicar i analitzar les CNVs detectades en els anàlisis de microarrays, aplicats en l'estudi de pacients amb SDG/VCF i en pacients amb esquizofrènia (estudis II-A i II-B respectivament) es van utilitzar sondes de disseny propi.

3- Per analitzar 140 gens localitzats en regions descrites com a variables en el nombre de còpies en pacients amb esquizofrènia (estudi III). També es van emprar sondes de disseny propi.

Pel disseny i elaboració de les nostres pròpies sondes s'han seguit els següents passos:

Preparació i disseny de les sondes

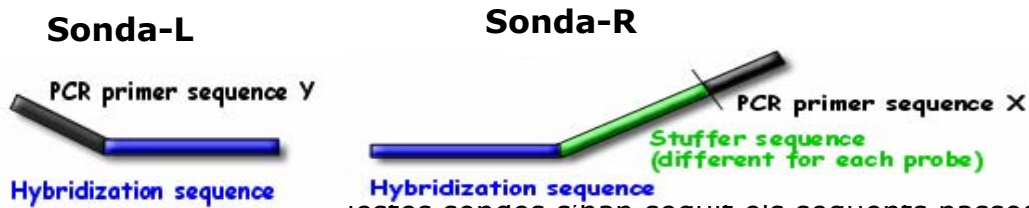
Per cada regió del genoma en què es vulguin analitzar guanys i pèrdues es dissenyen una parella de sondes, que anomenem sonda dreta i sonda esquerra.

La sonda esquerra (**sonda-L**) consta només de dues parts, la seqüència d'hibridació i la seqüència del *primer* comú (Y) en totes les sondes de MLPA; la sonda dreta (**sonda-R**) en canvi, és un oligonucleòtid sintètic que consta de tres parts:

A- **Hybridization sequence**: seqüència d'uns 21-30 nucleòtids d'unió específica a la regió del genoma que es vol analitzar.

B- **Stuffer sequence**: cua de nucleòtids de diferent llargada triats a l'atzar i no complementaris a cap regió del genoma.

C- **PCR primer sequence X**: seqüència de 20-30 nucleòtids que és comuna en totes les sondes del mateix experiment de MLPA.



Aquestes sondes s'han seguit els següents passos recollits en el protocol de MLPA de MRC Holland, Amsterdam.

(http://www.mrc-holland.com/pages/support_desing_synthetic_probespag.html)

1. Selecció d'uns 60 nucleòtids per cada gen o regió. La informació de la seqüència de DNA s'obté del "*Genome Browser of University of Santa Cruz, California-UCSC*" (<http://genome.ucsc.edu/>). Es divideix la seqüència de 60pb en dues parts amb 30 nucleòtids cada una. Aquestes dues seqüències corresponen a la regió d'hibridació de la sonda-L i la sonda-R
2. Cada una d'aquestes seqüències hibridants ha de ser homòloga únicament al gen o regió que es vol analitzar, evitant que hibridi en altres parts del genoma per assegurar l'especificitat de la tècnica. Per fer això s'utilitza la funció *Blast* per enfrontar les nostres seqüències contra l'assemblatge de la seqüència del genoma humà hg18 del UCSC.
3. Requisits que han de complir les seqüències hibridants de les sondes de MLPA:
 - La llargada ha de ser superior a 21 nucleòtids.
 - No hi pot haver més de 3 G i/o C adjacents al lloc de lligació entre els dos oligonucleòtids.
 - Els nucleòtids adjacents als extrems dels *primers* comuns X i Y no poden ser A ni T.
 - Es important evitar la presència de SNPs al llarg de la seqüència de les sondes però especialment en el punt de lligació.
 - Les seqüències hibridants han de tenir un contingut de G/C determinat:
 Sonda-L: 45-60%
 Sonda-R: 35-60%

Material i mètodes

- La temperatura de *melting* (Tm) de cada oligonucleòtid ha de ser >70°C. Si algun nucleòtid dels *primers* comuns de MLPA hibrida amb la seqüència diana, s'inclouen pel càlcul de la Tm, però no per a determinar la longitud de la sonda. Exemple: longitud de la seqüència hibridant:21+2.

(Per comprovar el % G/C y la Tm s'utilitza el programa *Raw probe* que es pot descarregar des de la web www.mlpa.com)

4. Quan ja es tenen dissenyades les seqüències hibridants cal introduir unes modificacions finals per acabar de completar les sondes de MLPA:

- La sonda-L ha d'estar fosforilada a l'extrem 5', per tal de facilitar la lligació.
- A la sonda-R s'hi ha d'afegir la cua de nucleòtids (*stuffer*) de diferent llargada, la qual ens permetrà diferenciar cada producte final amplificat.
- S'afegeix a cada sonda les seqüències X i Y complementaries als *primers* comuns de MLPA.

Sonda-L (per un producte FAM): 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' (19 pb)

Sonda-L (per un producte VIC): 5'- GGGTAGGGAATCCCTTGGA -3' (19 pb)

Sonda-L (per un producte NED): 5'- GGGAACCGTAGCACATGGA -3' (19 pb)

Sonda-R: 5'-TCT AGA TTG GAT CTT GCT GGC AC-3' (23 pb)

- **Primers universals o comuns de MLPA:** en el nostre laboratori es disposa d'aquests tres *primers* comuns diferents en funció del fluorocrom que porten.

MLPA-F: **FAM**-5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' (19 pb)

MLPA-F: **VIC**-5'- GGGTAGGGAATCCCTTGGA-3' (19 pb)

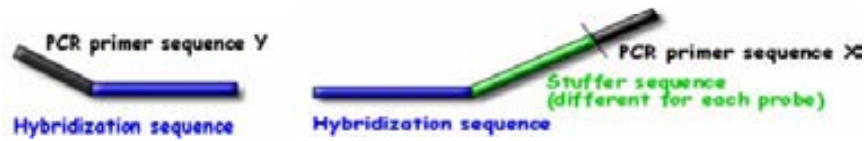
MLPA-F: **NED**-5'- GGGAACCGTAGCACATGGA-3' (19 pb)

MLPA-R: 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3' (23 pb)

Tots aquests passos en el disseny de sondes comporten molta feina i un consum considerable de temps per aconseguir trobar la seqüència adequada. Per tal de simplificar tot aquest treball, en el propi laboratori del CRG, es va desenvolupar un programa informàtic que ha agilitzat moltíssim aquesta part de la tècnica (http://davinci.crg.es/estivill_lab/mlpa/) (Pantano et al. 2008).

Un cop dissenyada la barreja de sondes, el funcionament de la tècnica es resumeix en l'esquema de la Figura 3.1. Totes les reaccions de MLPA s'han realitzat utilitzant els reactius de MRC-Holland i seguint un protocol propi però elaborat d'acord amb les recomenacions de MRC-Holland (Schouten et al. 2002), recollit en l'annex II.

1. Preparació de la barreja de sondes



2. Desnaturalització del DNA i Hibridació de totes les sondes



3. Lligació de les sondes hibridades



4. Amplificació per PCR de totes les sondes lligades



5. Separació per llargada i quantificació dels diferents productes amplificats

Figura 3.1: Esquema dels diferents passos de la tècnica de MLPA

Anàlisi de dades:

Per la realització dels càlculs, es pot treballar tant amb les alçades com amb les àrees dels pics. Nosaltres hem exportat les alçades dels pics del programa GeneMapper a una fulla excel, i per tal de normalitzar les alçades hem seguit els següents passos:

- Per cada mostra es calcula la suma de totes les alçades dels diferents pics i a continuació es divideix l'alçada de cada pic individual per la suma combinada de totes les alçades presents en la mostra, obtenint el valor x.

Material i mètodes

- Aquestes alçades normalitzades dels diferents pics són comparades amb els resultats obtinguts en totes les mostres. Es calcula la mitjana de les alçades dels diferents pics de cada sonda en particular per les diferents mostres, obtenint el valor y . Les alçades normalitzades dels pics es divideixen per aquesta mitjana obtinguda per cada sonda (x/y).

Al final de tots aquests càlculs, el producte resultant s'anomena quocient de dosi (*dosage quotient*, DQ). La deleció d'una còpia de la seqüència diana d'una sonda, generalment es fa aparent per una reducció de l'alçada relativa del pic associat al producte amplificat d'aquesta sonda en un 35-55% i un valor de DQ per sota de 0.60-0.65. Un guany de dues a tres còpies del genoma diploide en la seqüència diana, es fa aparent per un augment en l'alçada relativa del pic associat a aquesta sonda entre 30 i 55% i un valor DQ superior a 1,25-1.3. Aquest anàlisi també es pot realitzar visualment a partir dels perfils dels pics obtinguts amb el programa *GeneMapper* del seqüenciador (Figura 3.2)

Per últim es calcula la desviació estàndard de les alçades dels pics. Aquesta ha d'estar per sota del 10% i tots els resultats que difereixen més d'un 20% son descartats. Les mostres que donen moltes aberracions son inspeccionades i si es considera oportú s'eliminen les dades de la mostra dels càlculs. Les mostres que presenten pics molt baixos (<500) també són eliminades.

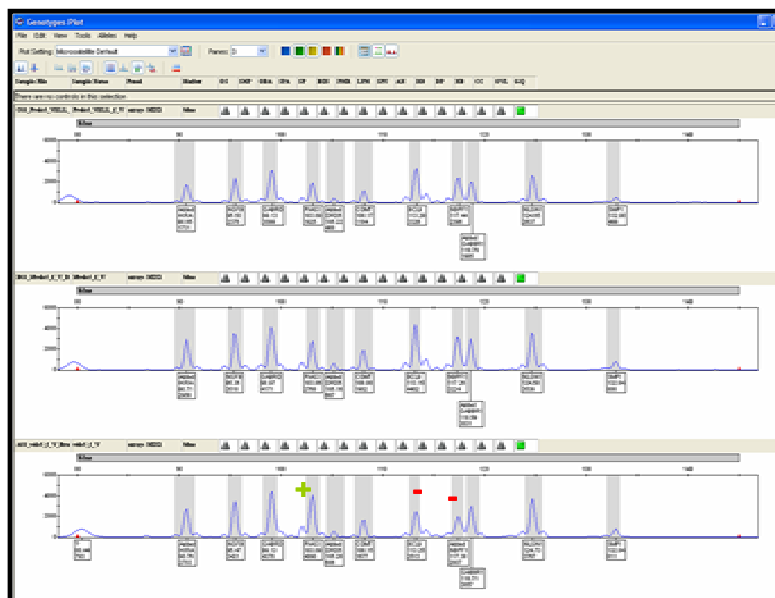


Figura 3.2: Gràfics (plots) en l'anàlisi de MLPA, d'una barreja de 10 sondes marcades amb el fluorocrom FAM. El primer i segon gràfic corresponen al pare i mare i l'últim al pacient amb una duplicació i deleció a la regió 1q21.1. En l'electroforograma del pacient la creu verda indica la sonda duplicada i les dues línies vermelles mostren les sondes delecionades. En aquest cas la tècnica de MLPA ens va permetre confirmar el reordenament observat mitjançant CGH-array i determinar que l'anomalia no era heretada.

3.2.3 Hibridació genòmica comparada en *array* (*array*-CGH)

Array de BACs

Per poder realitzar un extens anàlisi de les variacions en el nombre de còpies en tot el genoma s'ha emprat la tecnologia de la hibridació genòmica comparada aplicada sobre dos *arrays* de BACs. Concretament en els estudis II-A i II-B s'han utilitzat dos *arrays* elaborats a partir de clons de BACs de la llibreria de 32K CHORI (<http://bacpac.chori.org/home.htm>). La distribució dels BACs en l'*array* no és homogènia, la distància mitjana entre clons consecutius varia des de 0,5Mb fins un màxim de 1,2Mb. L'amplificació dels BACs es va realitzar per DOP-PCR com va descriure (Fiegler et al. 2003), i es van dipositar en un vidre Corning UltraGaps amb 50% de DMSO i per triplicat.

- Array específic pel cromosoma 22: Conté 363 clons de BACs que cobreix tot el cromosoma 22 amb una resolució de 40-70Kb.
- Array de 5,6K: Anomenat HSBA (Hot-Spot-BAC-Array), conté 5442 clons-BACs amb una densitat mitjana de 0,9Mb, una cobertura aproximada del 23% del genoma eucromàtic i una major densitat de clons en les regions més candidates a partir reorganitzacions, com són les que es troben localitzades entre duplicacions segmentaries i en els telòmers (Cusco et al. 2008).

Aquests dos *arrays* de BACs es van utilitzar en una hibridació que hem anomenat "face to face". Com es recull en el treball derivat de l'estudi II-A, aquesta hibridació consisteix bàsicament en substituir el cobreobjectes per un altre *array*. S'enfronten així, cara a cara i en la mateixa cambra d'hibridació, els dos *arrays* i es dispensa entre mig la mostra de DNA que volem hibridar. Amb aquesta metodologia es va hibridar primer una mostra amb la microdeleció 22q11.2 prèviament detectada per FISH. L'anàlisi d'aquesta mostra va posar de relleu la microdeleció de 3Mb més comú en la SDG/VCF en ambdós xips, avalant la metodologia i *arrays* utilitzats. A continuació es van hibridar 18 pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF (estudi II-A) i 11 pacients amb esquizofrènia i trets dismòrfics (estudi II-B). Per la hibridació de cada mostra es va valorar la qualitat del DNA mitjançant un gel d'agarosa al 1,3% i una tinció amb SyberGreen. Es van marcar 400ng de DNAs amb Cy5-dCTP i Cy3-dCTP i es van hibridar en dos experiments el

Material i mètodes

directa i el invers (dye-swap), com s'indica a la Figura 3.3, contra una barreja de DNAs del mateix sexe (50 dones o 50 homes). Les hibridacions es van realitzar com descriu (Wang et al. 2004), utilitzant dextrà sulfat i formamida com a solució d'hibridació.

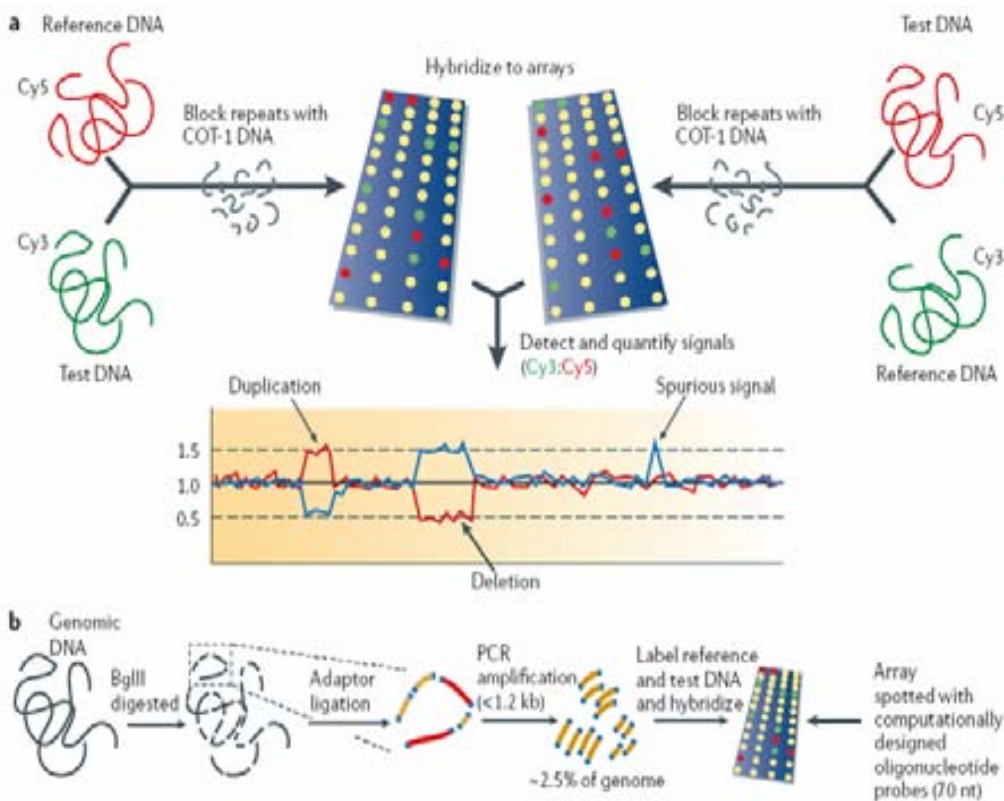


Figura 3.3: Esquema de la tècnica de array-CGH

a) Marcatge de la mostra problema (*test DNA*) i la mostra control (*reference DNA*), amb Cy5-dCTP i Cy3-dCTP respectivament, es posen en contacte amb l'array, on hibridarant en aquelles posicions en què es complementin amb les sondes. Aquest marcatge es realitza també a l'inversa per tal de minimitzar els falsos resultats. El patró d'hibridació és revelat utilitzant diverses tecnologies (CCD, escàner) que mesuren el nivell de cada fluorocrom en cada posició. La imatge resultant es converteix en valors numèrics que constitueixen els resultats de l'assaig. b) L'array o xip s'elabora a partir de dipositar el material genètic sobre un suport sòlid miniaturitzat en posicions conegudes i controlades. Els microarrays poden incorporar entre 400-60.000 sondes d'oligonucleòtids, cDNA o altres macromolècules.

Arrays comercials

En l'estudi III per validar i acotar la llargada d'algunes de les CNVs identificades mitjançant MLPA, es van utilitzar diversos arrays comercials. Els arrays d'oligonucleòtids d'Agilent (Human Genome CGH 44K i 244K) i el SNP-array d'Illumina (Illumina 370Duo). L'array d'Agilent de 44K (G4413A) consta de 43.000 seqüències del genoma humà codificants i no codificants amb una resolució mitjana de 43Kb entre sondes, mentre que el de 244K (G4411B) inclou 236.000 seqüències

amb una mitjana de 8,9Kb entre sonda i sonda. Per els anàlisis amb SNP-*array* es va utilitzar l'*array* comercial d'illumina (HumanCNV370-DNA Analysis BeadChip). Aquest *array* permet interrogar més de 380.000 marcadors, incloent a més de 320.000 tag SNPs uniformament distribuïts, i ofereix una àmplia cobertura dels SNPs descrits en el projecte HapMap. A més a més inclou 55.000 marcadors especialment dissenyats per cobrir 11.000 regions variables en nombre de còpies. Les hibridacions amb l'aquests *arrays* es van realitzar en el servei del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) de Barcelona (www.cegen.org). Es van hibridar 2µg de DNA genòmic seguint les recomanacions del fabricant de l'assaig Infinium. Posteriorment es va aplicar l'algoritme PennCNV (Wang et al. 2007) per identificar les CNVs a partir de les dades de genotipació de SNPs.

Anàlisi de dades

En totes les hibridacions d'*array*-CGH, les imatges es van obtenir amb l'escàner Agilent Microarray (G2565BA) (Agilent Inc., Palo Alto, CA). Les dades brutes dels arrays es van extreure amb el programa Genepix Pro 6.0 (Axon, Inc.) utilitzant les opcions per defecte d'identificació de *spots* o punts irregulars. Es van normalitzar els log₂ ratios entre la mostra problema i la barreja de DNAs referència mitjançant el mètode "*print tip loess*". Per tal de detectar desequilibris de matèria genòmica es va utilitzar el llindar simple. En el cas dels arrays de BACs, aquells clons amb valors, en les tres rèpliques, per sobre i per sota de 0.2 en ambdues hibridacions (directa i indirecta) es van considerar com a guanys (>0.2) o pèrdues (<-0.2). En els arrays d'oligonuclòtids es va considerar com a potencial CNV, aquella regió amb 3-5 sondes consecutives amb valors per sobre o per sota de 0.3 en ambdues hibridacions (directa i indirecta), el què representa una resolució mitjana de 1/100kb (Ylstra et al. 2006).

4. Resultats

Els resultats d'aquesta tesi s'han estructurat en cinc treballs, separats en tres estudis que cobreixen els tres objectius plantejats. Cada treball està precedit d'un breu resum què en detalla les troballes més rellevants.

Estudi I

El primer apartat fa referència als estudis de determinació de la presència de la microdeleció 22q11.2 i la microduplicació recíproca en pacients amb característiques clíniques de SDG/VCF i en pacients amb esquizofrènia. Aquest bloc consta de dos treballs publicats, que formen part del compendi de publicacions d'aquesta tesi, i es presenten en aquesta secció en el seu format d'article original.

A- Publicació 1: Microdeletion and Microduplication 22q11.2 screening in 295 Patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome.
American Journal of Medical Genetics Part A 140A:2426-2432 (2006)

B- Publicació 2: Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangements among patients with schizophrenia.
Behavioral and Brain Functions Feb19; 4:10 (2008)

Estudi II

El segon apartat recull els resultats obtinguts en la identificació de noves CNVs implicades en l'etiopatogènia de pacients amb trets clínics de la SDG/VCF i d'individus amb esquizofrènia, sense anomalies a la regió 22q11.2. Aquest apartat està format per dos treballs, el primer està en procés de revisió en revistes científiques i es presenta en aquesta secció en el seu format d'article original; i del segon es descriuen els resultats obtinguts en format explicatiu.

A- BAC array CGH in patients with VCFS-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *En revisió a BMC Med Genet* (Sotmeses les segones esmenes proposades pels revisors el 2-Setembre-2009)

B- Identificació d'una microduplicació a 15q13.1 mitjançant array-CGH en pacients amb trets dismòrfics i esquizofrènia.

Estudi III

En el tercer i últim apartat, es presenta un resum dels resultats obtinguts en l'anàlisi de 140 gens, localitzats en CNVs previament descrites a la base de dades Database of Genomic Variants (DGV-<http://projects.tcag.ca/variation>), en pacients amb esquizofrènia i en població control. La publicació derivada d'aquest treball, degut a la seva recent acceptació, no es va poder incloure dins el compendi de publicacions d'aquesta tesi i, per tant, no ha estat aprovada per la subcomissió de Postgrau com a part fonamental d'aquesta tesi. Per aquest motiu es troba inclosa en l'annex I, tal i com disposa l'escola de postgrau de la UAB.

Estudi I-A

Publicació 1:

Microdeletion and Microduplication 22q11.2 Screening in 295 Patients With Clinical Features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome

Anna Brunet, Elisabeth Gabau, Rosa Maria Perich, Laura Valdesoiro,
Carme Brun, Maria Rosa Caballín, Miriam Guitart.

American Journal of Medical Genetics Part A 2006; 140A: 2426–2432

La SDG/VCF, associada a la microdeleció 22q11.2, engloba un ampli ventall de característiques clíniques. Actualment s'inclouen més de 180 trets fenotípics, però cap és present en el 100% dels casos i no existeix cap pacient que presenti tots els trets fenotípics associats a la síndrome. Tot i així existeixen certes característiques clíniques freqüents que inclouen els defectes cardíacs, trets facials característics, hipoplàsia del timus, anomalies al paladar, hipoparatiroidisme, dificultats d'aprenentatge i desordres psiquiàtrics.

Recentment (2003), s'ha descrit la síndrome de la microduplicació 22q11.2, causada per la duplicació recíproca a la microdeleció associada a la SDG/VCF. En el moment de plantejar-nos aquest treball, tot just s'havien descrit a la literatura els primers pacients amb aquesta microduplicació i diverses de les característiques clíniques d'aquests pacients solapaven amb les de la SDG/VCF.

El treball presentat recull l'anàlisi de 295 pacients derivats al laboratori de genètica de la Corporació Sanitària Parc Taulí per a l'anàlisi de la microdeleció 22q11.2. Aquests pacients provenien de diferents serveis de l'hospital incloent cardiologia, atenció precoç o genètica clínica i, per tant, la sèrie engloba casos amb característiques clíniques molt diverses, però amb el denominador comú de sospita diagnòstica de SDG/VCF. Mitjançant la tècnica de FISH es van identificar 12 pacients amb la microdeleció 22q11.2, i es va descartar la presència de la microduplicació recíproca a partir de l'anàlisi de 150 nuclis en cada pacient. Aquest treball descriu les característiques clíniques dels 12 pacients amb la microdeleció 22q11.2 i els compara amb la resta de pacients sense l'alteració, alhora que suggereix que entre els pacients amb trets clínics de SDG/VCF la microduplicació recíproca és rara.

Microdeletion and Microduplication 22q11.2 Screening in 295 Patients With Clinical Features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome

Anna Brunet,^{1,2*} Elisabeth Gabau,¹ Rosa Maria Perich,¹ Laura Valdesoiro,¹ Carme Brun,² Maria Rosa Caballín,³ and Miriam Guitart¹

¹Laboratori de Genètica, UDIAT-Centre Diagnòstic, Servei de Pediatria, Fundació Parc Taulí Institut Universitari UAB, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Spain

²Facultat de Psicologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

³Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

Received 22 February 2006; Accepted 11 August 2006

The 22q11.2 region is susceptible to chromosomal rearrangements, leading to various types of congenital malformation and mental retardation. The most common anomaly is 22q11.2 microdeletion, associated with DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (DG/VCFS). Recently the microduplication 22q11.2 syndrome has been identified. Some clinical features in patients with this new chromosomal disorder present a substantial overlap with DG/VCFS. The aim of this hospital-based study was to evaluate the incidence of deletions and duplications on 22q11.2 in patients with DG/VCFS features. We investigated a group of 295 patients with widely variable manifestations associated with DG/VCFS. Along with the clinical diagnoses different anomalies were noted such as conotruncal cardiac anomaly, velopharyngeal insufficiency, characteristic facial dysmorphic features, language impairment, developmental delay/learning difficulties, and immunologic anomalies or thymic hypoplasia.

Laboratory studies included conventional cytogenetic and FISH testing. Metaphase and interphase cells were analyzed for the presence of 22q11.2 microdeletion or microduplication. There were 12 patients who carried 22q11.2 microdeletion and no microduplication in the region was identified. Other chromosomal anomalies were reported in five patients with an overlapped DG/VCFS phenotype. All patients with 22q11.2 microdeletion showed a characteristic phenotype of DG/VCFS. We did not identify 22q11.2 microduplication, suggesting that this is a rare event in patients with DG/VCFS features. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: DiGeorge syndrome; velocardiofacial syndrome; 22q11.2 microdeletion; microduplication; interphase; FISH; genomic disorder; chromosome 22

How to cite this article: Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballín MR, Guitart M. 2006. Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet Part A* 140A:2426–2432.

INTRODUCTION

Several genetic disorders have been shown to arise by small deletion or duplication of a common DNA region in most affected individuals. The 22q11.2 microdeletion, associated with DG/VCFS, is one of the most common human genetic microdeletion syndrome, affecting 1 in 4000 to 1 in 6000 live births [McDermid and Morrow, 2002; Botto et al., 2003]. The main clinical characteristics of DG/VCFS include conotruncal heart defects, characteristic facies, velopharyngeal insufficiency or cleft palate, immunologic anomalies, and behavioral manifestations such as learning disabilities, attention deficit disorder, and psychiatric illness. However there is a wide variability in the clinical presentation and over 180

anomalies (www.vcfsef.org) have been delineated in this syndrome, occurring in many combinations and with widely differing severity [Ryan et al., 1997; Cohen et al., 1999; Perez and Sullivan, 2002; Robin and Shprintzen, 2005].

Grant sponsor: Fundació Parc Taulí Institut Universitari, Genetics Laboratory, UDIAT-CD, Corporació Sanitària Parc Taulí; Grant sponsor: FIS: Fondo de investigaciones Sanitarias; Grant number: G03/184.

*Correspondence to: Anna Brunet, Genetics Laboratory Corporació Sanitària Parc Taulí, Parc Taulí, s/n 08208 Sabadell, Barcelona, Spain. E-mail: abrunetv@cspt.es

DOI 10.1002/ajmg.a.31499

Recently a new chromosomal disorder has been defined in this region, the "microduplication 22q11 syndrome." Description of 35 cases (21 unrelated) with this genetic aberration showed a considerable overlap of certain clinical characteristics with DG/VCFS. [Ensenauer et al., 2003; Hassed et al., 2004; Portnoi et al., 2005; Yobb et al., 2005].

Copies of chromosome 22-specific DNA low-copy repeats (LCR22s) sequences have been identified at or near the end-points of these rearrangements on 22q11.2. Molecular studies have recognized these LCR22s as mediators of nonallelic homologous recombination that result in rearrangements of this region on chromosome 22q [Baumer et al., 1998; McTaggart et al., 1998; Edelmann et al., 1999a; McDermid and Morrow, 2002]. In theory as a result of these rearrangements both deletion and duplication events should occur in equal proportions. Surprisingly, carriers of microduplication 22q11.2 are rarely reported. Some authors suggest that probably the microduplication 22q11.2 may be largely undetected. Ensenauer et al. [2003], Hassed et al. [2004], and Portnoi et al. [2005] suggested that microduplications of 22q11.2 may be relatively common and have probably been underdiagnosed in routine metaphase analyses. They recommended scanning of interphase nuclei in any individual with clinical features of DG/VCFS and without 22q11.2 deletion.

This hospital-based study evaluates the hypothesis that 22q11.2 microduplication may be relatively common in patients with clinical features of DG/VCFS and probably have been underdiagnosed in routine metaphase analyses. We included 295 consecutive children and adolescents referred for cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) testing with DG/VCFS features. In all cases interphase nuclei were scored to look for 22q11.2 microdeletion and microduplication simultaneously.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

This hospital-based study included 295 patients referred to rule out 22q11.2 microdeletion with widely variable manifestations associated with DG/VCFS. Patients come from different pediatric specialists (cardiology, neurology, neonatology, and clinical genetic services). They were examined by medical doctors with wide experience in treating DG/VCFS. Detailed clinical data were recorded following a specific clinical protocol for DG/VCFS and was only available from 96 patients. All of them showed an appearance of DG/VCFS; 78 (81%) have two or more of the following clinical findings: conotruncal cardiac anomaly, cleft palate, velopharyngeal insufficiency, characteristic facial dysmorphic features, developmental delay/learning difficulties,

and immunologic anomalies or thymic hypoplasia. This approach is in accordance to Tobias et al. [1999], which also consider that a patient presents a DG/VCFS phenotype when two or more of these findings are present.

Cytogenetic and FISH Procedures

Laboratory studies of all patients included G-banding karyotype at the level of 550 bands, and FISH analysis in metaphase and interphase cells, for the presence of 22q11.2 microdeletion or microduplication.

For FISH analysis Vysis LSI DiGeorge/VCFS Region Dual Color Probe were used following the manufacture's instructions. The mixture contains the SpectrumOrange *TUPLE1* (*HIRA*) probe at 22q11.2 and the SpectrumGreen LSI *ARSA* gene control probe at 22q13.3. For each patient, 150 interphase and 15 metaphase cells were analyzed. Nuclei were only scored when equal size and intensity of signals were observed. To establish the normal cutoff value of 7.8% for microdeletions and 9% for microduplications 150 interphase cells from 10 unaffected individuals were analyzed.

Positive control lymphoblastoid cell line, with known 22q11.2 microduplication, was received from Dr. McDermid of the department of Biological Sciences, University of Alberta. FISH analysis on interphase nuclei and metaphase cells of this control sample was carried out blindly. We showed three *TUPLE1* (orange) signals, compared with two *ARSA* (green) signals in 80% of 150 interphases analyzed and also on metaphases the *TUPLE1* signal on one chromosome 22 was subjectively larger and brilliant in 70% of 20 analyzed cells (Fig. 1).

Analysis of interphase cells is required to detect 22q11.2 microduplications and it may also be useful to diagnose a mosaicism for 22q11.2 chromosome microdeletion or microduplication, though few reports of individuals with 22q11.2 deletion mosaicism have been published to date [Conseville et al., 1996; Hatchwell et al., 1998; Chen et al., 2004].

RESULTS

FISH and Cytogenetic Analysis

Among the 295 patients with clinical features associated with DG/VCFS and referred for cytogenetic and FISH testing, 12 (4%) had the 22q11.2 microdeletion and 5 (1.7%) were found to have other karyotypic anomalies. No microduplication of this region was identified in these patients. Family analyses showed the 22q11.2 deletion in the mother of one patient.

Among the five cases with chromosome rearrangements, three were the de novo 47,XXY; 47,XX,del(13)(q32),+dup(13)(q32); 46,XX/47,XX+21 and

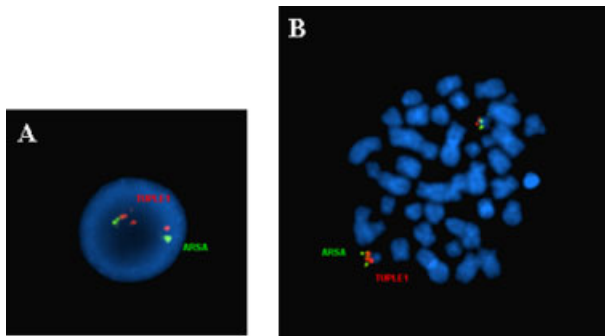


FIG. 1. **A:** Interphase cell from the positive control with microduplication 22q11.2 showing duplication of TUPLE1 (three red signals) and two control probe ARSA signals (green). **B:** Metaphase cell from the control sample, showing a larger and more brilliant signal of TUPLE1 (red) on one chromosome 22 compared with the normal one. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

two were inherited 46,XY,t(10;14)(q24.3;q32.3)mat; 46,XY,inv(12)(p11.1q12.3)pat.

Phenotype

The principal clinical features of 96 patients with available clinical data and the number of cases with and without 22q11.2 microdeletion are shown in Table I.

In this hospital-based series most of the patients come from child neurology service, therefore there are a high incidence of cases with development delay and learning difficulties. Also dysmorphic features are frequent and the facial phenotype is quite similar in patients with and without microdeletion (Fig. 2).

Careful evaluation of patients with FISH testing negative, showed that all of them have some of the main clinical signs associated with DG/VCFS and several other phenotypic manifestations were present, including feeding difficulty, failure to thrive, and nasal vomiting in infancy, speech and language difficulties (severe hypernasality, articulation, and language impairment), mild growth deficiency and skeletal abnormalities (scoliosis, flat foot arches).

The clinical features of patients with 22q11.2 microdeletion had recently been re-examined and are recorded in Table II. All patients, diagnosed between the ages of 1 month and 15 years showed velopharyngeal insufficiency (nasal regurgitation and hypernasality) and facial dysmorphic features. In the follow-up also immunologic anomalies were

present in 100% of our patients with 22q11.2 microdeletion, the most frequent abnormalities seen were T-cell deficiency in all patients, frequent infections (pneumonia, bronchitis, otitis, pharyngitis, and tonsillitis) in five cases and six patients have increased B-cell numbers. Furthermore, all patients showed additional clinical findings associated with this disorder such as language and articulation speech impairment, motor delay, behavior disorders, skeletal and renal abnormalities, and short stature.

The mother with 22q11.2 microdeletion presented mild facial anomalies, hypernasal speech, nasal regurgitation, and learning difficulties at school age.

The clinical characteristics of the five patients with other abnormal karyotypes were recorded in Table III.

DISCUSSION

In our series of 295 patients with widely variable manifestations of DG/VCFS, 12 patients carried the microdeletion, and no microduplication of 22q11.2 was found. The studies showed other chromosomal abnormalities in five patients studied because of the possibility of DG/VCFS. These cases showed different phenotypic abnormalities like congenital heart malformation, developmental delay and learning difficulties, language impairment, and facial dysmorphic features that overlap with DG/VCFS. In the literature other chromosomal anomalies have been associated with DG/VCFS phenotype [Ravnan et al., 1996; Tsai et al., 1999; Kitsiou-Tzeli et al., 2004]. These findings stress the importance of performing cytogenetic analysis in these patients.

Certain phenotypic features associated with DG/VCFS have been defined during the last 10 years and there is now a better appreciation of which patients are at risk of having the deletion. Although this existing knowledge base is useful, cases with minimal phenotypic findings are known to occur and testing for 22q11.2 microdeletion still remains a matter for debate. For this reason some studies could be ordered without sufficient clinical manifestations. A careful evaluation of our 96 patients with available clinical data showed in most of them the phenotypic spectrum associated with DG/VCFS, but some other cases of this large hospital-based series could be ordered without enough clinical manifestations. This

TABLE I. Main Clinical Findings in 96 Patients With Available Clinical Data

	Heart defect	Velopharyngeal insufficiency	Facial dysmorphic features	Developmental delay / learning difficulties*	Recurrent infections or thymic hypoplasia
Without deletion	42/84	24/84	56/84	60/76	41/84
With deletion	9/12	12/12	12/12	8/9	5/12

*This feature was evaluated only in patients older than 1 year.

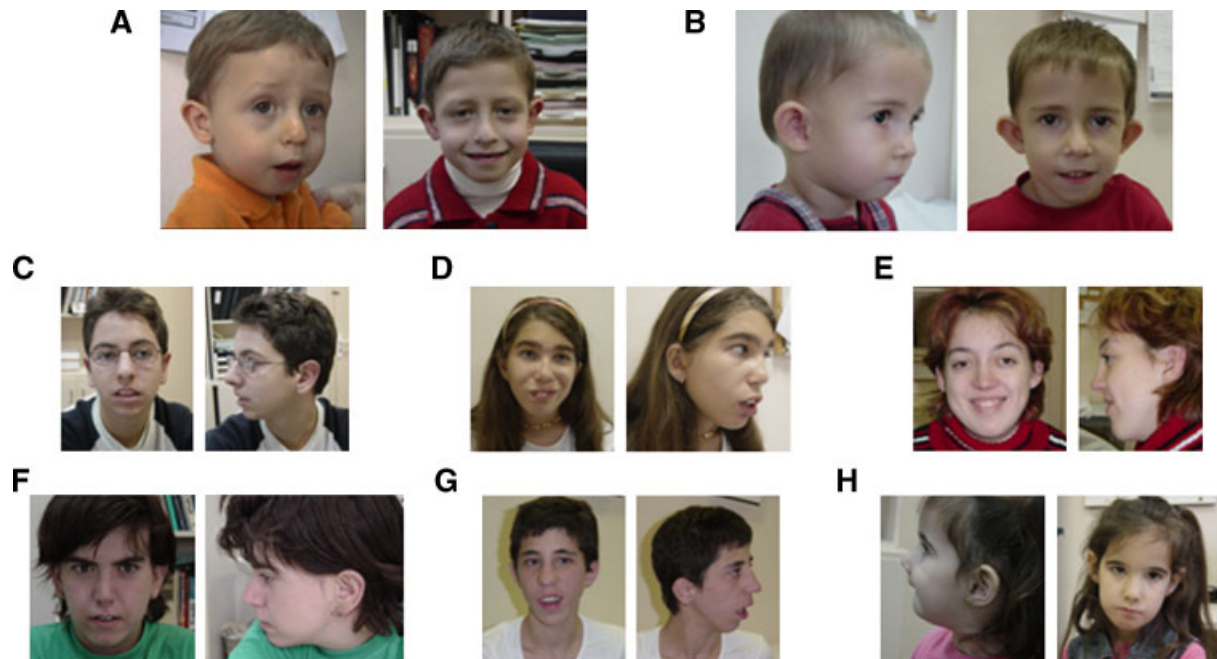


FIG. 2. **A,B:** Photographs of two patients with 22q11.2 microdeletion. For other clinical characteristics see Table II. A: Patient 1, at 2 years with retrognathia and puffy upper eyelids; at 6 years showed hooded eyelids and suborbital congestion, protuberant ears, and dimple in the nasal tip. B: Patient 6 at 2 years with retrognathia and at 4 years with protuberant ears, bulbous nasal tip. **C–H:** Photographs of six patients with FISH testing negative. C: Patient at 14 years, with long face, prominent nasal root with bulbous tip, and retrognathia. D: Patient at 14 years, have long face, puffy eyelids with narrow palpebral fissures, bulbous nasal tip, and retrognathia. Not shown: cognitive deficit. E: Patient, at present 20 years old, with hooded eyelids, small ears. Not shown: cleft palate, short stature, and cognitive deficit. F: Patient at 18 years, with long face, narrow palpebral fissures, prominent nasal root and narrow alar base, and retrognathia. Not shown: short stature, psychiatric disorder, and cognitive deficit. G: Patient at 16 years, with long face and hypotonic, narrow palpebral fissures, bulbous nasal tip, and retrognathia. Not shown: cognitive deficit and congenital dislocation of the hip. H: Patient at 3 years, with hooded eyelids, protuberant ears, squared and prominent nasal root, retrognathia; and at 5 years long face. Not shown: cleft palate. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

could explain the low incidence of microdeletion 22q11.2.

In this study, as in other studies [Goldberg et al., 1993; Wilson and Scambler, 1995; Ryan et al., 1997], all patients with 22q11.2 microdeletion showed the more common manifestations associated with DG/VCFS. We wish to emphasize the clinical features that were present in 100% of our patients: dysmorphic facial features and velopharyngeal insufficiency. Furthermore, secondary clinical findings associated with DG/VCFS like motor delay, short stature or skeletal abnormalities (scoliosis, flat feet) were frequently recorded in patients with deletion. These findings suggest that cases with a single, consistent feature are rare, and a careful clinical examination searching for additional associated features would help clinicians to select patients in whom 22q11.2 microdeletion should be considered. Schizophrenia was observed in the oldest patient, a 15-year-old girl, corroborating previous reports which found psychiatric disorders to be common in patients with 22q11.2 deletion [Swillen et al., 2000; Murphy, 2002].

In recent studies, some patients with clinical diagnosis of DG/VCFS who were referred in order to exclude 22q11.2 microdeletion revealed microduplication in this region [Ensenauer et al., 2003; Hased et al., 2004]. The clinical phenotype

of 22q11.2 microduplication syndrome, described in different reports, appears variable [Ensenauer et al., 2003; Hased et al., 2004; Portnoi et al., 2005; Yobb et al., 2005], ranging from mild learning disabilities as the only symptom, to congenital malformations leading to early death. There is a considerable overlap in clinical presentation between microdeletion/microduplication syndromes, such as dysmorphic features, cardiovascular anomalies, palatal clefting or velopharyngeal insufficiency, cognitive deficits, and growth deficiency; these conditions were present in the patients of our series. The only distinctive characteristics of microduplication phenotype were certain manifestations in the eyes: superior placement of eyebrows and down-slanting palpebral fissures [Ensenauer et al., 2003; Portnoi et al., 2005], which were not specifically selected for in our clinical protocol.

Meiotic inter- or intra-chromosomal nonallelic homologous recombination events between LCR22s might generate the common 22q11.2 microdeletion and the reciprocal interstitial microduplication. Therefore one would expect that the microduplication of these region would be present with equal frequency to the 22q11.2 microdeletion. Some authors suggest that the microduplication of 22q11.2 may be largely undetected. These could be

TABLE II. Clinical Features of Patients With 22q11.2 Microdeletion

Patient	1	2	3	4	5 ^a	6	7	8	9	10	11 ^b	12
Age at diagnosis	2 years	9 years	7 years	15 years	1 month	2 years	12 years	1 month	6 year	2 months	2 months	2.5 months
Actual age	7 years	14 years	11 years	18 years	exitus 3 years	3 years	14 years	2 years	7 years	10 months	9 months	1 years
Sex	M	M	M	F	F	M	M	F	F	F	F	M
Heart defect	VSD RAA	BAV	SCA RAA	SCA	PA VSDp RAA	-	SCA	VSDp BAV ASD	-	VSD	-	Mild PS PFO
Facial dysmorphic features												
Round face-parietal prominence/long face	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Mild micro-/retrognathia	+	+	-	+/-	+	+	+	+	-	-	+	+
Minor ear anomalies	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Prominent nasal root/bublos nasal tip	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Velopharyngeal insufficiency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Severe hypermasality	-	+	-	+	+ ^d	-	-	-	+	NA	NA	-
Language impairment	+	+	+	+	+ ^d	+	+	+ ^d	+	NA	NA	NA
Articulation speech impairment	+	+	+	+	+	+	-	+ ^d	+	NA	NA	NA
Motor delay	+	-	+	-	+ ^d	+	+	+ ^d	+	-	-	NA
Developmental delay / learning difficulties	+	+	+	+	+ ^d	-	+	+ ^d	+	NA	NA	NA
Behavior disorders	-	-	+	+ ^c	-	-	+	-	+	NA	NA	NA
Recurrent infections	+	-	+	+	+ ^d	-	-	+ ^d	-	-	-	-
Immunological abnormalities	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+
Skeletal abnormalities	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Renal abnormalities	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Short stature	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

NA, not applicable; VSD, ventricular septal defect; VSDp, perimembranous VSD; Raa, right aortic arch; BAV, bicuspid aortic valve; SCA, aberrant origin subclavian artery; PA, pulmonary atresia; ASD, atrial septal defect; Mild PS, mild pulmonary stenosis; PFO, patent foramen ovale.

^aAbsent thymus. Death at age 3 years, because of severe immunodeficiency.

^bThe mother's patient had 22q11.2 deletion.

^cSchizophrenia.

^dClinical feature not observed at age of diagnosis.

TABLE III. Clinical Features in Patients With Abnormal Karyotype

Karyotype	Age	Phenotype
47,XXY	13	Heart defect, frequent lower airway disease, learning disabilities and attention deficit
47,XXdel(13)(q32),+dup(13)(q32)	7 months	Dysmorphic features, feeding difficulty, failure to thrive
46,XX/47,XX+21	6	Frequent lower airway disease, language impairment, mild mental delay, and, mild bilateral clinodactyly of fifth finger, brachydactyly and mild truncal hypotonia
46,XY,t(10;14)(q24.3;q32.3)	16	Cleft palate, language impairment, mental retardation and small stature
46,XY,inv(12)(p11.1,q12.3)	4	Facial dysmorphic features, language impairment and attention deficit

as a result of technical difficulties involved in identifying microduplications on metaphase spreads. In this report we performed FISH analysis on metaphase spreads and also on interphase nuclei in an attempt to detect this anomaly, but it was not found in any patient with clinical features of DG/VCFS. These results indicate that 22q11.2 microduplication is really less frequent than 22q11.2 microdeletion among patients with clinical features of DG/VCFS. Thus the selection criteria of patients with the DG/VCFS phenotype would not be enough to recognize the microduplication 22q11.2. Some reports described that 22q11.2 microduplication may also be associated with normal phenotype. Edelmann et al. [1999b] identified a family in which the proband with 22q11.2 microduplication was mildly affected, with developmental delay and hypotonia, but the mother and grandmother with the same anomaly appeared to be unaffected. Yobb et al. [2005] identified two patients with 22q11.2 microduplication in a series of 275 females who tested negative for fragile X syndrome. These two cases were ascertained independently of the 22q11.2 microdeletion and showed no similarity to DG/VCFS phenotype.

Our results suggest that the majority of patients with microduplications may not fall within the phenotypic spectrum of DG/VCFS. In agreement with the recent reports of Yobb et al. [2005] and Cotter et al. [2005] we suggest that the clinical features overlapping with DG/VCFS could represent only one part of the syndrome's phenotypic spectrum, indicating that the true and full phenotypic spectrum of 22q11.2 microduplication syndrome will not be really apparent until patients are ascertained independently of the 22q11.2 deletion phenotype. Supporting this hypothesis Somerville et al. [2005] described a patient with reciprocal duplication of Williams-Beuren syndrome interval with a new clinical phenotype not overlapping with deletion 7q11.23.

The rarity of cases with microduplication may be due to the molecular pathogenesis. A recent study of families of patients with 22q11.2 microdeletion reported an unexpectedly high number (19/20 families) of proximal interchromosomal meiotic exchanges associated with the deleted chromosome, suggesting that the genomic structure or sequence of the chromosome 22 that becomes the deleted

homolog may be different from the one that remains intact [Saitta et al., 2004]. Therefore we have to consider that misalignments of LCRs during meiosis may truly generate deletions more frequently than reciprocal duplications. While the real incidence of microduplication events could be underestimated, a population birth study will be necessary to establish the true frequency of this anomaly.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Heather McDermid and Twila M. Yobb for providing the sample with 22q11.2 microduplication. We also thank the patients' parents, who consented for publication of the photographs.

REFERENCES

- Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. 1998. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 7:887–894.
- Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM, Mahle WT, Campbell RM. 2003. A population-based study of the 22q11.2 deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics* 112:101–107.
- Chen CP, Chern SR, Lee CC, Lin SP, Chang TY, Wang W. 2004. Prenatal diagnosis of mosaic 22q11.2 microdeletion. *Prenat Diagn* 8:660–662.
- Cohen E, Chow EWC, Weksberg R, Basset AS. 1999. Phenotype of adults with the 22q11 deletion syndrome: A review. *Am J Med Genet* 86:359–365.
- Conseavage MW, Seip JR, Belchis DA, Davis AT, Baylen BG, Rogan PK. 1996. Association of a mosaic chromosomal 22q11 deletion with hypoplastic left heart syndrome. *Am J Cardiol* 77:1023–1025.
- Cotter PD, Nguyen H, Tung G, Rauen KA. 2005. Incidence of microduplication 22q11.2 in patients referred for FISH testing for velo cardiofacial and DiGeorge syndromes. *Eur J Hum Genet* 12:1245–1246.
- Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. 1999a. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 64:1076–1086.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. 1999b. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 8:1157–1167.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM. 2003. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: Clinical,

- cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73:1027–1040.
- Goldberg R, Motzkin B, Marion R, Scambler PJ, Shprintzen RJ. 1993. Velo-cardio-facial syndrome: A review of 120 patients. *Am J Med Genet* 45:313–319.
- Hassed SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ. 2004. A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Clin Genet* 65:400–404.
- Hatchwell E, Long F, Wilde J, Crolla J, Temple K. 1998. Molecular confirmation of germ line mosaicism for a submicroscopic deletion of chromosome 22q11. *Am J Med Genet* 78:103–106.
- Kitsiou-Tzeli S, Kolialexi A, Fryssira H, Galla-Voumvouraki A, Salavoura K, Kanariou M, Tsangaris GT, Kanavakis E, Mavrou A. 2004. Detection of 22q11.2 deletion among 139 patients with Di George/Velocardiofacial syndrome features. *In Vivo* 18:603–608.
- McDermid HE, Morrow BE. 2002. Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet* 70:1077–1088.
- McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE. 1998. Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: Identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. *Cytogenetics Cell Genet* 81:222–228.
- Murphy KC. 2002. Schizophrenia and velo-cardio-facial syndrome. *Lancet* 359:426–430.
- Perez E, Sullivan KE. 2002. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr* 14:678–683.
- Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F, Taillemite JL, Marlin S. 2005. 22q11.2 duplication syndrome: Two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet Part A* 137A:47–51.
- Ravnan JB, Chen E, Golabi M, Lebo RV. 1996. Chromosome 22q11.2 microdeletions in velocardiofacial syndrome patients with widely variable manifestations. *Am J Med Genet* 66:250–256.
- Robin NH, Shprintzen RJ. 2005. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr* 147:90–96.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ, et al. 1997. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: A European collaborative study. *J Med Genet* 34:798–804.
- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Chakraborty PK, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS. 2004. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet* 13:417–428.
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR. 2005. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med* 353:1694–1701.
- Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. 2000. Chromosome 22q11 deletion syndrome: Update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 97:128–135.
- Tobias ES, Morrison N, Whiteford ML, Tolmie JL. 1999. Towards earlier diagnosis of 22q11 deletion. *Arch Dis Child* 81:513–514.
- Tsai CH, Van Dyke DL, Feldman GL. 1999. A child with velocardiofacial syndrome and del(4)(q34.2): Another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet* 82:336–339.
- Wilson DI, Scambler PJ. 1995. The chromosome 22q11 deletion syndromes. *Appl Cytogenetics* 21:33–39.
- Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J. 2005. Microduplication and triplication of 22q11.2: A highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 76:865–876.

Estudi I-B

Publicació 2:

Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangements among patients with schizophrenia

Anna Brunet, Lluís Armengol, Trini Pelaez, Roser Guillamat, Vicenç Vallès, Elisabeth Gabau, Xavier Estivill, Miriam Guitart.

Behavioral and Brain Functions 2008, 4;10

La regió 22q11.2 és considerada una ferma candidata per l'esquizofrènia. Avalada tant pels resultats d'estudis de lligament, com pel fet de que la malaltia es manifesta amb una freqüència del 25-30% entre els pacients amb la microdeleció 22q11.2, fet que representa una incidència 25 vegades superior a la descrita en la població general (1%).

La síndrome de la microduplicació 22q11.2 és un nou trastorn genòmic amb un fenotip encara avui dia poc definit i la majoria dels pacients recollits a la literatura no han arribat a l'adolescència. Tot i així s'han descrit alguns casos amb trastorns de la conducta com impulsivitat, agressivitat, desordre d'oposició desafiant, immaduresa social, desordre de dèficit d'atenció i dèficits cognitius suggerint que aquesta anomalia genètica podria també estar associada amb trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia. És per això que es va plantejar l'estudi de la regió 22q11.2 en una sèrie de 190 pacients adults amb esquizofrènia, mitjançant MLPA.

Aquest estudi va mostrar-nos la tècnica de MLPA com una estratègia ràpida i econòmica per l'anàlisi de CNVs en un nombre elevat de mostres. Els resultats d'aquestes anàlisis van confirmar que la freqüència de la microdeleció 22q11.2 entre pacients amb esquizofrènia és de l'1% (2/190), tal i com havia estat descrit a la literatura. No es va identificar cap cas amb la microduplicació recíproca, suggerint que aquesta anomalia no és igual de freqüent que la microdeleció entre els pacients amb esquizofrènia.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangement among patients with schizophrenia

Behavioral and Brain Functions 2008, **4**:10 doi:10.1186/1744-9081-4-10

Anna Brunet (anna.brunet@crg.es)
Lluís Armengol (lluis.armengol@crg.es)
Trini Pelaez (trinipelaez@hotmail.com)
Roser Guillamat (rguillamat@cst.cat)
Vicenc Valles (vvalles@cst.cat)
Elisabeth Gabau (egabau@tauli.cat)
Xavier Estivill (xavier.estivill@crg.es)
Miriam Guitart (mguitart@tauli.cat)

ISSN 1744-9081

Article type Short paper

Submission date 27 November 2007

Acceptance date 19 February 2008

Publication date 19 February 2008

Article URL <http://www.behavioralandbrainfunctions.com/content/4/1/10>

This peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Behavioral and Brain Functions* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Behavioral and Brain Functions* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.behavioralandbrainfunctions.com/info/instructions/>

For information about other BioMed Central publications go to

<http://www.biomedcentral.com/>

© 2008 Brunet *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangement among patients with schizophrenia

Anna Brunet^{1,2,3}, Lluís Armengol¹, Trini Pelaez², Roser Guillamat^{2,4}, Vicenç Vallès⁴, Elisabeth Gabau², Xavier Estivill^{1,5*}, Miriam Guitart^{2*}

¹Genes and Disease Program, Barcelona Genotyping Node, CeGen-CRG, CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), Barcelona, Catalonia, Spain

²Genetic laboratory UDIAT-Centre Diagnòstic, Department of Mental Health Department of Paediatrics, Fundació Parc Taulí - Institut Universitari UAB, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Catalonia, Spain

³Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Catalonia, Spain.

⁴Department of Mental Health, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Catalonia, Spain

⁵Department of Health and Experimental Life Sciences, Pompeu Fabra University (UPF), Barcelona, Catalonia, Spain

*Corresponding authors

Email addresses:

AB: anna.brunet@crg.es
LLA: lluis.armengol@crg.es
TP: trinipelaez@hotmail.com
RG: rguillamat@cst.cat
VV: vvalles@cst.cat
EG: egabau@tauli.cat
XE: xavier.estivill@crg.es
MG: mguitart@tauli.cat

Correspondence should be addressed to Xavier Estivill, MD, PhD, Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG), PRBB Building, Carrer Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain. E-mail: xavier.estivill@crg.es. Miriam Guitart, PhD, Genetic laboratory UDIAT-Centre Diagnòstic, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Catalonia, Spain. E-mail: mguitart@tauli.cat

Abstract

Chromosome aberrations have long been studied in an effort to identify susceptibility genes for schizophrenia. Chromosome 22q11.2 microdeletion is associated with DiGeorge and Velocardiofacial syndromes (DG/VCF) and provides the most convincing evidence of an association between molecular cytogenetic abnormality and schizophrenia. In addition, this region is one of the best replicated linkage findings for schizophrenia. Recently, the reciprocal microduplication on 22q11.2 has been reported as a new syndrome. Preliminary data indicates that individuals with these duplications also suffer from neuropsychiatric disorders. In this study we have investigated the appropriateness of testing schizophrenia patients for the 22q11.2 microduplication. We used multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to measure copy number changes on the 22q11.2 region in a sample of 190 patients with schizophrenia. Our results corroborate the prevalence of the 22q11.2 microdeletion in patients with schizophrenia and clinical features of DG/VCFS and do not suggest an association between 22q11.2 microduplication and schizophrenia.

Findings

Low copy repeats (LCRs) on chromosome 22q11.2 mediate chromosomal rearrangements leading to recurrent deletions, duplications and translocations [1]. The 22q11.2 microdeletion is responsible for the DiGeorge and Velocardiofacial Syndromes (DG/VCFS) (OMIM #188400 and #192430). These syndromes are associated with variable phenotypic features that includes cardiac defects, palate anomalies, characteristic physiognomy, learning difficulties and relatively high frequency of severe mental illness like schizophrenia. The majority of human chromosome 22q11.2 microdeletions (87%) are ~3 Mb in size, whereas a small proportion (8%) involve smaller nested 1.5 Mb microdeletion [2]. The reciprocal microduplication has been reported in several individuals [3]. This new chromosomal syndrome was identified in patients ascertained on the basis of to DG/VCFS-like features and up to 48 cases of the 22q11.2 microduplication have been reported [4]. The clinical presentation of 22q11.2 microduplication cases is highly variable, ranging from severe congenital malformations that lead to early death, to isolated mild learning disabilities. Most of the reported individuals are infants or children at present, in who the existence of neuropsychiatry disorders has not yet been fully assessed. However, preliminary data show that individuals with duplications also suffer from neuropsychiatric disorders. Furthermore, characteristic traits of impulsivity, aggression, oppositional defiant disorder, social immaturity, short attention spans, attention deficit disorder, and cognitive deficits have been reported in cases of 22q11.2 microduplication [3, 5-8].

Chromosome 22q11.2 region provides the most convincing evidence of an association between molecular cytogenetic abnormality and schizophrenia.

Although 22q11.2 microdeletion occurs in the population at a rate of 0.016%, it has been found in up to 2% of adult schizophrenic patients and in up to 6% of cases of early onset schizophrenia [9, 10]. Several reports suggest that dosage changes in 22q11.2 genes could disrupt processes required for proper brain development and/or function, and contribute to increase schizophrenia susceptibility [11, 12]. Several studies have suggested linkage between 22q11 and schizophrenia [13-15] and it is one of the best replicated linkage findings among schizophrenia patients. Meta-analysis of genome scans for bipolar disorder and schizophrenia have also identified chromosome 22q11-13 as one of the strongest linkage regions for both syndromes [16].

These linkage findings indicate that mutations of genes on 22q11 are likely to contribute to susceptibility to schizophrenia. In the same direction association studies have reported several genes of this region associated with risk to develop schizophrenia and bipolar disorder, including *PRODH*, *COMT*, *ZNF74*, *PCQAP*, *UFD1L*, *ZDHHC8*, *DGCR2* and *SNAP29* [17, 18]. In addition, neuroimaging studies revealed that 22q11.2 deletion patients exhibit a pattern of cortical gray matter reduction similar to schizophrenic subjects [19]. Finally, mouse models provide evidences that this region is associated with schizophrenia. A murine model overexpressing the mouse orthologs of several genes in this region (*CDCrel*, *GP1B β* , *TBX1* and *WDR14*) exhibits behavioral abnormalities consistent with schizophrenia traits [20].

It seems extremely likely that the 22q11.2 region harbours genes that alone, or in combination, could be causally implicated in schizophrenia. Nowadays the phenotype of individuals with 22q11.2 microduplication shows a wide range of severity but some consistent findings have been dysmorphic

features, cognitive deficits and psychiatric disorders reported in 33% of cases [6]. In this study we decided to investigate the appropriateness of testing schizophrenia patients for 22q11.2 microduplication. We used multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to measure copy number changes on 22q11.2 region in a set of patients with schizophrenia.

A total of 190 Caucasian, unrelated patients with schizophrenia (153 men and 40 women; age $33,3 \pm 8,6$ years) were included in the study. Educational levels were divided into the following categories: 54% of patients have primary school (1-11 years), 26% secondary school (12-16 years), 7% high school (17-18 years), 7% university level and finally 6% can only read and write. Patients were diagnosed according to DSM-IV criteria as follow: 126 paranoid, 14 disorganized, 13 undifferentiated, 9 residual, 13 schizoaffective disorder, 13 schizophreni form disorder and 2 cases were not specificated. All cases have been recruited at the department of mental health of two hospitals, from Sabadell and Terrassa, after written informed consent approved by the ethics board of the Fundació Parc Taulí Health Corporation.

A set of MLPA probes to screen copy number changes in the 22q11.2 region was developed according to the procedures described elsewhere [21]. The set consists of 30 different oligonucleotides that correspond to 15 different probes, 4 of which interrogate the 3 Mb region that is typically deleted in cases of DG/VCFs and the remaining 11 probes match to other regions of chromosome 22 and to other autosomal region on chromosome 10 (Table 1).

One hundred and sixty patients were analyzed with this mix of probes. Another group of 30 individuals were also analyzed using the commercial SALSA P023 MLPA-DiGeorge syndrome test kit (MRC-Holland, Netherlands).

This commercial kit consists of 39 cloned probes that interrogate different chromosomal regions associated to DG/VCFS and Cat Eye Syndrome. In this case, the microdeletion region is covered by seven specific probes and a subtelomeric 22q13 control probe. All our MLPA experiments contained the corresponding positive controls (DNA from individuals previously diagnosed as carriers of 22q11.2 duplications or deletions) to ensure the reliable detection of copy number gains and losses (Figure 1).

The MLPA reactions were performed essentially as described by Schouten et al. [22]. For the data analysis we calculated the relative probe signals using the peak heights of PCR products. Briefly, the tracing data was normalized by dividing each probe's peak height by the average height of all peaks of the sample and then dividing this value by the average normalized peak's height of the corresponding locus of all the samples. The product of this calculation is termed dosage quotient (DQ). A calculated DQ value below 0.65 was considered as indicative of a deletion, and values above 1.3 are indicative of duplications.

Among the 190 schizophrenic patients analyzed, we identify two cases (EZ-117 and EZ-238) with the 22q11.2 microdeletion. This incidence of about 1% is in agreement with previous estimates in the literature [23, 24]. We did not detect the reciprocal 22q11.2 microduplication. The deleted samples were analyzed with both the in-house and commercial MLPA assays, with similar DQ values below the 0.65 threshold. A confirmatory FISH analysis was also performed (data not shown). Both patients showed common manifestations associated with DG/VCFS, including malformations of the cardiovascular system (aberrant origin of subclavian artery / pulmonary stenosis), facial

dysmorphic features (long face, small ears, narrow palpebral fissures, prominent tubular nose), velopharyngeal insufficiency with severe hypernasality, motor delay, cognitive deficit and mild mental retardation. These two patients with the 22q11.2 microdeletion were girls that were noted to have history of learning and behavioural problems in the school. Both cases are diagnosed as hebephrenic schizophrenia with early age of onset (12-13 years).

Subsequent family analyses in the parents showed the 22q11.2 microdeletion in the mother of one patient. The mother with same facial appearance than her daughter showed paranoid schizophrenia and mild mental retardation. This family has another offspring, a boy who was diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) during childhood. He proved to be normal by FISH analyses (not shown).

Our study indicates that MLPA is a suitable, easy, rapid and cost-effective method to seek for copy number variations (microdeletions and microduplications) in patients suffering from psychiatric disorders. Furthermore, our results confirm the prevalence of the 22q11.2 microdeletion in patients with schizophrenia and other clinical features of DG/VCFS, but do not indicate any association with the 22q11.2 microduplication. We conclude that screening for 22q11 microduplication in patients with schizophrenia is not indicated.

Abbreviations

LCRs: Low copy repeats, **DG/VCFS:** DiGeorge and Velocardiofacial Syndromes, **MLPA:** Multiplex ligation-dependent probe amplification, **FISH:** Fluorescence in situ hybridization, **ADHD:** Attention-deficit hyperactivity disorder

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

AB participates in the design of the study, carried out the molecular genetic studies and drafted the manuscript. **LLA** participate in the design of the study and helped to draft the manuscript. **TP** contributed with samples collection of patients and clinical characterization. **RG** and **VV** members of the Psychiatric Genetics Network Group participated in the conception, design of the study; data analysis and drafting of the manuscript. **EG** contributed with clinical characterization of patients with 22q11.2 microdeletion. **XE** and **MG** participated in the conception, design and coordination of the study; data analysis and drafting of the manuscript.

All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Heather McDermid and Twila M. Yobb for providing sample with the 22q11.2 microduplication. We thank also all the patients for participation in the study and all clinicians for their valuable contribution.

This research was supported by Fundació Parc Taulí – Institut Universitari UAB; the “Departament d’Educació i Universitats” and the “Departament de Salut” of the Catalan Autonomous Government (“Generalitat de Catalunya”); the Ministry of Health, and the Ministry of Education and Science of the Spanish Government; and the European Union Sixth Framework Programme (AnEUploidy project).

References

1. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE: **A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**:1157-1167.
2. Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE: **Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome.** *Am J Hum Genet* 1999, **64**:1076-1086.
3. Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, et al: **Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:1027-1040.
4. de La Rochebrochard C, Joly-Helas G, Goldenberg A, Durand I, Laquerriere A, Ickowicz V, Saugier-Verber P, Eurin D, Moiro H, Diguet A, et al: **The intrafamilial variability of the 22q11.2 microduplication encompasses a spectrum from minor cognitive deficits to severe congenital anomalies.** *Am J Med Genet A* 2006, **140**:1608-1613.
5. Hased SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ: **A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome.** *Clin Genet* 2004, **65**:400-404.
6. Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F, et al: **22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes.** *Am J Med Genet A* 2005, **137**:47-51.
7. Sparkes R, Chernos J, Dicke F: **Duplication of the 22q11.2 region associated with congenital cardiac disease.** *Cardiol Young* 2005, **15**:229-231.
8. Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, et al: **Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome.** *Am J Hum Genet* 2005, **76**:865-876.
9. Usiskin SI, Nicolson R, Krasnewich DM, Yan W, Lenane M, Wudarsky M, Hamburger SD, Rapoport JL: **Velocardiofacial syndrome in childhood-onset schizophrenia.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999, **38**:1536-1543.
10. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM, et al: **A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population.** *Pediatrics* 2003, **112**:101-107.
11. Williams NM, Owen MJ: **Genetic abnormalities of chromosome 22 and the development of psychosis.** *Curr Psychiatry Rep* 2004, **6**:176-182.
12. Paylor R, Lindsay E: **Mouse models of 22q11 deletion syndrome.** *Biol Psychiatry* 2006, **59**:1172-1179.
13. Myles-Worsley M, Coon H, McDowell J, Brenner C, Hoff M, Lind B, Bennett P, Freedman R, Clementz B, Byerley W: **Linkage of a composite inhibitory phenotype to a chromosome 22q locus in eight Utah families.** *Am J Med Genet* 1999, **88**:544-550.
14. Takahashi S, Cui YH, Kojima T, Han YH, Zhou RL, Kamioka M, Yu SY, Matsuura M, Matsushima E, Wilcox M, et al: **Family-based association study of markers on chromosome 22 in schizophrenia using African-American,**

- European-American, and Chinese families.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003, **120**:11-17.
15. Williams NM, Norton N, Williams H, Ekholm B, Hamshere ML, Lindblom Y, Chowdari KV, Cardno AG, Zammit S, Jones LA, et al: **A systematic genomewide linkage study in 353 sib pairs with schizophrenia.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:1355-1367.
 16. Badner JA, Gershon ES: **Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia.** *Mol Psychiatry* 2002, **7**:405-411.
 17. Karayiorgou M, Gogos JA: **The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia.** *Brain Res Mol Brain Res* 2004, **132**:95-104.
 18. Arinami T: **Analyses of the associations between the genes of 22q11 deletion syndrome and schizophrenia.** *J Hum Genet* 2006, **51**:1037-1045.
 19. van Amelsvoort T, Daly E, Henry J, Robertson D, Ng V, Owen M, Murphy KC, Murphy DG: **Brain anatomy in adults with velocardiofacial syndrome with and without schizophrenia: preliminary results of a structural magnetic resonance imaging study.** *Arch Gen Psychiatry* 2004, **61**:1085-1096.
 20. Hiroi N, Zhu H, Lee M, Funke B, Arai M, Itokawa M, Kucherlapati R, Morrow B, Sawamura T, Agatsuma S: **A 200-kb region of human chromosome 22q11.2 confers antipsychotic-responsive behavioral abnormalities in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:19132-19137.
 21. www.mrc-holland.com.
 22. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:e57.
 23. Bassett AS, Chow EW: **22q11 deletion syndrome: a genetic subtype of schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 1999, **46**:882-891.
 24. Arinami T, Ohtsuki T, Takase K, Shimizu H, Yoshikawa T, Horigome H, Nakayama J, Toru M: **Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population.** *Schizophr Res* 2001, **52**:167-170.

Figure legends

Figure 1. MLPA electropherograms showing the peaks from the probes set used in the analysis of the chromosome 22q11.2 duplication syndrome. Specific probes for the chromosome 22q11.2 region (*HIRA*, *TBX-1*, *COMT* and *ZDHHC8*) are indicated with arrows. **A:** A 22q11.2 microdeletion trace. **B:** A normal sample trace. **C:** A 22q11.2 microduplication trace.

Table 1

Probes, genes and MLPA outcome in the analysis of the 22q11.2 duplication syndrome rearrangement among patients with schizophrenia

Probe	Location	Gene	Chrom	Start	End	Length (nt)	MLPA result
HIRA	22q11.21	HIRA	22	17698971	17699021	93	<i>Del (EZ-117 and EZ-238)</i>
TBX-1	22q11.21	TBX1	22	18150824	18150883	104	<i>Del (EZ-117 and EZ-238)</i>
COMT	22q11.21	COMT	22	18335516	18335575	110	<i>Del (EZ-117 and EZ-238)</i>
ZDHHC8	22q11.21	ZDHHC8	22	18513602	18513661	113	<i>Del (EZ-117 and EZ-238)</i>
RP11-307O16	22q11.22		22	20838313	20838371	101	Dup (EZ-18)
RP11-722K16	22q11.22	IGLC1	22	20999611	20999670	132	Dup (EZ-149)
RP11-757F24	22q11.22	IGLC1	22	21157367	21157421	97	
RP11-281O23	22q11.22	IGLC1	22	21292358	21292410	95	
RP11-50L23	22q11.22	IGLC1	22	21439794	21439859	124	Dup (EZ-6)
RP11-264C20	22q11.22	IGLC1	22	21526749	21526796	90	Dup (EZ-6), Del (EZ-105)
RP11-165G05	22q11.22		22	21655494	21655558	107	Dup (EZ-6)
CARD10	22q13.1	CARD10	10	36236312	36236371	128	
CXCL12	10q11.23	CXCL12	10	44192388	44192461	116	<i>Del (EZ-96 and EZ-125)</i>
C10orf10	10q11.23	RASSF4 C10orf10	10	44792765	44792844	122	
ZWINT	10q21	ZWINT	10	57789521	57789580	120	

Del, deletion; Dup, duplication; EZ, schizophrenia sample.

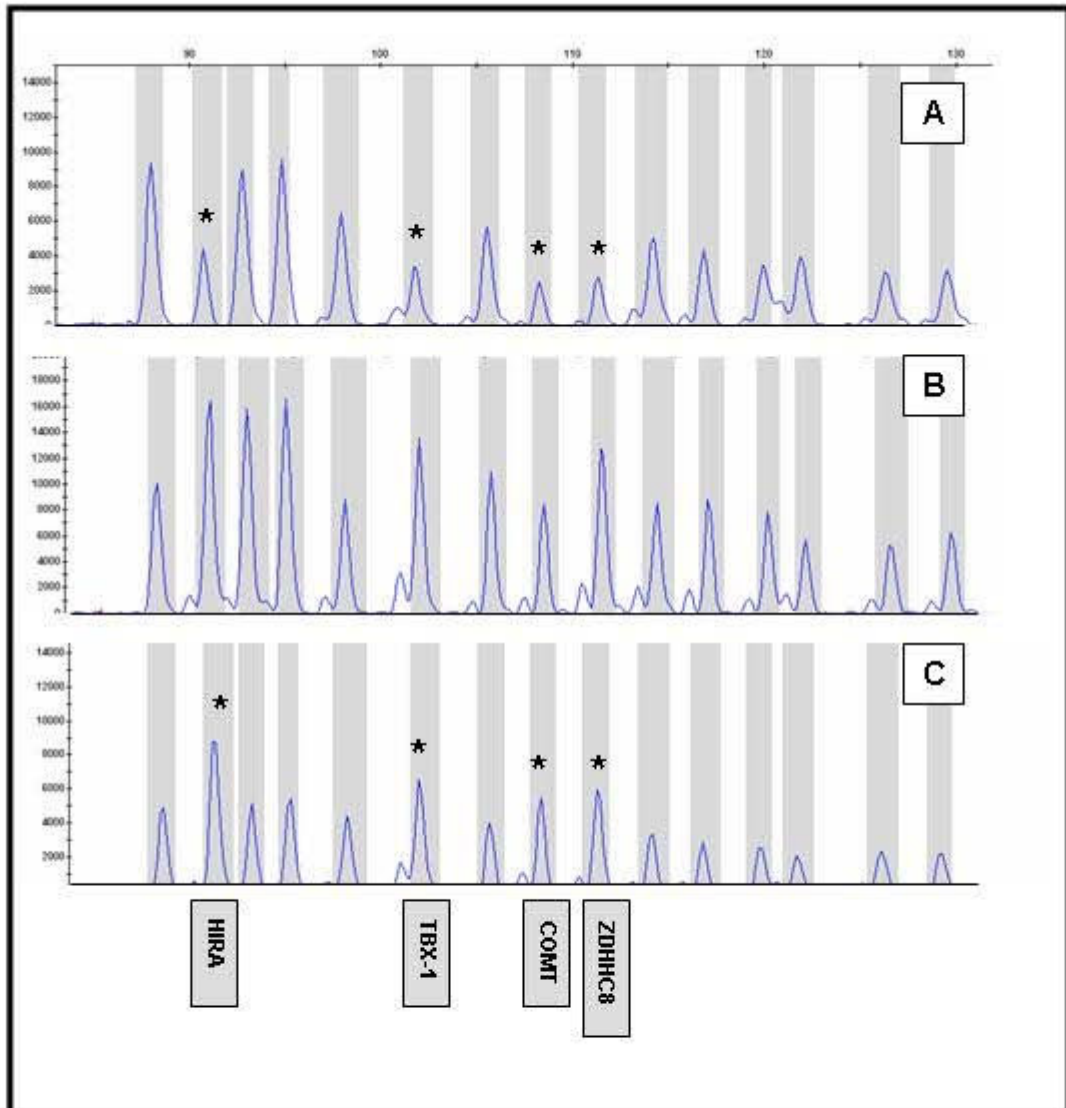


Figure 1

Estudi II-A

BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1

En revisió BMC Medical Genetics
(Sotmeses les segones esmenes proposades pels revisors el 2-Setembre-2009)

La tècnica d'array-CGH ens permet analitzar anomalies citogenètiques submicroscòpiques i identificar noves malalties genòmiques. Donada la àmplia sèrie de pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF però sense la microdeleció 22q11.2 més comú, ni la microduplicació recíproca, descrita en l'estudi I-A d'aquesta tesi, ens varem proposar investigar altres variants estructurals del genoma que poguessin estar implicades en les anomalies clíniques presents en aquests pacients.

Es van seleccionar 18 pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF per ser estudiats, de manera simultània utilitzant una aproximació anomenada "face to face", amb dos *arrays* de BACs: un que ens permet analitzar tot el genoma amb una resolució de entre 0,5 i 1,2Mb, i un l'altre d'específic per cobrir completament el cromosoma 22. Aquest treball recull les CNVs identificades en aquests 18 pacients i descriu un cas amb dues variants estructurals *de novo* a la regió 1q21.1: una microduplicació de 212Kb, recíproca de la microdeleció associada a la síndrome TAR, i una microdeleció més telomèrica de 1,15Mb. Posteriorment, i mitjançant la tècnica de MLPA, es va analitzar la regió 1q21.1 en un segon grup de 73 pacients amb cardiopatia, i es va identificar un altre cas amb una cardiopatia complexa portador de la mateixa microduplicació de 212Kb, però en aquest cas heretada del pare aparentment sa. El pacient descrit en aquest treball, amb característiques clíniques que inclouen la cardiopatia, insuficiència velofaríngea, dificultats en el llenguatge, retard mental moderat, així com bronquitis freqüents i dèficit d'atenció i hiperactivitat durant la infància, suggereix que aquestes CNVs a la regió 1q21.1 poden originar un fenotip amb característiques clíniques similars a les associades amb la microdeleció 22q11.2, i que, per tant, pot ser una regió a considerar en aquells pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF sense la microduplicació comú 22q11.2.

BAC array CGH in patients with Velocardiofacial-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1

Anna Brunet^{1,2,3}, Lluís Armengol^{1,2}, Damià Heine⁴, Jordi Rosell⁴, Manel García-Aragónés^{1,2}, Elisabeth Gabau³, Xavier Estivill^{1,2,5}, Miriam Guitart³

¹ Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), and ² CIBERESP, Barcelona, Catalonia; ³ Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Catalonia; ⁴ Hospital Universitari Son Dureta, Mallorca; ⁵ Pompeu Fabra University, Barcelona, Catalonia, Spain.

Abstract

Background

Microdeletion of the chromosome 22q11.2 region is the most common genetic aberration among patients with velocardiofacial syndrome (VCFS) but a subset of subjects do not show alterations of this chromosome region.

Methods

We analyzed 18 patients with VCFS-like features by comparative genomic hybridisation (aCGH) array and performed a face-to-face slide hybridization with two different arrays: a whole genome and a chromosome 22-specific BAC array. Putative rearrangements were confirmed by FISH and MLPA assays.

Results

One patient carried a combination of rearrangements on 1q21.1, consisting in a microduplication of 212 kb and a close microdeletion of 1.15 Mb, previously reported in patients with variable phenotypes, including mental retardation, congenital heart defects (CHD) and schizophrenia. While 326 control samples were negative for both 1q21.1 rearrangements, one of 73 patients carried the same 212-kb microduplication, reciprocal to TAR microdeletion syndrome. Also, we detected four copy number variants (CNVs) inherited from one parent (a 744-kb duplication on 10q11.22; a 160 kb duplication and deletion on 22q11.21 in two cases; and a gain of 140 kb on 22q13.2), not present in control subjects, raising the potential role of these CNVs in the VCFS-like phenotype.

Conclusions

Our results confirmed aCGH as a successful strategy in order to characterize additional submicroscopic aberrations in patients with VCF-like features that fail to show alterations in 22q11.2 region. We report a 212-kb microduplication on 1q21.1, detected in two patients, which may contribute to CHD.

Background

The hemizygous chromosome 22q11.2 microdeletion occurs in approximately 1:4000-6000 live births [1, 2], being the most common genomic aberration among patients clinically diagnosed with velocardiofacial syndrome (VCFS) or DiGeorge syndrome (DGS). Main clinical symptoms include palatal abnormalities, particularly velopharyngeal incompetence, with feeding difficulties reported in most (69%) young patients, conotruncal heart defect, characteristic facial features (long face, broad/tubular nose, hooded eyelids, hypertelorism, ear abnormalities and retrognathia), immune deficiency (involving the respiratory tract in up to 77% of cases), motor and developmental delay, learning disabilities, speech delay and language deficits. Behavioural manifestations, such as attention-deficit-hyperactivity disorder (ADHD) and other psychiatric illness in adult patients are also frequent [3-9]. Overall, more than 180 clinical features have been associated with the 22q11.2 microdeletion syndrome (<http://www.vcfsef.org>) [9].

The frequency of the 22q11.2 microdeletion varies with the nature of the clinical findings. In infants with a congenital heart defect and no other apparent syndromic features, or with a cleft palate alone, the frequency of chromosome 22q11.2 microdeletion was reported to be very low (0-1% and 1.8%) [10, 11]. The wide phenotypic spectrum and the highly diverse clinical features, which frequently overlap with other defined or undefined clinical entities, lead to difficulties in the clinical testing. Other unrelated chromosomal abnormalities have been reported in 2-4% of patients with suspect of VCFS, including microscopic inversions and interchromosomal imbalances, derivatives of parental translocations, marker chromosomes, apparently balanced translocations, ring chromosomes and sex chromosomes aneuploidies [12-15]. Deletions involving contiguous genes on chromosome 10p have also been reported in some patients with VCFS features [16-18], while mutations in gene T-box 1 (*TBX1*) account only for a few of reported cases [19, 20].

Nowadays, in genetic testing laboratories, the most common procedure for the diagnosis of this syndrome is by classical cytogenetic karyotyping, which is unable to detect imbalances smaller than 5-10 megabases (Mb), and by fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) using commercially available probes N25 or TUPLE1. FISH allows the detection of the most common 3 Mb deletion as well as the nested 1.5 Mb deletion. More recently, PCR-based multiplex ligation-dependent probe

amplification (MLPA) has emerged as a cost-effective and accurate diagnostic tool for the analysis of imbalances in the 22q11.2 region. The commercial MLPA assay (Salsa P023B, MRC Holland, The Netherlands) contains probes for several other chromosomal regions such as 10p12-15, 8p21-p23, 4q22-q35, 17p13 and 18q21 based on findings of alterations of these regions in a number of reported patients with DGS/VCFS. However, there is still a subset of patients with VCFS that does not show any chromosomal aberration detectable with the above-mentioned techniques. Many of those VCFS-like patients present common clinical features, like congenital heart disease (CHD), learning disabilities and characteristic facial features, which suggest that a common chromosomal imbalance could be the underlying cause.

Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) has successfully been used for detecting genome dosage alterations in children with mental retardation, dysmorphic features and in patients with CHD [21-24]. This technique dramatically increases the resolution and ability to detect copy number alterations compared to conventional cytogenetic methods and allows for a rapid genome-wide screening of submicroscopic copy number aberrations.

Our study was designed to identify submicroscopic genomic alterations important for the pathogenesis of patients with VCFS-like features without the typical 22q11.2 microdeletion. We used two different array designs as screening tools for whole genome and chromosome 22-specific analysis. We describe a novel region on 1q21.1 with a potentially important implication for the CHD and VCFS-like clinical features, and identify several copy number variants (CNVs) inherited from unaffected parents which could contribute to the VCFS-like phenotype.

Methods

Patients

A total of 18 patients (9 male and 9 female, aged 5-23 years) with clinical features overlapping the VCF phenotype, referred to our laboratory to rule out 22q11.2 microdeletion, were analysed by custom-made BAC arrays. One sample carrying a 22q11.2 deletion, previously detected by FISH, and 20 normal population samples were also included in the study to control the performance of the arrays. All cases were recruited from the genetics service of the Fundació Parc Taulí Health Corporation hospital and had clinical assessments performed by medical doctors with wide experience in treating patients with chromosomal abnormalities. Patients

were included in the study on the basis of the presence of VCFS clinical features. Previous laboratory studies on all patients included G-banding karyotype at the level of 600 bands and FISH (Vysis LSI DiGeorge/VCFS region Dual Color Probe) in metaphase and interphase nuclei to rule out the presence of the 22q11.2 microdeletion and microduplication. The presence of CGG-expansions of the *FMR1* gene and/or subtelomeric abnormalities (MLPA - Salsa P036C and P070, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) were also excluded in some patients with mental retardation. Written informed consent was obtained after approval by the ethics board committee of the Fundació Parc Taulí Health Corporation.

Genomic DNA was extracted from the whole blood of patients using the Puregene DNA purification kit (QIAGEN-Gentra Systems) according to the manufacturer's protocol. Pooled genomic DNA used as the reference in aCGH experiments was extracted from blood of 50 male or 50 female subjects.

CGH-BAC arrays

A face-to-face slide hybridization of the sample and reference DNAs on two different arrays was performed (see below). The 5.6K whole genome BAC array consists of 5,442 large insert DNA fragments (BACs) with a global coverage of 23% of the euchromatic genome and a much higher density in hotspot candidate regions, such as those located between segmental duplications and all subtelomeres. The clone set used to produce this array was mainly derived from the 32K human BAC library from the Children Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org/home.htm>) and several gaps in the library were covered using BACs from other libraries (mainly RP11). The distribution of BACs in the array is not homogeneous, but the average spacing between consecutive clones is 0.5 Mb and the maximum 1.2 Mb. The chromosome-22-specific tiling path array consists of 363 genomic BAC clones derived from the human chromosome 22. Slides contained triplicates of all clones providing an average density of at least one clone per 46 kb along the entire euchromatic region of chromosome 22.

The production of the arrays was performed as described by Cuscó et al. (2008) [25], probe preparation and hybridizations were performed in the Microarray Unit of the CRG, Barcelona, Spain. Briefly, for array preparation, BAC DNA was isolated from 1.5 ml bacterial cultures using the Montage BAC96 Miniprep kit following manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA). DNA amplification by DOP-PCR

was done as described in Fiegler et al. (2003) [26]. PCR products were purified using the Montage PCR₉₆ Plates kit (Millipore, Billerica, MA) and quantified using the PicoGreen dsDNA Quantification kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA). Purified products were dried, dissolved at 400 ng/μl in 50% DMSO and spotted using a VersArray ChipWriter™ Pro System (Bio-Rad).

Arrays were scanned using an Agilent G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Inc., Palo Alto, CA) and the acquired images were analyzed using GenePix Pro 6.0 software (Axon, Molecular Devices) using the irregular feature finding option. Extracted raw data was filtered and Lowess normalized using Bacanal (Lozano et al., unpublished), an in house web server implementation of the Limma package developed within the Bioconductor project in the R statistical programming environment. SD of all 22-chromosome clones was calculated for each hybridization experiment. Genomic imbalances were determined based on the log₂ of the Cy5/Cy3 ratios of the average of the four replicates and regions were considered as amplified or deleted when at least the absolute value of two consecutive clones exceeded the 0.2 threshold.

Face-to-face slide hybridization

In order to save time, reagents and reduce experimental noise, the same sample was simultaneously hybridized onto the two different slides by arranging the two arrays face to face in the same hybridization chamber (Corning® Hybridization Chamber II with Increased Depth, Cytel). Reversed-dye labelling of the samples was always performed to minimize the effect of dye bias specific artifacts. Each patient was hybridized against a sex-matched pool of 50 healthy controls. Hybridization was performed as described by Wang et al. (2004) [27]. Briefly, 400 ng of test and reference DNA were labelled by random priming using the BioPrime Array CGH Genomic Labelling System (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA). Cy3 and Cy5 labelled test and control DNA precipitate together with 100μg of human Cot1 DNA and resuspended in 80μl of hybridization buffer (50% formamida, 2xSSC, 10% dextran sulphate, 1x denhard's solution, 0.5mM EDTA pH 8, 40mM NaPhosphatase pH 7). The two slides which make up the pair were placed facing together slightly offset to create a lip along one edge. The barcodes on the arrays created a small space between the slides. The hybridization solution was slowly and carefully applied along the lip and evenly occupied the space between the slides.

Validation experiments

The copy number aberrations identified by aCGH, which we considered for further validation, were analysed using other molecular techniques such as MLPA and FISH analysis. When parental samples were available we checked by MLPA the inheritance pattern of the alterations. The MLPA probes were developed according to the procedures described elsewhere (<http://www.mrc-holland.com>) and using the MLPA Proseek algorithm [28]. The MLPA reactions were performed as described by Schouten et al., 2002 [29]. For the data analysis we calculated the relative probe signals using the peak heights of PCR products. Briefly, the tracing data was normalized by dividing each probe's peak height by the total height of all peaks of the sample and then dividing this value by the average normalized peak's height of the corresponding locus of all the samples. The product of this calculation is termed dosage quotient (DQ). A DQ value below 0.65 was considered as indicative of a deletion, and values above 1.3 are indicative of duplications.

To confirm array results in patient V5, we performed fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments following standard procedures. Furthermore to better characterize the the 1q21.1 microdeletion and microduplication of the 1q21.1 region in both cases (V5 and 112) we used a custom array consisting of 130,000 isothermal probes with 1,155 probes in the 1q21.1 region based on Build 36 coordinates (chr1:143,500,000-148,000,000). The experiments and the subsequent analyses of aCGH were performed as previously described in detail [25, 30].

Results

The whole-genome 5.6K and the chromosome 22-specific BAC-arrays were used to study 18 patients with the VCFS-like phenotype. We identified a total of 81 clones with genomic dosage changes, belonging to 45 different chromosomal regions (14 losses, 14 gains and 17 with signals in both directions) (Supplementary Table 1). All chromosomal changes were compared with the information deposited in the Database of Genomic Variants (Build 36) (<http://projects.tcag.ca/variation/>) [31]. 39 loci had been reported as CNVs in the database and 20 of them were also detected as common variants in 20 control samples previously hybridized on the same 5.6K BAC-array [25]. The aim of this study was screening for submicroscopic deletions and duplications underlying several malformations such as heart defect,

palatal abnormalities or mental delay, for this reason individual clones that were reported polymorphic in normal individuals and also the loci identified as variable in our control samples were excluded. We selected eleven loci for further MLPA validation, none of which were present in control samples: six had not been previously described as CNVs and five regions overlapped with previously reported CNVs, but had been chosen after the imbalance of various consecutive clones in the samples (encompassing regions >150 kb and up to 1.15 Mb) (Supplementary Table 1). Five of the eleven CNVs identified by CGH were validated by MLPA and screened by the same technique in parental samples (Table 1). The remaining six loci could not be validated by MLPA although at least two different probes per region were assayed. Oligonucleotide sequences used for MLPA are shown in Supplementary Table 2.

Characterization of *de novo* genomic imbalances on chromosome 1q21.1

An interstitial microduplication spanning two overlapping BAC clones, with an estimate size of 212 kb, and a microdeletion spanning five consecutive clones, with an estimate size of 1,15 Mb, on region 1q21.1 were found to occur *de-novo* in patient V5. The duplicated region (aCGH 1q21.1(B36:chr1:144149999-144361868++)) included 12 RefSeq Genes (*TXNIP*, *POLR3GL*, *ANKRD34A*, *LIX1L*, *RBM8A*, *PEX11B*, *ITGA10*, *ANKRD35*, *PIAS3*, *NUDT17*, *POLR3C*, *ZNF364*), and the deleted region (aCGH 1q21.1 (B36:chr1:145073765-146329018)) encompassed eight genes (*PRKAB2*, *FMO5*, *CHD1L*, *BCL9*, *ACP6*, *GJA5*, *GJA8*, *GPR89B*, *GPR89C*, *NBPF11*) (Figure 1). FISH and MLPA analysis confirmed both rearrangements in patient V5, and excluded their presence in his parents (Figure 2).

This patient is a 17 year old male with cardiac anomalies (coarctation of the aorta), some dysmorphic facial features (frontal balding, arched eyebrows, eyes deeply set and thin upper lip), velopharyngeal insufficiency with reported feeding problems in infancy (gastroesophageal reflux and frequent vomiting), language impairment, moderate mental retardation, low cognitive deficit and learning problems (irritability, attention deficit hyperactivity disorder), immunological abnormalities (frequent bronchitis), asthma, strabismus (surgery corrected at two years), small umbilical hernia, and fingers with mild camptodactyly, mild interdigital membrane and flat foot arches (Figure 3-A). This patient was included in a previously published series that reported 22 probands with the 1q21.1 microdeletion [30]. We provide here additional clinical information of this case.

We screen the 1q21.1 region, on 73 additional cases with congenital heart defects by MLPA. We found one patient (case 112) with the same microduplication but without the contiguous deletion on 1q21.1, also present in his unaffected father. The clinical features of this patient were cardiac abnormalities (transposition of the great vessels, ventricular septal defect, pulmonary stenosis and right ventricular hypoplasia), braquicephaly and moderate clinodactyly (Figure 3-B). We also analysed 326 additional control DNA samples obtained from anonymous unrelated blood donors using the same MLPA probe mix. All control samples were negative for both rearrangements.

To carefully delineate alterations in the 1q21.1 region, the samples V5 and 112 were also hybridized with a custom oligo array with 1,155 probes being from the 1q21.1 region, as described in [30]. Results confirmed the complex microduplication /microdeletion in case V5 and that both patients shared the same microduplication, reciprocal to the TAR syndrome microdeletion (Supplementary Figure 1).

Identification of inherited aberrations

Four of the validated aberrations were CNVs inherited from one of the parents (Table 1), three overlapping with loci previously reported as CNVs in the reference Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) [31]. A 744-kb duplication on 10q11.22 involving five clones was identified in patient V26, showing facial dysmorphism, learning disability, mild mental retardation and behavioural problems. MLPA with one specific probe on *PPYR1* showed a gain in the patient and his father.

With the chromosome 22 tiling array we identified aberrations involving the deletion of two clones on the 22q11.2 region (160 kb) in two cases. Patients V8 and V24 with dysmorphic facial features, low mental retardation and behavioural problems showed a gain and a loss respectively, both paternally inherited. Finally, a gain of BAC RP11-138G4, located on 22q13.2, which was maternally inherited, was also identified with this chromosome-specific array. This region has not been reported in the literature as a CNV and spans the *SLC25A17* gene that encodes a peroxisomal membrane protein belonging to the family of mitochondrial solute carriers [OMIM *606795]. This BAC clone also includes six exons of the *ST13* gene, encoding a highly conserved protein that binds the major cytosolic chaperones heat-shock proteins HSP70 and HSP90.

Table 1: Summary of altered regions, parental analysis and major clinical features in patients with velocardiofacial-like syndrome (VCFS-like) validated by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). DGV, Database of Genomic Variants.

Sample GAIN	Sample LOSS	Altered clones	Region	Size kb	Start (Build 36)	End (Build 36)	Genes	LOCUS (DGV)	MLPA probes	Inheritance	Clinical features
V5		RP11-315J20 RP11-293J20	1q21.1	212	144149999	144361868	TXNIP, POLR3GL, ANKRD34, LIX1L, RBM8A, PEX11B, ITGAT0, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, ZNF364	Locus 0305	GNRH2 PIAS3	de novo	Cardiac anomalies (coarctation of the aorta); Velopharyngeal insufficiency; dysmorphic facial features; language impairment, mental retardation, cognitive and learning problems, immunological abnormalities.
	V5	RP11-337C18 RP11-533N14 RP11-314N2 RP11-301M17 RP11-115G11	1q21.1	1,15	145073765	146329018	PRKAB2, FMO5, CHD1L, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8, GPRB9	Locus 0305	BCL9 NBPF1	de novo	
V26		RP11-314P12 RP11-292F22 RP11-192A16 RP11-30N1 RP11-115A11	10q11.22	743	46487806	47231326	PPYR1, ANXA8L, CTGLF4	Locus 2984	PPYR1	Paternal	Mild dysmorphic facial features, mild mental retardation, psychological anomalies, phobias
V8	V24	RP11-818K20 RP11-444L7	22q11.21	159	19847992	20006849	-	Locus 4746	RP11-444L7	Both Paternal	V8: Dysmorphic facial features, learning disabilities mental retardation, father with schizophrenia V24: Overt submucos palate, mild facial dysmorphic features, mild mental retardation, learning disabilities, autistic behaviour, (brother with cardiac anomalie) Dysmorphic facial features, learning disabilities, language impairment, attention deficit disorder
V11		RP11-138G4	22q13.2	142	39422672	39564831	SLC25A17, ST13		SLC25A17b	Maternal	

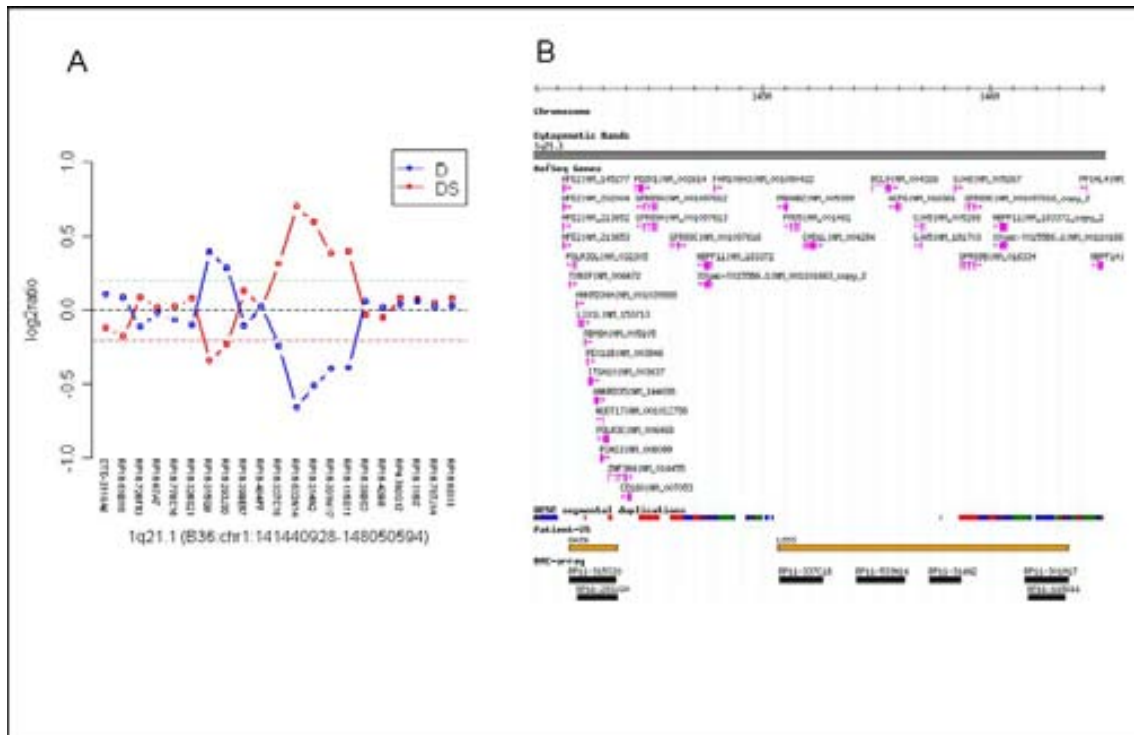


Figure 1. A: 5.6K whole genome BAC aCGH profiles for patient V5 on chromosome region 1q21.1. Each dot represents the mean log₂ ratio transformed after Lowess normalization (y-axis) from four independent replicate spots on the array. The clones on the 1q21.1 region are displayed in the x-axis. Direct experiments (D) are shown in blue, while dye swap (DS) experiments are displayed in red. Each dot represents a BAC clone present in the aCGH experiment. **B: Genome browser representation of the 1q21.1 region containing the microduplication/microdeletion.** The figure shows the related segmental duplications that probably mediated the rearrangements and the genes affected. The microduplication of 212 kb (reciprocal to the TAR syndrome micodeletion), and the downstream microdeletion of 1.15 Mb are indicated by two orange bars (GAIN and LOSS).

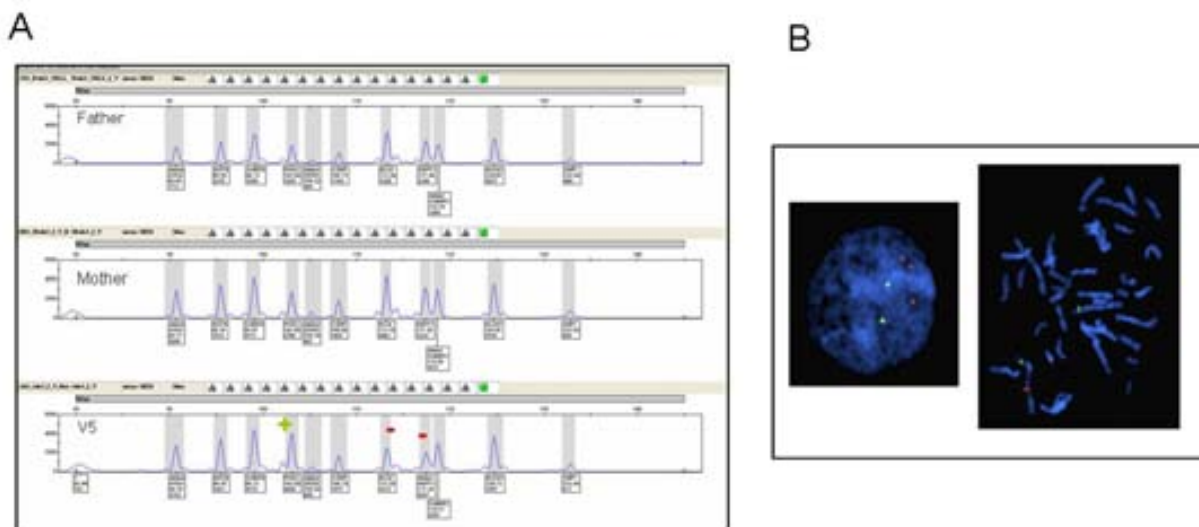


Figure 2. Detection and validation of the chromosome 1q21.1 rearrangements in patient V5 by FISH and MLPA. **A:** Electropherograms showing MLPA peak patterns corresponding to familial

analysis of case V5. **B:** Interphase and metaphase FISH images with 1q21.1 red BAC probes confirm the microduplication (RP11-293J20) and microdeletion (RP11-314N2). Green probe generated from CTD-2180H16 BAC clone was used as control probe from same chromosome (1p34.2).

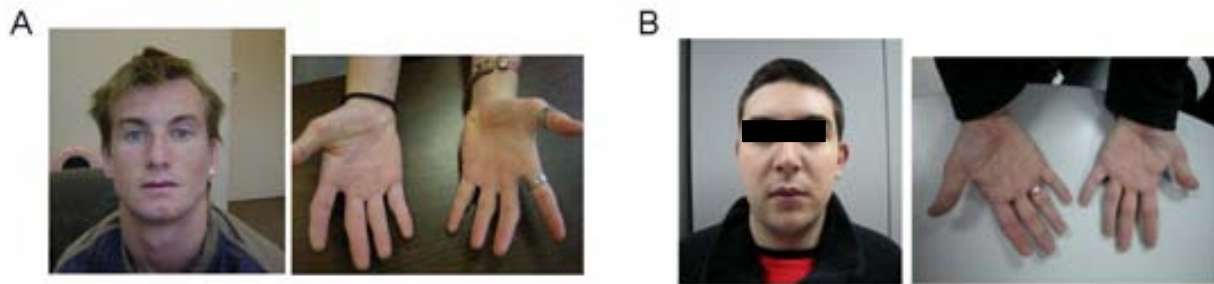


Figure 3: Facial appearance and hands of patients with 1q21.1 rearrangements. A: Patient V5 with **microduplication/microdeletion 1q21.1**: note frontal balding, arched eyebrows, deep-set eyes and thin upper lip, fingers with camptodactyly and mild interdigital membranes. **B:** Patient 112 with **microduplication 1q21.1**: Note moderate clinodactyly.

Discussion

The VCFS is a genomic disorder due to a hemizygous deletion on chromosome 22q11.2. Our set of 18 patients showed clinical features compatible with VCFS- like cardiac anomalies, learning disabilities and characteristic facial features but lacked the typical 22q11.2 deletion. We screened our patients with VCF-like phenotypes with two different custom-made aCGH (BAC-based whole genome and chromosome 22 specific tiling path). The genome-wide analysis of structural variations allowed us to identify *de novo* genomic rearrangements and inherited CNVs in these patients.

Five out of the 11 altered regions selected for validation were confirmed by MLPA, while the other six showed no variation. Although the non-confirmed CNVs were screened with two MLPA different probes, indicating that they could be aCGH false positives, we have to consider the possibility that the designed MLPA probes might lie outside the BAC variable region. Recent reports indicate that the size of the CNVs identified by BAC arrays is likely to be overestimated. In fact, the concordance rate for CNVs identified by two different platforms (BAC vs. SNP arrays) was less than half (43%) when studying the same individuals [32]. Concerning the five validated variations, the analysis of parental samples revealed that four of them were inherited. The presence of parents carrying these CNVs but without clinically evident phenotypes raises the issue of whether these CNVs are benign or pathogenic variants with incomplete penetrance. Indeed, some well-

Resultats: Estudi II-A

characterized syndromes such as the 22q11.2 microdeletion or the reciprocal microduplication, include phenotypically mild deletion carriers that have escaped clinical recognition until they had children with more severe manifestations. Furthermore, it is still possible that the presence of an inherited CNV, especially deletions, could be uncovering a recessive allele inherited from the other parent. Further work in this direction would be required to evaluate these hypotheses.

Two *de-novo* chromosome rearrangements were identified by aCGH and MLPA analysis in one patient with VCFS-like features. This is, to our knowledge, the first time that this combination of two CNVs (an interstitial microduplication, spanning 2 BAC clones with an estimate size of 212 kb (chr1: 144149999-144361868) and a contiguous microdeletion spanning 5 BAC clones with an estimate size of 1.15 Mb (chr1:145068638-146342725) is found associated with such a phenotype.

This 1.15-Mb microdeletion was first reported in three cases of CHD. The authors screened by real-time quantitative PCR a total of 505 unrelated congenital heart disease cases for deletions or duplications of Cx40 gene (*GJA5*) and identified three cases with a 1.5 to 3-Mb deletion of this region; however the microdeletion was also present in some unaffected parents [33]. Recently, this 1.15 Mb microdeletion has been associated with schizophrenia and it has also been reported in individuals with considerable phenotypic diversity including cardiac abnormalities, mild-to-moderate mental retardation, microcephaly, cataracts, mullerian aplasia, and autism [30, 32-39]. Nowadays, the main clinical features associated with this rearrangement are still unclear and the evaluation of family members has revealed apparently unaffected carriers, making genetic counselling difficult. However, the absence of this rearrangement in more than 5,000 normal individuals analyzed suggests that this structural variant is rare, and probably contains important modifiers since it exhibits incomplete penetrance.

Eight genes of this region could be involved in a wide variety of phenotypic features, at least two potentially involved in cardiac defects: *PRKAB2* and *GJA5* (Cx40), both expressed in the heart. A *Cx40* heterozygous knockout mice (+/-) has been shown to develop a number of cardiac malformations including bifid atrial appendage, ventricular septal defect, tetralogy of Fallot and aortic arch abnormalities [40]. *GJA8* has previously been reported associated with schizophrenia [41].

Although previous individuals have been found to carry this microdeletion (1.15 Mb), this is the first time that it is reported in concurrence with the contiguous microduplication (212 kb). The only evident clinical feature shared by the two cases

reported here is the CHD. This region contains numerous segmental duplications that could mediate genomic rearrangements. Some larger rearrangements encompassing the 1q21.1 region have been reported associated with varying phenotypes that included dysmorphic features, hypotonia or mental retardation. Among those, there are some cases with supernumerary marker or ring chromosomes derived from the pericentromeric region of chromosome 1 plus q-arm euchromatic fragments, [42-45]. Furthermore, it has been reported that the reciprocal microdeletion of 1q21.1 is necessary but not sufficient to cause TAR syndrome [46], characterized by bilateral absence of the radii and thrombocytopenia, also the lower limbs, gastrointestinal, cardiovascular and other systems may be involved [47].

Conclusions

In summary, this is the first study in which aCGH is used to investigate patients with VCFS-like phenotype without the classical 22q11.2 molecular rearrangement. aCGH provides a successful strategy in order to characterize additional submicroscopic aberrations in patients that fail to show alterations in 22q11.2. We have identified a rare and *de novo* 1q21.1 microdeletion and a novel microduplication that could be associated with CHD. Further new cases shall contribute to delineate more precisely the clinical implications of these newly recognized genomic alterations on 1q21.1 loci and their implication in CHD.

List of abbreviations used

aCGH: Array-based comparative genomic hybridization

ADHD: attention-deficit-hyperactivity disorder

CHD: congenital heart defects

CNVs: Copy number variants

DGS: DiGeorge Syndrome

FISH: fluorescence *in situ* hybridization

MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification

TAR: thrombocytopenia-absent radius

VCFS: Velocardiofacial syndrome

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests

Authors' contributions

AB participated in the construction and validation of the tiling-path 22 chromosome CGH array, analysis and interpretation of array results, carried out the FISH and MLPA analysis and drafted the manuscript.

LLA participated in the design of the study, construction and validation of the whole genome array, interpretation of data and helped to draft the manuscript.

DH contributed with samples collection of patients with CHD and carried out of MLPA analysis on 1q21.1 region.

JR contributed with clinical evaluation of patient 112 and revision of clinical data.

MG-A participated in the design, construction and validation of the whole genome and tiling-path 22 chromosome CGH array, analysis and interpretation of array results.

EG contributed with clinical evaluation of VCFS-like patients, samples collection of their parents and participated in the revision of clinical data reported in the manuscript.

XE and **MG** participated in the conception, design and coordination of the study, in the revision of the manuscript and final approval of the version.

Acknowledgements

We are indebted to patients and relatives for their support. Written consent was obtained from the patients or their relatives for publication of the patient's image. This work was funded by the Spanish Ministry of Health (RETIC G03/184 to XE and MG), the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2005-01005 to XE), the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2008-00357 to XE), the European Commission (EU FP6 037627) and Fundació Parc Taulí Institut Universitari, Sabadell.

References

1. McDermid HE, Morrow BE: **Genomic disorders on 22q11**. *Am J Hum Genet* 2002, **70**(5):1077-1088.
2. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM *et al*: **A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population**. *Pediatrics* 2003, **112**(1 Pt 1):101-107.
3. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M *et al*: **Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study**. *J Med Genet* 1997, **34**(10):798-804.
4. Cohen E, Chow EW, Weksberg R, Bassett AS: **Phenotype of adults with the 22q11 deletion syndrome: A review**. *Am J Med Genet* 1999, **86**(4):359-365.
5. Gerdes M, Solot C, Wang PP, Moss E, LaRossa D, Randall P, Goldmuntz E, Clark BJ, 3rd, Driscoll DA, Jawad A *et al*: **Cognitive and behavior profile of preschool children with chromosome 22q11.2 deletion**. *Am J Med Genet* 1999, **85**(2):127-133.
6. Hay BN: **Deletion 22q11: spectrum of associated disorders**. *Semin Pediatr Neurol* 2007, **14**(3):136-139.
7. Kobrynski LJ, Sullivan KE: **Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes**. *Lancet* 2007, **370**(9596):1443-1452.
8. Perez E, Sullivan KE: **Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes)**. *Curr Opin Pediatr* 2002, **14**(6):678-683.
9. Robin NH, Shprintzen RJ: **Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2**. *J Pediatr* 2005, **147**(1):90-96.
10. Frohn-Mulder IM, Wesby Swaay E, Bouwhuis C, Van Hemel JO, Gerritsma E, Niermeyer MF, Hess J: **Chromosome 22q11 deletions in patients with selected outflow tract malformations**. *Genet Couns* 1999, **10**(1):35-41.
11. Sivertsen A, Lie RT, Wilcox AJ, Abyholm F, Vindenes H, Haukanes BI, Houge G: **Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate**. *Am J Med Genet A* 2007, **143**(2):129-134.
12. Smith A, St Heaps L, Robson L: **Apparently unrelated cytogenetic abnormalities among 462 probands referred for the detection of del(22q) by FISH**. *Am J Med Genet* 2002, **113**(4):346-350.
13. Katzman PJ, Wang B, Sawhney M, Wang N: **Differential detection of deletion 22q11.2 syndrome by specialty and indication**. *Pediatr Dev Pathol* 2005, **8**(5):557-567.
14. Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballin MR, Guitart M: **Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome**. *Am J Med Genet A* 2006, **140**(22):2426-2432.
15. Fernandez L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares M, Martinez I, Fernandez B, Quero J, Garcia-Guereta L, Garcia-Alix A, Burgueros M *et al*: **Unrelated chromosomal anomalies found in patients with suspected 22q11.2 deletion**. *Am J Med Genet A* 2008, **146A**(9):1134-1141.
16. Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P: **A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes**. *Nat Genet* 1996, **13**(4):458-460.
17. Van Esch H, Groenen P, Fryns JP, Van de Ven W, Devriendt K: **The phenotypic spectrum of the 10p deletion syndrome versus the classical DiGeorge syndrome**. *Genet Couns* 1999, **10**(1):59-65.
18. Berend SA, Spikes AS, Kashork CD, Wu JM, Daw SC, Scambler PJ, Shaffer LG: **Dual-probe fluorescence in situ hybridization assay for detecting deletions associated with VCFS/DiGeorge syndrome I and DiGeorge syndrome II loci**. *Am J Med Genet* 2000, **91**(4):313-317.

Resultats: Estudi II-A

19. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S *et al*: **Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome.** *Lancet* 2003, **362**(9393):1366-1373.
20. Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE, Rauch A: **Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions.** *Am J Hum Genet* 2007, **80**(3):510-517.
21. Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M *et al*: **BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation.** *Am J Med Genet A* 2006, **140**(3):205-211.
22. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L *et al*: **Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features.** *J Med Genet* 2004, **41**(4):241-248.
23. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K: **Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients.** *Eur Heart J* 2007, **28**(22):2778-2784.
24. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG: **Identification of disease genes by whole genome CGH arrays.** *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No. 2**:R215-223.
25. Cusco I, del Campo M, Vilardell M, Gonzalez E, Gener B, Galan E, Toledo L, Perez-Jurado LA: **Array-CGH in patients with Kabuki-like phenotype: identification of two patients with complex rearrangements including 2q37 deletions and no other recurrent aberration.** *BMC Med Genet* 2008, **9**:27.
26. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP *et al*: **DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003, **36**(4):361-374.
27. Wang NJ, Liu D, Parokonny AS, Schanen NC: **High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage.** *Am J Hum Genet* 2004, **75**(2):267-281.
28. Pantano L, Armengol L, Villatoro S, Estivill X: **ProSeeK: A web server for MLPA probe design.** *BMC Genomics* 2008, **9**(1):573.
29. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G: **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(12):e57.
30. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D *et al*: **Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes.** *N Engl J Med* 2008, **359**(16):1685-1699.
31. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C: **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nat Genet* 2004, **36**(9):949-951.
32. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W *et al*: **Global variation in copy number in the human genome.** *Nature* 2006, **444**(7118):444-454.
33. Christiansen J, Dyck JD, Elyas BG, Lilley M, Bamforth JS, Hicks M, Sprysak KA, Tomaszewski R, Haase SM, Vicens-Wyhony LM *et al*: **Chromosome 1q21.1 contiguous gene deletion is associated with congenital heart disease.** *Circ Res* 2004, **94**(11):1429-1435.
34. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A *et al*: **Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia.** *Science* 2008, **320**(5875):539-543.
35. Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, Brenner V, Kim CA, Otto PA, Rosenberg C: **Genomic imbalances associated with mullerian aplasia.** *J Med Genet* 2008, **45**(4):228-232.

36. Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L *et al*: **Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements.** *Nat Genet* 2007, **39**(3):319-328.
37. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE *et al*: **Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia.** *Nature* 2008, **455**(7210):232-236.
38. **Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia.** *Nature* 2008, **455**(7210):237-241.
39. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M *et al*: **Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities.** *Nat Genet* 2008.
40. Gu H, Smith FC, Taffet SM, Delmar M: **High incidence of cardiac malformations in connexin40-deficient mice.** *Circ Res* 2003, **93**(3):201-206.
41. Ni X, Valente J, Azevedo MH, Pato MT, Pato CN, Kennedy JL: **Connexin 50 gene on human chromosome 1q21 is associated with schizophrenia in matched case control and family-based studies.** *J Med Genet* 2007, **44**(8):532-536.
42. Barbi G, Spaich C, Adolph S, Rossier E, Kehrer-Sawatzki H: **Supernumerary der(1) marker chromosome derived from a ring chromosome 1 which has retained the original centromere and euchromatin from 1q21.1 --> q21.3 with substantial loss of 1q12 heterochromatin in a female with dysmorphic features and psychomotoric developmental delay.** *Am J Med Genet A* 2005, **132**(4):419-424.
43. Finelli P, Cavalli P, Giardino D, Gottardi G, Natacci F, Savasta S, Larizza L: **FISH characterization of a supernumerary r(1)(:cen-->q22::q22-->sq21::) chromosome associated with multiple anomalies and bilateral cataracts.** *Am J Med Genet* 2001, **104**(2):157-164.
44. Giardino D, Bettio D, Gottardi G, Rizzi N, Pierluigi M, Perfumo C, Cali A, Dagna Bricarelli F, Larizza L: **FISH characterization of two supernumerary r(1) associated with distinct clinical phenotypes.** *Am J Med Genet* 1999, **84**(4):377-380.
45. Ramirez-Duenas ML, Gonzalez GJ: **fra(1) (p11), fra(1) (q22) and r(1) (p11q22) in a retarded girl.** *Ann Genet* 1992, **35**(3):178-182.
46. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM *et al*: **Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome.** *Am J Hum Genet* 2007, **80**(2):232-240.
47. Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, Ancliff PJ, Brunner HG, Verschuuren-Bemelmans CC, Vernon E, Brown KW, Newbury-Ecob RA: **Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study.** *J Med Genet* 2002, **39**(12):876-881.

Description of additional data files

Additional file 1.doc

Supplementary Table 1. Comparison of the presence or absence of 44 CNV regions in patients with velocardiofacial-like syndrome (VCFS-like)

Additional file 2.doc

Supplementary Table 2. Selected regions for validation studies and designed MLPA probes used for detecting copy number changes by MLPA in patients with VCFS-like.

Additional file 3.doc

Supplementary Table 3. Selected oligonucleotide sequences used for detecting CNVs on 1q21.2 region by MLPA in patients with VCFS-like. Sequences of designed MLPA probes used for MLPA screening in the 1q21.1 region.

Additional file 4.jpeg

Supplementary Figure 1: Array CGH results for deletion cases V5 and 112 (Build 36, chr1:143,500,000-148,000,000). For each patient, deviations from 0 of probe \log_2 ratios are depicted by vertical bars, with those exceeding a threshold of 1.5 SD from the mean probe ratio shown in green (gains) or red (losses). The region of the microdeletion associated with TAR syndrome is indicated with a circle.

Supplementary Table 1. Copy number changes detected by BAC array-CGH. Comparison of the presence or absence of 44 CNV regions in patients with velocardiofacial-like syndrome (VCFS-like) and control samples. Numbers indicate gains or losses of each BAC. The eleven regions validated by MLPA are highlighted.

Chr	Region	Size (Kb)	PATIENTS (n=18)		CONTROLS (n=20)		Altered clones	Start (Build 36)	End (Build 36)	LOCUS (Database of Genomic Variants)	Genes (within the BAC clone)	Validate by MLPA
			GAIN	LOSS	GAIN	LOSS						
1	1p36.33	0		1			RP11-772F06			Locus 0052 Locus 0053	PUSL1, CPSF3L, TAS1R3, DVL1, MXRA8, MRPL20, WARP, FLJ37183, ATAD33	
1	1p36.21	660		1;1	1;1		RP11-583G23 RP11-707I5	12730060	13389999	Locus 0130	C10orf158, DHRS3, PRAMEF3, PRAMEF4, HNRPCL1, PRAMEF2, PRAMEF9, PRAMEF7, PRAMEF8, RP11-474O21.1, PRAMEF5, PRAMEF6, PRAMEF1, PRAMEF15, PRAMEF14, PRAMEF18, PRAMEF19, PRAMEF16	
1	1p36.11	180		4			RP11-335G20	25327725	25507851	Locus 0157	RHD, TMEM50A, RHCE	
1	1p21.3	162	1				RP11-290I2	96478367	96640177	NO CNV		NO
1	1p21.1ishClones	119	8	2			RP5-1108M17	103893839	104012549	Locus 0273	AMY2B, AMY2A	
1	1q12	103		2			CTD-2118A8	120568788	120671324	Locus 0299	FAM72B	
1	1q21.1	212	1;1				RP11-315I20 RP11-293J20	144149999	144361868	Locus 0305	HFE2, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34, LIX1L, RBM8A, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, ZNF3G4	YES
1	1q21.1	1148		1;1;1;1;1			RP11-337C18 RP11-533N14 RP11-314N2 RP11-301M17 RP11-115G11	145073765	146329018	Locus 0305	PRKAB2, FM05, CHD1L, BCL9, ACP6, GJA8, GPR89A, NBPFF1, NBPFF1, FLJ39739	YES
1	1q21.1	172		2			RP11-429I8	147845219	148016956	Locus 0305		
2	2p22.1	179		1			RP11-457F14	40346699	40526041	Locus 0550	SLC8A1	
2	2p11.2	88	1	1	1		CTD-2148K13	87512069	87600376	Locus 0641		
2	2p11.2	211		2	1		RP11-316G9	89561552	89772752	Locus 0643		
2	2q13	165	1	2	1		RP11-330B16	112061368	112226421	Locus 0672		
2	2q21.1	165	1				RP11-32C20	130418003	130583445	Locus 0692	RAB6C, A26C1B	
5	5q13.2	61		3;1	3;0		RP11-551B22 RP11-195E2	70362440	70423291	Locus 1723	DKFZ686M0199, LOC728340, GTF2H2, LOC730394	
5	5q35.1	171		1			RP11-292M11	169611921	169783365	NO CNV	LCP2, KCNIP1, KCNMB1	NO

6	6p25.3	179	1	3				RP11-328C17 CTD-2310B5 RP11-713A24 RP11-743F19	177604 160912548 7138613	356249 161110580 7258467	Locus 1887 Locus 2178 Locus 2456	DUSP22, IRF4 ANXA4, LPA, PLG DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106A, DEFB106B, DEFB105A, DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, SPAG11A, DEFB103A, DEFB103B, DEFB4	NO NO
8	8p23.1	120	2	4:3	4:2	2:0	1	RP11-115E11 RP11-739E3	7176292	7893166	Locus 2456		
8	8p23.1	717	1:3	3:3	1:1	2:2		RP1-144M5 RP11-509F16 RP11-694L21	34483916 86620595	34660804 86875933	NO CNV Locus 2602	ROXO1L1	
8	8q12.1	177		1		3		RP11-513O17	58226061	58378511	Locus 2547		
8	8q24.23	186	3	5		6	1	RP11-356M23	137793540	137979653	Locus 2689		
9	9p13.1	152	1	1				RP11-293C6	39149715	39302027	Locus 2780	CNTNAP3	
10	10q11.22	744	1:3:1:1:1		0:2:0:0:0	0:1:0:0:0		RP11-314P12 RP11-292F22 RP11-192A16 RP11-30N1 RP11-115A11	46487806	47231326	Locus 2984	PPYR1, ANXA8L1, ANXA8	YES
10	10q23.2	177	4	2		7		RP11-322M19	88946983	89123875	Locus 3048	FAM22A, FAM22D	
14	14q11.2	196	4	2	2			RP11-449I24	19289488	19485285	Locus 3738	OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1	
15	15q11.2	609	4:3:4:4:4	5:2:2:1:2	2:1:1:2:0	2:1:1:0:0		RP11-118E23 RP11-717D19 RP11-32B5 RP11-2F9 RP11-603B24	19484741	20094181	Locus 3879	OR4M2, OR4N4, LOC650137	
15	15q25.3	172	1	2				RP11-103E2	84687961	84859560	NO CNV	AGBL1	NO
16	16p11.2	2627	1:2:0:1:0	3:3:1:0:1	0:0:0:2:1	0:2:0:0:1		RP11-545B4 RP11-264M14 RP11-274A17 RP11-577D6 RP11-488I20	31864841	34491828	Locus 4060	LOC729355, TP53TG3	
16	16q22.1	201	2	3	6	3		RP11-530B22	68598107	68799077	Locus 4104	PDPR, MGC34761	
19	19q13.42	686	1:1		1:0	1:0		CTD-2337J16 RP11-749K3	59383665	60069408	Locus 4536	MB0A77, TSEN34, RP59, LILRB3, LILRA6, LILRB5, LILRB4, KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR3DL2	
20	20p12.3	16	1					RP5-1140M3	8198435	8214296	Locus 4567	PCLB1	

22	22q11.1	114	1				CTD-2177M20	14440103	14554197	Locus 4746		
22	22q11.1	499	2;1;1	1;0;0			RP11-377E20 RP11-532J16 RP11-561P7	14453375	14952669	Locus 4746	A26C3, OR11H1	
22	22q11.1	209	2	2			RP11-803J7	16096956	16305835	Locus 4746		
22	22q11.21	88	1	2			CTD-2280L11	18945707	19033820	Locus 4746		
22	22q11.21	159	1	3;1			RP11-818K20 RP11-444L7	19847992	20006849	Locus 4746		YES (V24) YES (V8)
22	22q11.21	18050	1	2			CTD-2295P14	20105069	20155079	Locus 4746	HIC2	
22	22q11.23	76	1				CTD-2300P17	23233656	23310014	NO CNV	UPB1, C22orf13, SNRPD3	NO
22	22q11.23	258	1;1	1;1	0;1		RP11-5017 RP11-261O10	23941648	24199456	Locus 4753	CRYBB2, IGLL3, LRP5L	
22	22q13.2	142	1				RP11-138G4	39422672	39564831	NO CNV	SLC25A17, ST13	YES
X	Xq22.2	233	1		1		RP11-402H1	102974612	103207477	Locus 4914	MGC39900, H2BFWT	
Y	Yq11.223	4325	1;1;1;1;1;1; 1;1;3	0;0;1;0;1; 1;0;1;0;0			RP11-241N3 RP11-376E17 CTD-2532F12 RP11-823D8 RP11-506M9 RP11-214M24 RP11-100J21 RP11-245K4 RP11-270H4 RP11-130Z4	22402126	26727178	Locus 4981	PRY, RBMY1J, RBMY1E, PRY2, RBMY1B, RBMY1F, RBMY1A1, RBMY1D, PRY, DAZ1, DAZ4, BPY2C, PRY2, DAZ2, BPY2B, DAZ3, BPY2, CDY1B, CDY1	

Supplementary Table 2. Selected regions for validation studies and oligonucleotide sequences used for detecting copy number changes by MLPA in patients with VCFS-like.

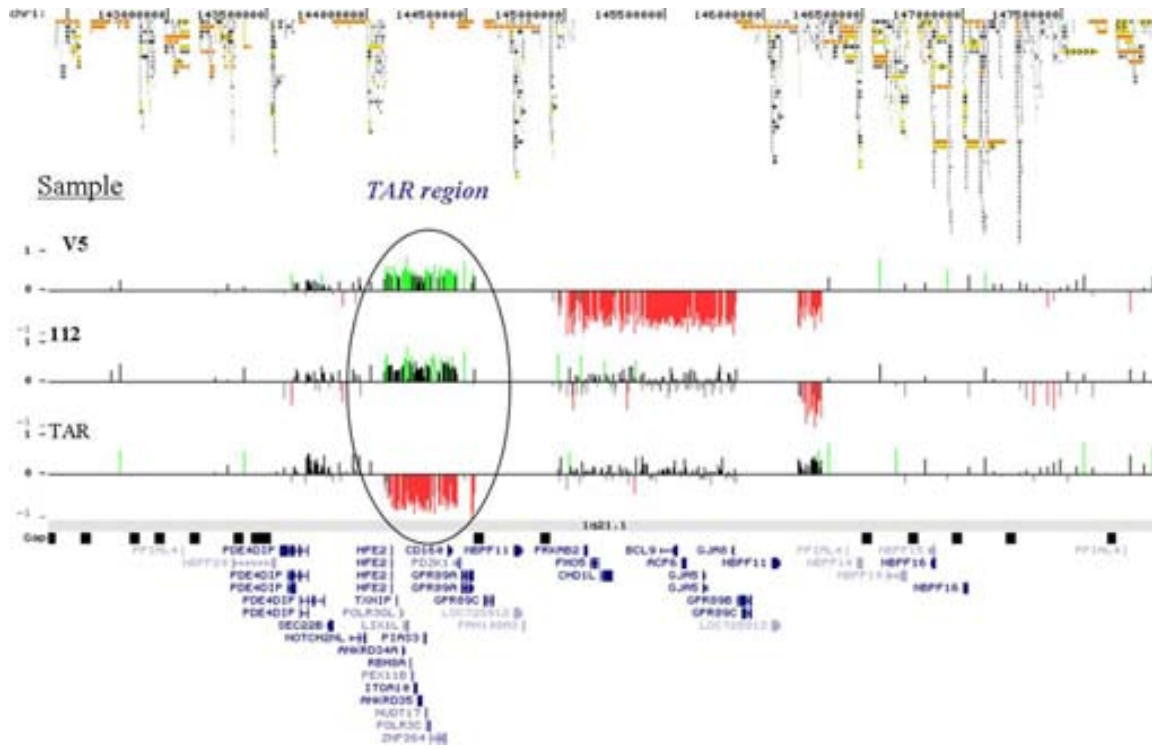
Chr Band	Target Clone	MLPA probe	START probe	END probe	Upstream hybridising sequence	Downstream hybridising sequence
1p21.3	RP11-29O12	RP11-29O12	96593985	96594033	GAGCTGCACCCACATGTGCCA	TTCAGGCCAGGATGCTGTTTACTGC
1p21.3	RP11-29O12	RP11-29O12b	96488449	96488504	GGCCAGAAAGTGGTATATGACATGGT	TGAGACAATTGATGACCTTTCTCCCTA TTT
1q21.1	RP11-315I20	GNRH2	144226590	144226642	GAAGTTTCCTTACACCTGAACGGGATC	CAAGCGGGTTGAGTACTGCTGCCTGG
1q21.1	RP11-293J20	PIAS3	144291617	144291679	GCTCGACTCTCAGCCACTGTTCCCAA C	ACCATTGTGTCAATTGGTCATCTGAG TTCGGACGG
1q21.1	RP11-533N14	BCL9	145481202	145481277	CTGATATGAGCCCCCGCATTCTAAGTCC GAATACAT	AGGCCCAACCCTCTGTGCTATCTGG
1q21.1	RP11-301M17	NBPF1	146293510	146293542	CGGAACACTTTGGATGCGGCTTATGG TGGGTCT	CGGAACACTTTGGATGCGGCTTATGG TGGGTCT
5q35.1	RP11-292M11	RP11-292M11	169642831	169642890	GAAAGATCCCACCCAGCCCATTCGC A	ATGTGTTGATAAATCTCCCGTTCACAC
5q35.1	RP11-292M11	RP11-292M11b	169744026	169744084	GATGGTCTTCACCAGATTAAGAGTC CAGCCTGGA	ATCGCTTCAGCGTTGTGAAGAGTG
8p12	RP1-144M5	RP1-144M5	34531103	34531158	CAGATAATCAGGGCTCCCTCTTTTCTT	TCCAAAGGGAGAACAGGGGCATGGCC AAG
8p12	RP1-144M5b	RP1-144M5b	34641596	34641651	GTGTGTGGATTGGGGGTCTAAA	TATCATCCCACACACTAGCAGACTAGT TAAAGTG
8q21.2	RP11-509F16	RP11-509F16	86673078	86673136	GTGGACAATGCTTAAAGAAAGCAGAG CCT	TGTGTAATTACCTGAAATGCACAGTCTA TTG
8q21.2	RP11-509F16b	RP11-509F16b	86632867	86632927	CAGTAACTCATTGCCTCAGTTGCTCTA T	AAGACATAGAAGAAAAGCTGTTTGGG ATAAGAG
10q11.22	RP11-314P12	PPYR1	46507740	46507809	CAACCCATTCTATGGCTTTCTCAA CACC	AACTTCAAG AAGGAGATCA AGGCCCTGGT GCTGACTTGC
15q25.3	RP11-103E2	RP11-103E2	84743979	84744038	CACATTATTCAGCTCACAGCTGGTT GCTTTGGAT	TCCCAAATGGCAGGCCAGCTTCTC
15q25.3	RP11-103E2b	RP11-103E2b	84843618	84843673	GGGTTGGGGTCTGTGGCTATGCAA	TTTCGAACGAAGTGTAAATGGAACCAG G

22q11.21	RP11-444L7	RP11-444L7	19995363	19995422	ATGTATAAGCCCTAAAGCAACGAGCC CAAG	AGCCCCAGACACTGCCCATCATCAT AAAG
22q11.23	CTD-2300P17	C22orf13	23267064	23267120	GACCAGTCTAGAGCCAAACCCGGTCT C	TGAAACCCAGAAAGGGCTGCCCAACTA ACAG
22q11.23	CTD-2300P17	UPB1	23251796	23251844	CACCTCTGCCCCAGTGGATTAGCA	AGTGTGGCAGGCTTAACATGTCCAG
22q13.2	RP11-138G4	SLC25A17b	39499838	39499893	GATGGCTGCTGAAGGAGAGACACGGAA TG	TGAGGCATCTACAAAAGCTCACCTTACT C

Supplementary Table 3. Selected oligonucleotide sequences used for detecting CNVs on 1q21.2 region by MLPA in patients with VCFS-like.

Chr Band	Target Gene	START probe	END probe	Upstream hybridising sequence	Downstream hybridising sequence
22q11.2	HIRA	17698971	17699021	CCCTCAGGATGTCGAGCTGTCCGTGAC	ACTCGGTGAAGAGGGCGCTGGAATC
1p13.2	NGFB	115635119	115635174	CTACCCTGCCCTTGACATCTGCTGGTTTGA	CTGAAC TGACTTCACAAAAGTTCTCTACAC
1p36.3	GABRD	1949185	1949243	CATGGCACGGATTGATA TTGTTGAGCCAGTGC	AGCAGCCCCCTGTGTGCACCTGACAAC
1q21.1	PIAS3	144291617	144291679	GCTCGACTCTCAGCCACTGTTCCCAAC	ACCATTGTGTCAATTGGTCACTGTAGTTCCGGA CGG
4p16.1	DRD5	9552719	9552778	CAACGGCAGGGACCACAATCACTCCAACA	GGTATGCCCAGGTACTCTCCTGTGGGAGAA
22q11.2	COMT	18335516	18335575	CTGGTGAAGATGGGGGTCTGCAAATGCAG	GAGCTTGGGGATGTCCAGAACTGACCCCAA
1q21.1	BCL9	145481202	145481277	CTGATATGAGCCCCCGCATTCTAAAGTCCGAATA CAT	AGCCCCAACCTCTGTGCTATCTGG
1q21.1	NBPF1	146293501	146293577	CGGAACACTTTGGATCGGGCTTATGGTGGGT CT	CGGAACACTTTGGATCGGGCTTATGGTGGGTCT
6p22.1	GABBR1	29681943	29682003	GCCCTAAGCTCCTCATAGCAAAAAGAGCAAC	TCTCCCCATTCTCAGAAAAGATTAGTGCA
3q26.3	NLGN1	174791897	174791956	CAGGAAACCATTATTGCTGTTCGGTGCCCTT	ATGTGAAAGGCGTTGGTGGTCTTAGTCCAG
1p36.1	SMP1	25539567	25539658	GTCTG GAT TTC TAG AGG GCT TGA GAT GCT CAG AAT GCA TTG ACT GGG GGG A	AAA GCG CAA TAC TAT TGC TTC CAT TGC TGC TGG TGT ACT AGT

Resultats: Estudi II-A



Supplementary Figure 1: Array CGH results for deletion cases V5 and 112 (Build 36, chr1: 143,500,000-148,000,000).

Estudi II-B

Identificació d'una microduplicació a 15q13.1 mitjançant *array*-CGH en pacients amb esquizofrènia i trets dismòrfics

L'esquizofrènia és una malaltia complexa causada per una combinació de factors genètics i ambientals. La hipòtesi que l'esquizofrènia pot ser originada per reordenaments cromosòmics no és recent. S'han descrit anomalies en el cariotip de pacients i/o famílies amb esquizofrènia que han contribuït a descobrir gens potencialment implicats en la malaltia, com el *DISC1*, *PDE4B* (Chubb et al., 2008) i *NPAS3* (Kamnasaran et al. 2003). També la microdeleció 22q11.2 és un clar exemple d'anomalia cromosòmica associada amb l'esquizofrènia, ja que augmenta fins a 25 vegades el risc de desenvolupar la malaltia.

En aquest treball ens varem proposar identificar mitjançant *array*-CGH reordenaments submicroscòpics que poguessin conferir un major risc a patir la malaltia. Es van incloure a l'estudi onze pacients amb esquizofrènia i trets facials dismòrfics associats a la SDG/VCF que van ser analitzats utilitzant els mateixos arrays de BACs i la mateixa estratègia exposats en el treball anterior (II-A). Es van identificar guanys i pèrdues de material genètic en un total de 49 BACs, que corresponen a 31 regions diferents del genoma (9 guanys, 16 pèrdues i 6 regions amb guanys i pèrdues alhora). En un pacient amb esquizofrènia de tipus paranoide es va poder validar l'existència d'un guany de 594 Kb a la regió 15q13.1 aparegut *de novo*. Aquesta CNV solapa amb una duplicació de 1.4Mb descrita prèviament en un pacient amb esquizofrènia (Kirov et al. 2008). L'alteració identificada en el nostre pacient suggereix el gen *NDNL2* com a candidat en l'etiologia de la malaltia.

Aquest mateix pacient, amb la duplicació 15q13.1, es va identificar també en l'estudi III d'aquesta tesi, i el trobem descrit en la publicació derivada (Rodríguez-Santiago et al. 2009), a l'annex I.

Aquesta anàlisi d'*array*-CGH en onze pacients esquizofrènics no ha estat sotmesa a publicació, a continuació s'exposen els resultats d'aquest treball.

Resultats

Per aquest treball es van seleccionar 11 pacients amb diagnostic d'esquizofrènia i trets facials dismòrfics associats a la SDG/VCF. Tots ells de sexe masculí i d'edats compreses entre els 26 i 55 anys (Taula 4.1). En tots els pacients es va realitzar l'anàlisi del cariotip i l'anàlisi de FISH per la regió 22q11.2 (sonda - LSI *TUPLE 1* SpectrumOrange/LSI *ARSA* SpectrumGreen – Abbott Molecular), descartant així anomalies citogenètiques i la microdeleció 22q11.2.

Mitjançant hibridació genòmica comparada amb dos *arrays* de BACs es van identificar guanys i pèrdues de material genètic amb un total de 49 sondes BAC, que corresponen a 31 regions del genoma diferents (9 guanys, 16 pèrdues, i 6 regions amb guanys i pèrdues). D'aquestes 31 regions, 24 estan representades per 1 sol BAC i 7 comprenen dos o més BACs consecutius (Taula 4.2). Per reconèixer i seleccionar quines d'aquestes 31 regions podien ser rellevants en la malaltia i, per tant, d'interès per a una posterior validació mitjançant MLPA, es va seguir els següents passos, esquematitzats en la Figura 4.1.

- 1- Per identificar quines variants solapaven amb CNVs ja descrites es van creuar les coordenades de les 31 regions, que mostraven guanys i pèrdues, amb la base de dades de variants genòmiques (DGV) (Database of genomic variants - <http://projects.tcag.ca/variation/>). Quatre regions, representades cadascuna d'elles per un sol BAC, no apareixien com a CNV en la base de dades i 27 regions ja estaven descrites com a variables.
- 2- Amb el mateix array de 5,6K s'havien hibridat prèviament 20 mostres control (Cusco et al. 2008). Els resultats d'aquestes hibridacions els vam utilitzar per descartar 14 BACs que també havien mostrat variació en aquestes mostres d'individus control.
- 3- Després d'aplicar aquests dos filtres (punt 1 i 2) quedaren 17 CNVs només identificades en els 11 casos amb esquizofrènia, de les quals 2 no constaven com a variables a la base de dades, mentre que les altres 15 que ja havien estat prèviament descrites com a CNVs (3 representades per més d'un BAC i 12 que implicaven un únic BAC). A més a més hi havia 6 CNVs que van ser detectades mitjançant l'*array* específic pel cromosoma 22 i per les quals no disposavem de dades en mostres control.
- 4- Donat que l'objectiu d'aquest treball era identificar variants estructurals poc freqüents o rares, que com la microdeleció 22q11.2 augmentessin el risc per

l'esquizofrènia, es van classificar i seleccionar, en funció de la informació recollida a la DGV, les CNVs rares. Cal tenir present que la selecció es va fer el 2007, i la informació disponible en la DGV era molt menor a l'actual.

Finalment doncs, es van considerar 9 regions com a candidates, dues no descrites com a CNVs en les bases de dades i 7 que solapaven amb CNVs rares. D'aquestes 7 regions, tres es van excloure (indicades en vermell a la Figura 4.1) perquè tots tres (representades per un sol BAC) havien mostrat alteracions en altres mostres amb diferents patologies analitzades amb aquests arrays. A més a més, el BAC RP11-335G20, conté els gens del grup sanguini Rh, antigen D (RHD), altament variables i inclou diverses seqüències de duplicacions segmentàries amb un alt percentatge d'identitat (98%). El BAC CTD-2280L11 també forma part d'una duplicació segmentària (LCR22-B), mentre que el BAC RP11-803J7 no inclou a cap gen.

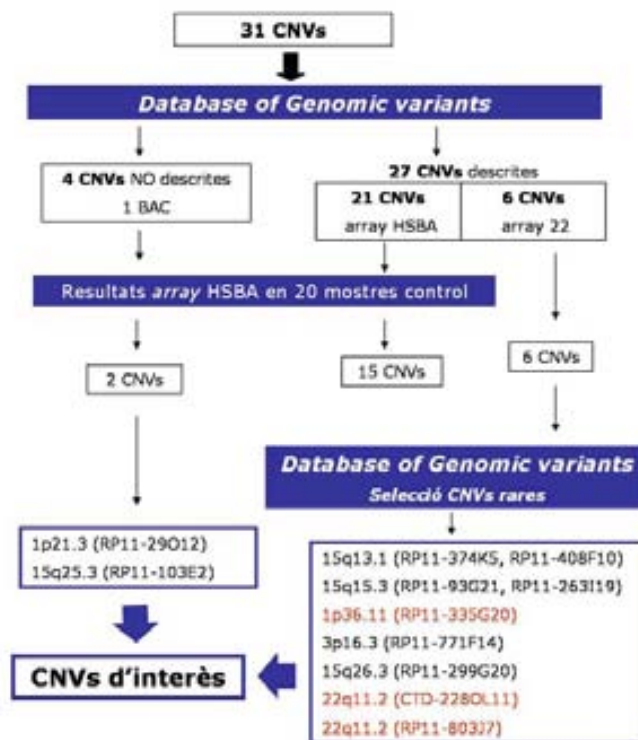


Figura 4.1: Esquema que resumeix els criteris que es van adoptar en la selecció de les CNVs potencialment d'interès en l'esquizofrènia. De les 31 regions identificades amb guanys i pèrdues, 27 estaven descrites com a variables en la base de dades DGV, i 4 no solapaven amb CNVs previament descrites. En un segon filtre es descarten les regions que també havien mostrat variació en 20 mostres control (previament hibridades amb l'array de 5,6K). Respecta l'array específic del cromosoma 22 no es disposa de resultats en mostres controls, per tant hi ha 6 CNVs que escapen aquesta segon filtre. Finalment entre les CNVs no presents en mostres control, es selecciona les rares i s'exclouen tres BACs (en vermell) amb alteracions en diverses mostres i/o solapants amb duplicacions segmentàries.

De les sis regions seleccionades per ser validades, tan sols una va poder ser verificada (Taula 4.3) mitjançant MLPA. Aquesta CNV consisteix en un guany de dos BACs a la banda 15q13.1 (RP11-408F10 i RP11-374K20) i es va determinar que era apareguda *de novo* en un pacient diagnosticat d'esquizofrènia de tipus paranoide (edat d'inici 24 anys) sense altres antecedents familiars de malaltia psiquiàtrica. Per delimitar amb més precisió el tamany d'aquesta microduplicació vam analitzar el cas (EZ-22) emprant un array de SNPs amb major resolució (Illumina 370Duo), que va permetre identificar un guany de 470Kb a 15q13.1, comprès entre els SNPs rs7497314 i rs260546 i que incloïa el gen *NDNL2* (arr 15q13.1(B36:27261995-27730663)x3) i part del gen *KIAA0574* (Figura 4.2). El gen *KIAA0574* codifica per una hipotètica proteïna transmembrana LOC23359 de funció desconeguda. Aquest gen va ser identificat inicialment en un extens projecte de seqüenciació derivat de cDNAs de cervell (Negase et al., 1998).

En un treball previ (Kirov et al., 2008a) es descriu una duplicació d'un segment cromosòmic solapant, també *de novo*, en un pacient amb esquizofrènia de tipus desorganitzat amb una edat d'inici de 23 anys i sense antecedents familiars. En aquest cas, la duplicació era d'1.4Mb i incloïa tres gens (*APBA2*, *KIAA0574*, *NDNL2* i *TJP1*) (vegeu Figura 4.2). En el seu treball s'apunta com a potencial candidat per l'esquizofrènia al gen *APBA2*, donada la seva interacció amb les neurexines i un possible paper en el complex SNARE que funciona d'intermediari vesicular en la neurotransmissor sinàptica (Biederer et al., 2000; Dulubova et al., 2007). El nostre pacient és, doncs, el segon cas amb esquizofrènia descrit a la literatura amb una duplicació *de novo* a la regió 15q13.1, i que, a diferència de l'anterior, permet delimitar la regió crítica i apuntar el gen *NDNL2* com a candidat pel fenotip (Rodriguez-Santiago et al. 2009).

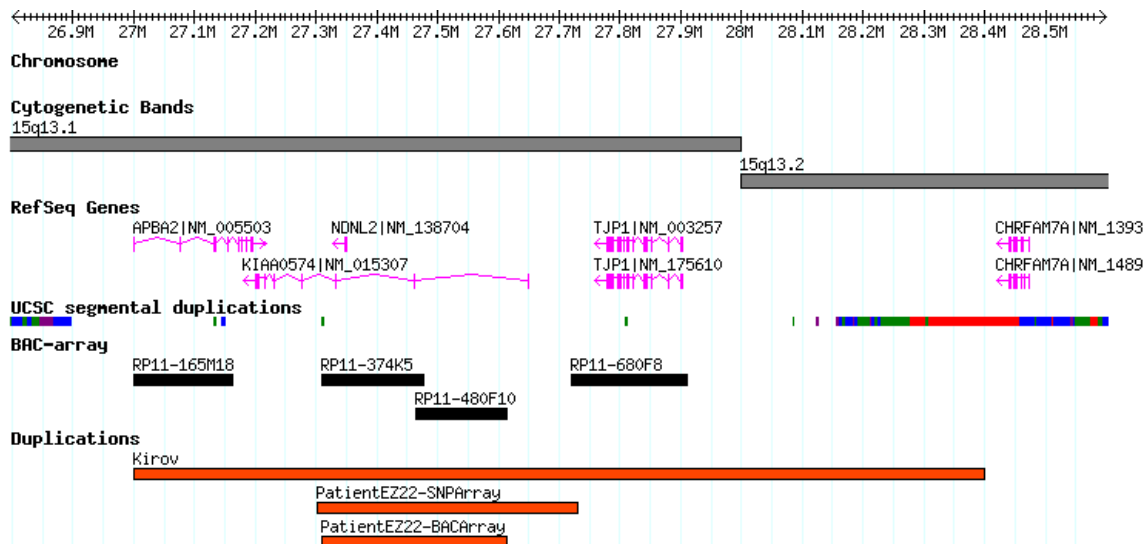


Figura 4.2: Representació de la localització i llargada de la microduplicació 15q13.1 identificada mitjançant l'array de BACs i de SNPs (illumina 370K) en el pacient EZ-22 en comparació amb la microduplicació prèviament descrita per Kirov et al., 2008.

El gen *NDNL2* codifica per una proteïna de funció desconeguda i s'expressa en múltiples teixits humans, especialment en testicles (Chibuk et al. 2001). Pel que coneixem avui dia sobre la seva funció, no sembla tenir una especial relació amb l'etiopatogènia de l'esquizofrènia. Això no obstant, es localitza en una regió cromosòmica fortament implicada en trastorns del neurodesenvolupament (Figura 4.3). La regió 15q11-q13 conté un domini subjecte a impronta i presenta una elevada inestabilitat degut a la presència d'elements repetitius de DNA (Christian et al. 1999). Diversos reordenaments cromosòmics impliquen aquesta regió: les delecions associades a les síndromes d'Angelman i Prader-Willi, translocacions amb altres cromosomes, inversions, i cromosomes marcadors formats per una duplicació invertida de la regió proximal del cromosoma 15, incloent sovint els gens *APBA2* i *NDNL2*. Aquests cromosomes marcadors es troben associats amb alteracions de la conducta, retard en el desenvolupament, retard mental i atacs d'epilèpsia (Leana-Cox et al. 1994; Flejter et al. 1996; Battaglia et al. 1997; Huang et al. 1997).

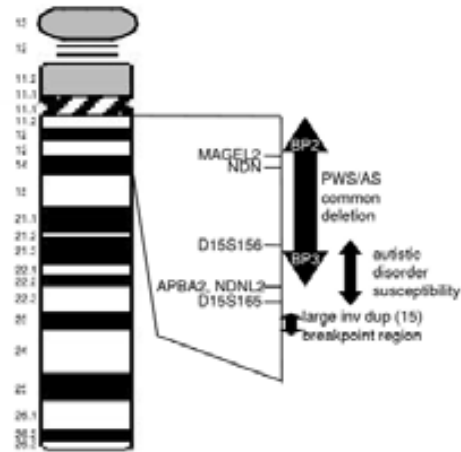


Figura 4.3: Regió 15q11-q14. Localització del gen *NDNL2*. La barra negra més gruixuda indica la deleció entre BP2 i BP3 associada a les síndromes Angelman i Prader-Willi. També s'indiquen els punts de trencament per la inv dup(15) més llarga i la regió de susceptibilitat al desordre autista. La distància física entre BP3 i els gens *APBA2* i *NDNL2* és encara desconeguda degut a la presència d'elements gaps en aquesta regió.

Taula 4.1: Recull la informació clínica dels 11 pacients analitzats per BAC-arrays.

MOSTRA	EDAT	EDAT INICI	ANTECEDENTS FAMILIARS	DIAFNÒSTIC EIX I DSM-IV	DIAFNÒSTIC EIX II DSM-IV	ALTRES OBSERVACIONS	NIVELL D'ESTUDIS	TRACTAMENT GENERAL
EZ-2	26	22	FAMILIAR	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Retard aprenentatge / trets facials dismòrfics / germà EZ	Estudis primaris	Benzodiacepinas
EZ-11	55	17	NC	EZ tipus paranoide episodi amb símptomes residuals interepisodi	Retard mental lleu	Talla baixa / trets facials dismòrfics	Estudis primaris	Anticolínergics
EZ-22	24	16	ESPORÀDIC	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Bon rendiment escolar / tímid	Estudis primaris	(Clozapina)
EZ-29	34	17	FAMILIAR	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Trets facials dismòrfics / TDAH	Estudis primaris	(Clozapina)
EZ-33	32	19	ESPORÀDIC	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Fill amb RM	Estudis primaris	Benzodiacepinas
EZ-44	31	17	ESPORÀDIC	Trastorn psicòtic no especificat	Trastorn límit de la personalitat	QI baix/ Trets facials (nas patata, arrel nasal ample, microretrognati a, orelles hipertrofiques, assimetria estructural)	Estudis primaris	Benzodiacepinas
EZ-54	26	20	ESPORÀDIC	EZ tipus paranoide	No diagnòstic		Estudis primaris	(Risperidona)
EZ-61	41	15	DUBTOS	EZ tipus desorganitzat	No diagnòstic	Trets facials dismòrfics / complic obstetriques	Sap llegir i escriure	Anticolínergics
EZ-74	28	20	MIXTE	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Cognició social (defic cognitives area visuo-espacial, mal ajust premorbid, alt teoria de la ment)	Estudis secundaris	Benzodiacepinas
EZ-99	48	22	NC	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Trets facials dismòrfics	Estudis secundaris	Anticolínergics
EZ-115	27	16	NC	EZ tipus paranoide	No diagnòstic	Una mica dismòrfic i poc mes	Estudis secundaris	Benzodiacepinas, anticolínergics, eutimizants

RM: Retard mental

TDAH: Trastorn d'atenció i hiperactivitat

ANTECEDENTS FAMILIARS: FAMILIAR: Hi ha algun familiar de primer grau afectat de malaltia psiquiàtrica; **MIXTE:** cap familiar de primer grau, però si de segon o més llunyans; **ESPORÀDIC:** no hi ha cap antecessor a la família de trastorn psiquiàtric a la família.

Taula 4.2: Comparativa de les CNVs detectades en els 11 pacients amb esquizofrènia respecte els 20 controls

Crom	Regió	llarg (kb)	20 CONTROLS		11 ESQUIZO		BAC alterat	Inici	Final	Database of Genomic Variants	Gens afectats	Resultat (MLPA)
			GUANY	PÈDUA	GUANY	PÈDUA						
1	1p36.11	180				1	RP11-335G20	25327725	25507851	CNV rara	RH gene locus	NORMAL
1	1p21.3	162			1	1	RP11-29O12	96478367	96640177	CNV	AMY2B, AMY2A	
1	1p21.1	119			2	2	RP5-1108M17	103893839	104012549	CNV	FCGR2A, HSP1, FCGR3A, FCGR2C, FCGR3B	
1	1q23.3	211	2		1	1	RP11-5K23*	159680001	159891048	CNV	CHL1	NORMAL
3	3p26.3	160			1	1	RP11-771F14*	356445	516438	CNV rara		NORMAL
4	4p15.1	171		2		1	RP11-24H13*	34462334	34632938	CNV		
5	5p14.1	142	2			1	RP11-706I13*	26905041	27046882	CNV rara	CDH9	
5	5p13.3	162		1		1	RP11-15A6*	34209792	34371608	CNV		
5	5q13.2	782	0;2;1	1;3;0		1;2;1	RP11-497H16 RP11-195E2 RP11-551B22 RP11- RP11-	69735185	70516922	CNV	SMA5, SERF1A, SERF1B, GTF2H2, SMN1, SMN2, NAIP	
6	6p25.3	87		2		1	RP1-93N13	3726578	3813478	CNV	HLA_DRB1	
6	6p25.3	179			2	3	RP11-328C17	177604	356249	CNV	DUSP22, IRF4	
8	8p23.1	662	1;1	2;2		1;2	RP11-739E3 RP11-115E11	7176292	7837793	CNV	DEFB105B, PJCG6, DEFB106A, DEFB109, LOC349196, DEFB104A, DEFA5, DEFB106B, DEFB4, SPAG11, ...	
8	8q21.2					3	RP11-509F16	86620595	86756907	CNV	REXO1L1	
8	8q21.2	290				1	RP11-694L21	86851015	86910934	CNV	REXO1L2P	
8	8q12.1	152		6		1	RP11-513O17	58226061	58378511	CNV		
8	8q21.13	182		1		1	RP11-733M18*	83584780	83767100	CNV		
10	10q24.1	170	1			3	RP11-153G4	98523679	98693465		LCOR	

14	14q11.2	196	2	7	3	2	RP11-449I24	19289488	19485285	CNV	OR4M1, OR4N2, OR4K2, PR4K5, OR4K1
15	15q11.2	609	2;1;1;2; 0	2;1;1;0; 0	2;1;1;3; 2		RP11-118E23 RP11-717D19 RP11-32B5 RP11-2F9 RP11-603B24	19484741	20094181	CNV	OR4M2, OR4N4 / mRNA AB066967, AB29428, AK093817, AL512723, AL834140
15	15q13.1	304			1;1		RP11-374K5* RP11-408F10*	27309882	27613843	CNV rara	NDNL2, KIAA0574
15	15q15.3	260				1;1	RP11-93G21* RP11-263I19*	41591933	41851765	CNV rara	STRC, CATSPER2, CKMT1B, PDIA3, HISPPD2A, CKMT1A
15	15q25.3	172				1	RP11-103E2	84687961	84859560	CNV	AGBL1
15	15q26.3	184				1	RP11-299G20*	99550359	99734009	CNV rara	CHSY1; SELS; SNRPA1; P-CSK6
16	16p11.2	131	0;0;1;0; 0;2	0;0;1;0; 0;0	0;0;0;0; 1;2	1;1;0;1; 0;0	RP11-545B4 RP11-264M14 RP11-274A17 RP11-577D6 RP11-613A8 RP11-488I20	31864841	31995752	CNV	
16	16q22.1	201	6	3		1	RP11-530B22	68598107	68799077	CNV	PDPR, MGC34761
22	22q11.1	114	ND	ND	1		CTD-217M20	14440103	14554197	CNV	
22	22q11.1	499	ND	ND	1;1;1;1		RP11-377E20 RP11-506K22 RP11-532J16 RP11-561P7	14453375	14952669	CNV	ACTBL1, OR11H1
22	22q11.1	209	ND	ND	1	3	RP11-803J7	16091510	16300389	CNV rara	
22	22q11.2	88	ND	ND		2	CTD-2280L11	18940261	19028374	CNV rara	
22	22q11.2	151	ND	ND		3	RP11-818K20	19842546	19993159	CNV	
22	22q11.2	50	ND	ND		2	CTD-2295P14	20099623	20149633	CNV	HIC2

* BACs que no han estat identificats com a CNV ni les 18 mostres de pacients VCF analitzades en el treball II-A, ni en les 16 mostres d'individus amb fenotip Kabuki del treball de Cusco et al., 2008. analitzades amb el mateix array HSBA. **ND**: No hi ha dades, perquè aquests BACs són de l'array específic del cromosoma 22, no hibridat en mostres control.

Taula 4.3: Resultats de la validació mitjançant MLPA de les sis regions seleccionades.

Database of Genomic Variants	Mostra GUANY	Mostra PERDUA	BAC alterat	Regió	Inici	Final	Llarg (Kb)	Gens afectats	Validat per MLPA	Pares anàlisi	Sondes MLPA
NO CNV	EZ-33		RP11-29O12	1p21.3	96478367	96640177	161,8		NO		RP11-29O12 RP11-29O12b
CNV	EZ-115		RP11-771F14	3p26.3 TELOMER	356445	516438	160,0	CHL1	NO		KIT SUBTEL (P070/PP36C)
CNV	EZ-22		RP11-374K5 RP11-408F10	15q13.1	27309882	27613843	304,0	NDNL2	YES	de novo	NDNL2
CNV		EZ-74	RP11-93G21 RP11-263I19	15q15.3	41591933	41851765	259,8	STRC, CATSPER2, CKMT1B, PDIA3, HISPPD2A, CKMT1A	NO		Enm 233_1 Chr15:416_1
NO CNV		EZ-74	RP11-103E2	15q25.3	84687961	84859560	171,6	AGBL1	NO		RP11-103E2 RP11-103E2b
CNV	EZ-2	EZ-74	RP11-299G20	15q26.3ish Clones	99550359	99734009	183,7	CHSY1,SELS,SNRPA1,PCSK6	NO		SELS

Estudi III

Association of Common Copy Number Variants at the Glutathione-S Transferase Genes and Rare Novel Genomic Changes with Schizophrenia

B. Rodríguez-Santiago, A. Brunet, B. Sobrino, C. Serra-Juhé, R. Flores, Ll. Armengol, E. Vilella, E. Gabau, M. Guitart, R. Guillamat, L. Martorell, J. Valero, A. Gutiérrez-Zotes, A. Labad, A. Carracedo, X. Estivill, L. A. Pérez-Jurado

Publicació inclosa en l'annex I

En els darrers anys s'ha generat un creixent interès en l'estudi i identificació de variants estructurals en el genoma humà. Aquestes variants contribueixen a la diversitat humana i a la susceptibilitat a patir malalties. L'esquizofrènia és una malaltia complexa amb una forta component genètica influïda per factors ambientals, on aquestes variants genètiques podrien tenir un paper directa en el desenvolupament de la malaltia o augmentant el risc a desenvolupar-la.

Aquest treball és fruit de la fusió de dos projectes que compartien un disseny i estratègia comú: analitzar, mitjançant MLPA, guanys i pèrdues en diversos gens localitzats en regions descrites com a CNVs en una sèrie de pacients amb esquizofrènia i en una població control. De la fusió d'ambdós treballs va resultar l'anàlisi d'un total de 140 gens continguts en CNVs en 654 pacients amb esquizofrènia i 604 controls..

Es van detectar guanys i pèrdues en 28 dels 140 gens analitzats i només 7 loci van mostrar CNVs amb una freqüència superior al 1%. Es van identificar 15 loci (11%) amb variants tant en pacients com controls, 6 CNVs presents només en controls i 8 CNVs identificades només en el grup de pacients amb esquizofrènia que implicaven als gens *CABIN1*, *SNAP29*, *NDNL2*, *WWOX*, *ZNHIT3*, *PRKRIP1*, *MYOM2* i *SSTR5*. Aquestes vuit CNVs (totes guanys) van ser posteriorment validades i caracteritzades mitjançant diversos *arrays*. Dues d'aquestes CNVs van ser descrites en més d'un pacient: una microduplicació a 22q11.23 que implicava dues sondes de MLPA localitzades en el gen *DDT* i *CABIN1* va ser identificada en dos pacients no relacionats i la posterior validació mitjançant SNP-arrays (illumina 370Duo) va posar de relleu una regió duplicada solapant entre els dos pacients de 1,39 Mb que incloïa a 27 gens. L'altre CNV recurrent identificada és una microduplicació, que

inclou el gen que codifica pel receptor 5 de la somatostatina (*SSTR5*), identificada en tres pacients i cap cas control.

Per altra banda entre les poques CNVs comuns observades es van observar diferències significatives entre pacients i controls en el gen *GSTM1*. La presència del genotip no nul (1, 2 o 3 còpies del gen) era significativament més freqüent en pacients que en controls, conferint un risc augmentat (OR = 1.41; CI [1.12-1.77]; p-valor = 0.004).

La regió 22q11.22-q23, on es localitzen els gens *CABIN1* i *DDT*, mostra una complexitat en l'estructura amb múltiples duplicacions segmentàries que impliquen a gens de la família GST, per això es va dissenyar un MLPA específic amb sondes específiques per *GSTT1* i *GSTT2*. Amb aquesta anàlisi es va identificar que el genotip no nul per *GSTT2* s'associa a un major risc de desenvolupar esquizofrènia, (OR = 1.405; CI [1.07-1.84]; p-valor = 0.01), però no es va trobar cap associació amb el nombre de còpies de *GSTT1*. En una anàlisi combinada entre els gens GST (*GSTM1*, *GSTT1* i *GSTT2*) es va identificar un efecte additiu dels genotips nuls de *GSTM1* i *GSTT2* en la susceptibilitat per l'esquizofrènia (OR = 1.92; CI [1.32-2.78]; p-valor = 0.0008), que es mantenia després de correcció per tests múltiples.

Els resultats d'aquest treball es troben recollits en l'article recentment publicat: Santiago et al., 2009, que de conformitat amb el que disposa l'escola de postgrau de la UAB, ha estat inclòs a l'annex I, ja que donada la seva recent acceptació no es va poder incloure dins el compendi de publicacions d'aquesta tesi i per tant no ha estat aprovada explícitament per la subcomissió de Postgrau com a part fonamental de la mateixa.

5. Discussió

El recent descobriment de l'existència d'una elevada quantitat de variants estructurals en el genoma humà, que inclouen delecions, insercions, duplicacions, inversions i translocacions, i que afecten a múltiples gens, ha empès la recerca genètica a determinar el paper d'aquestes variants en l'etiologia de les malalties humanes. L'extensió completa d'aquesta font de variació encara està per definir, però el desenvolupament de tecnologies cada vegada amb major resolució, i l'estudi d'extenses sèries d'individus d'ètnies diferents, està posant al descobert un complex mapa genòmic on les variants estructurals serien estructures dinàmiques i dinamitzadores dels genomes amb una important contribució a la variabilitat fenotípica entre individus.

5.1 Microdeleció i microduplicació 22q11.2

La presència de la microdeleció 22q11.2 i la duplicació recíproca s'ha avaluat, en una sèrie de 295 pacients pediàtrics amb característiques clíniques de SDG/VCF, mitjançant la tècnica de FISH, que ens ha permès identificar 12 pacients amb la microdeleció 22q11.2 (Brunet et al., 2006, treball I-A) i cap cas amb la microduplicació 22q11.2. En l'anàlisi de FISH s'ha utilitzat la sonda comercial *HIRA-TUPLE1* que permet identificar les microdeleccions i microduplicacions de 3 i 1,5Mb més freqüents en els pacients amb la SDG/VCF (98%) (Edelmann et al. 1999; Saitta et al. 2004). Una limitació derivada de l'ús d'aquesta tècnica és que no permet detectar reorganitzacions atípiques que no incloguin la seqüència diana de la sonda utilitzada. Entre els pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF s'estima que aproximadament un 2% poden presentar delecions atípiques o distals (Saitta et al. 1999; Jalali et al. 2008). En una revisió recent es recull la diversitat de delecions descrites en pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF, i es fa ressò que la meitat d'elles no s'haurien identificat mitjançant FISH amb la sonda comercial *HIRA-TUPLE1* (Figura 5.1), això representaria un 1% de total de casos amb SDG/VCF (Nogueira et al., 2008).

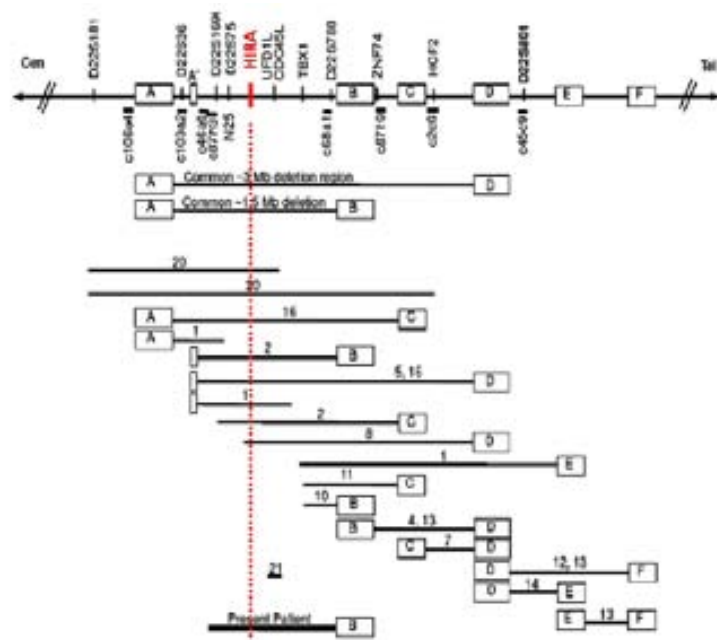


Figura 5.1: Delecions atípiques descrites en la regió 22q11.2, extretes de la revisió de Nogueira et al (2008). S'indica la localització d'hibridació de la sonda de FISH (HIRA). La línia vermella discontinua mostra quines delecions atípiques no serien detectades mitjançant la tècnica de FISH amb la sonda HIRA.

De la mateixa manera que amb les microdeleccions, les microduplicacions que no impliquin la seqüència on es localitza la sonda de FISH tampoc seran identificades. Els pacients descrits a la literatura amb microduplicacions atípiques o distals és molt reduït i les conseqüències fenotípiques resulten diverses (Jalali et al. 2008; Ou et al. 2008). S'han identificat algunes duplicacions distals en la regió 22q11.2 en individus no afectes, com per exemple un guany entre el LCR22-D i LCR22-E identificat en una de les mostres del projecte HapMap (Locke et al. 2006), o diverses duplicacions i delecions entre el LCR22-D i el LCR22-F considerades polimorfismes (Sebat et al. 2004; Sharp et al. 2005; Locke et al. 2006; Redon et al. 2006). Donat l'escàs coneixement del fenotip associat a microduplicacions atípiques en la regió 22q11.2, la síndrome de la microduplicació 22q11.2 fa referència únicament a aquells guanys que impliquen les regions de 1,5 i 3Mb comunament deleccionades (Jalali et al., 2008; Ou et al. 2008). Una altra limitació de la utilització de la tècnica de FISH pot provenir de la incapacitat de discernir en metafases la presència d'alteracions properes. Així, per exemple, en cromosomes metafàsics la microduplicació recíproca a la microdeleció 22q11.2 podria passar inadvertida. En l'estudi I-A, aquesta dificultat ha estat contrarestada mitjançant l'extensiva anàlisi i recompte de senyals fluorescents en cèl·lules en interfase, que ens ha permès descartar la microduplicació 22q11.2.

En l'estudi I-B s'ha emprat la tècnica de MLPA que, en comparació amb la FISH, aporta una major fiabilitat en la valoració de microduplicacions localitzades a petita distància la una de l'altra. A més a més, es tracta d'una tècnica menys laboriosa i que ofereix una interessant relació cost/efectivitat a l'hora d'analitzar àmplies sèries de mostres. No obstant, el fet de requerir diverses mostres en un mateix experiment limita el seu ús rutinari en els laboratoris de genètica clínica perquè habitualment les mostres de pacients arriben al laboratori d'una forma esporàdica i espaiada en el temps. Això fa que la tècnica de FISH segueixi sent la metodologia d'elecció per oferir un ràpid diagnòstic de la presència o no de la microdeleció i la microduplicació 22q11.2.

En el disseny de l'anàlisi de MLPA de l'estudi I-B només es van incloure sondes de la regió compresa entre el LCR22-A i LCR22-B cobrint així les primeres 1,5Mb més comunament afectades per la microdeleció/microduplicació 22q11.2. Aquest fet va fer que no detectéssim, en un pacient amb esquizofrènia, una microduplicació atípica i més petita (367Kb) compresa entre els LCR22-C i LCR22-D. Aquest guany va poder ser identificat en l'estudi III d'aquesta tesi, mitjançant la

sonda de MLPA mapada sobre el gen SNAP29. Els diversos blocs de LCRs localitzats a 22q11.2 fan que aquesta regió sigui propensa a patir reordenaments cromosòmics per mecanismes de NAHR entre aquests blocs paràlegs (Babcock et al. 2007). Malgrat que el reordenament més comú és el que implica els LCR22-A i B, cal considerar altres possibles recombinacions entre LCR22s d'aquesta regió. A partir dels resultats i coneixements obtinguts en aquesta tesi, el disseny de l'estudi de MLPA en pacients amb esquizofrènia hauria d'incloure sondes localitzades entre els diversos LCR22 per cobrir bé tota la regió de 3Mb, comunament delecionada, i sondes per la regió més distal (22q11.23). Actualment, la implementació de tècniques com els *arrays*, la PCR quantitativa o el MLPA, amb sondes que cobreixen bé tota la regió, estan contribuint a identificar noves reorganitzacions cromosòmiques en aquesta regió, que mitjançant el clàssic FISH havien passat inadvertides (Stachon et al. 2007; Blennow et al. 2008).

Síndrome DiGeorge/velocardiofacial

D'ençà de la descripció de les síndromes de DiGeorge i Velocardiofacial, fa més de 40 anys, s'ha avançat considerablement en el reconeixement i definició del fenotip associat a aquest trastorn. S'han descrit més de 180 característiques clíniques associades, però cap d'elles es troba present en el 100% dels casos (Robin and Shprintzen 2005). Aquest ampli espectre fenotípic ha generat un debat entre clínics per intentar definir quins criteris mínims diagnòstics són necessaris per considerar l'anàlisi genètic de la microdeleció 22q11.2. Existeix consens en definir que els defectes cardíacs congènits de tipus conotruncal, les anomalies del paladar i la insuficiència velofaríngea, les infeccions recurrents, les dificultats en el llenguatge, i un retard en el desenvolupament són les característiques principals de la síndrome, però la sospita diagnòstica segueix dependent, en gran mesura, de l'experiència i l'habilitat del clínic en valorar el conjunt de trets associats a aquesta síndrome i el diagnòstic final s'acaba supeditant als resultats de l'anàlisi genètica (Shprintzen 2008). En la sèrie de 12 pacients caracteritzats en l'estudi I-A, la insuficiència velofaríngea i les característiques facials, anomalies que requereixen d'experiència clínica pel seu reconeixement, estaven presents en tots els pacients. Aquesta observació recull el què han suggerit també altres autors que coincideixen en afirmar que, davant d'un pacient amb trets clínics majors com poden ser la cardiopatia, els problemes en la parla o el retard en el desenvolupament, és necessari determinar la presència d'altres anomalies menys evidents però freqüents

en els pacients amb microdeleció, que són les que han de completar la sospita de la SDG/VCF (Hay 2007; Shprintzen 2008; Ziolkowska et al. 2008). Malgrat s'ha avançat considerablement en el reconeixement del fenotip associat a la SDG/VCF i aquest estigui cada vegada més ben definit, entre les sèries de pacients amb sospita de la SDG/VCF, podem trobar individus amb altres malalties genòmiques. Així per exemple un pacient amb tetralogia de Fallot, anomalies al paladar, retard mental lleu, desordres immunològics, i hipotonia, pot generar la sospita de la SDG/VCF, però aquestes característiques clíniques també poden encaixar amb la descripció clínica d'altres malalties genòmiques. Aquest fet justifica que tant en la sèrie de pacients analitzats en el treball I-A (Brunet et al. 2006), com en d'altres sèries publicades a la literatura, es descriguin anomalies cromosòmiques no relacionades amb la regió 22q11.2 (Ravnan et al. 1996; Smith et al. 2002; Kitsiou-Tzeli et al. 2004; Katzman et al. 2005; Fernandez et al. 2008). De fet, els kits comercials de sondes de MLPA dissenyats pel diagnòstic de pacients amb característiques clíniques de la SDG/VCF, inclouen sondes localitzades en altres regions cromosòmiques que s'han vist associades amb un fenotip similar. Així per exemple el kit p023B inclou sondes de les regions 10q12-p15, 8p21-p23, 4q22-q35, 17p13 i 18q21, per poder oferir una anàlisi simultània d'altres regions del genoma i un diagnòstic més acurat dels pacients amb aquesta simptomatologia heterogènia .

Entre les característiques clíniques de la síndrome de DG/VCF trobem també els trastorns de conducta i problemes psiquiàtrics. En una valoració conjunta dels dos treballs inclosos en l'estudi I, es confirma aquesta associació. En l'anàlisi de 190 pacients adults amb esquizofrènia s'han identificat dos casos amb aquesta microdeleció, això representa un 1% de la sèrie, tal com es troba descrit en la literatura. Entre els 12 pacients (< 18 anys) amb microdeleció identificats en el treball I-A, s'observen 4 casos amb trastorns de la conducta, entre ells una pacient amb esquizofrènia que és la de més edat. Aquesta pacient va morir l'any passat, a l'edat de 23 anys, per una broncoaspiració massiva d'aliment, essent aquesta una causa freqüent de mort en encefalopaties, no descrita per la SDG/VCF, tot i que recentment s'ha publicat un estudi que suggereix un increment de morts prematures entre pacients amb la microdeleció 22q11.2 (Bassett et al. 2009). Entre els gens de la regió 22q11.2 que s'apunten com a implicats en el fenotip psiquiàtric trobem el *COMT*, *PRODH*, *ZDHHC8*, *DGCR2*, *PIK4CA*, *SNAP29* o *DGRC14* (Arinami 2006). En pacients amb esquizofrènia sense la microdeleció 22q11.2

s'observen sovint retards en el desenvolupament i habilitats cognitives escasses, ja presents abans que aparegui l'esquizofrènia (Zammit et al. 2004). Aquestes anomalies són també presents en pacients amb la microdeleció 22q11.2 (Moss et al. 1999; Scherer et al. 1999; Swillen et al. 1999), fet que suggereix que els dèficits cognitius i l'esquizofrènia podrien compartir una mateixa etiologia o mecanismes patofisiològics comuns. Es considera que l'haploinsuficiència dels gens de la regió 22q11.2 compromet la neurogenesi i la migració neuronal, així com la diferenciació i manteniments dels circuits neuronals. S'especula que aquestes anomalies podrien ser l'origen del retard mental moderat i els dèficits cognitius, que podrien progressar cap a la malaltia psiquiàtrica. Però també es creu probable que altres gens de la mateixa regió 22q11.2, com per exemple el *COMT* i el *PRODH*, puguin estar actuant com a moduladors en el desenvolupament del fenotip psicòtic (Jacquet et al. 2002; Gothelf et al. 2007; Zinkstok et al. 2008). La microdeleció 22q11.2 representa, doncs, un interessant model en l'estudi de l'esquizofrènia, i per tant, determinar quins són els factors genètics específics que determinen el fenotip psiquiàtric, neurofisiològic i neuroanàtomíc dels individus amb la SDG/VCF, pot contribuir a entendre les bases moleculars i la patogènia de les malalties psiquiàtriques humanes.

Per altra banda, un interrogant no resolt en la SDG/VCF és la correlació genotip-fenotip existent en els diferents casos. Entre pacients amb la mateixa microdeleció s'observa una gran variabilitat clínica que es troba recollida a la literatura i reflectida també en els pacients descrits en aquesta tesi. Aquesta diversitat fenotípica suggereix que altres factors genètics i ambientals poden estar contribuint a modular la penetrància i expressivitat de la microdeleció 22q11.2. Per bé que existeixen poques dades sobre aquests efectes, s'han suggerit diverses hipòtesis:

- La microdeleció 22q11.2 podria desemmascarar mutacions recessives presents en l'altre al·lel
- El "background" genètic podria estar contribuint a l'expressivitat fenotípica final. La majoria de les estructures afectades en els pacients amb la microdeleció 22q11.2 es creu que depenen d'una correcta migració i diferenciació de la cresta neural. L'haploinsuficiència o polimorfismes en gens localitzats tant en la mateixa regió 22q11.2 com fora d'aquesta, podrien estar actuant com a moduladors fenotípics de la malaltia i ser responsables de la diferent expressivitat de la síndrome (Puech et al.

2000; Prescott et al. 2005). En aquest sentit s'ha observat en ratolins, que determinats polimorfismes en el factor de creixament vascular (*vegf*), modifiquen l'expressivitat dels efectes de la microdeleció 22q11.2, en particular en relació a les anomalies cardiovasculars. (Stalmans et al. 2003).

- Existència d'altres variants cromosòmiques. S'han descrit a la literatura casos de compensació genètica, on una altra anomalia cromosòmica sembla compensar el fenotip (Blennow et al. 2008). En el cas de 22q11.2, recentment s'ha descrit un pare asimptomàtic portador de la microdeleció 22q11.2 en un dels cromosomes 22, que era compensada per la microduplicació recíproca en l'altre al·lel (Blennow et al. 2008; Carelle-Calmels et al. 2009).
- Exposició a diferents condicions ambientals, que poden contribuir a l'aparició de diverses malformacions congènites addicionals a les estrictament causades per la deleció.

Síndrome de la microduplicació 22q11.2

En els treballs de l'estudi I d'aquesta tesi no s'ha pogut demostrar l'existència de la microduplicació 22q11.2, recíproca a la microdeleció 22q11.2 en cap de les dues sèries analitzades (pacients amb característiques clíniques de SVCF i individus amb esquizofrènia). En contraposició amb la freqüència amb què es produeix la microdeleció 22q11.2 (1/4000-6000), la microduplicació recíproca només s'ha descrit en la literatura en un baix nombre de casos. Si considerem la recombinació homòloga no al·lèlica com l'origen d'ambdues anomalies seria d'esperar que la microduplicació fos tan freqüent com la microdeleció. En un principi es va suggerir que aquestes diferències en la freqüència d'ambdues anomalies podia ser deguda a les limitacions de la tècnica de FISH, que com s'ha comentat anteriorment. Això no obstant, l'estudi amb tècniques d'alta resolució (*arrays*) no indiquen que aquest sigui el motiu d'una menor freqüència de microduplicacions que microdeleccions. En estudis del genoma complet, que analitzen grans sèries d'individus amb i sense patologies, s'observa que la microduplicació 22q11.2 segueix sent un reordenament més rar que la microdeleció. Una altra explicació, que ha anat prenent cos a mesura que s'han anat descrivint casos amb aquesta microduplicació, fa referència al fet que el fenotip associat podria ser molt lleu i els individus amb aquesta variació estructural

no requeririen d'intervenció mèdica i passarien, per tant, desapercibuts (Portoni et al., 2009).

Finalment, donat que aquest desequilibri entre delecions i duplicacions s'ha observat també en altres malalties genòmiques originades per mecanismes de NAHR entre LCRs, s'ha suggerit que l'assumpció de l'existència d'una equivalència entre la quantitat de delecions i duplicacions originades per mecanismes de NAHR entre LCRs, podria ser errònia. A grans trets, la NAHR entre LCRs pot produir-se de tres maneres: entre seqüències paràlogues en cromosomes homòlegs (intercromosòmica), entre cromàtides germanes (intercromàtida) o en la mateixa cromàtida (intracromàtida) (Figura 5.2). Només en els dos primers casos les delecions i duplicacions són productes recíprocs de la NAHR. D'acord amb aquest model la ratio entre delecions i duplicacions vindria determinada per la contribució relativa de NAHR intracromàtida. Turner et al., 2008 van desenvolupar un assaig per analitzar, en esperma, la ratio de delecions i duplicacions meiotiques *de novo* en quatre punts calents del genoma (Síndrome de Williams a 7q11.23, regió AZFa (bandes), LCRs del CMT1A (banda) i síndrome de Smith-Magenis 17p), establint que, en la línia germinal masculina, les delecions són generades amb una freqüència més alta que les duplicacions, estimant que la NAHR intracromàtida és el reordenament predominant entre els LCRs que flanquegen les regions estudiades. Respecte la regió 22q11.2, es desconeix si la ratio de NAHR intracromàtida és més alta que la intercromàtida. No obstant s'ha descrit que les recombinacions que originen les microdelecions i microduplicacions d'aquesta regió són d'origen intracromosòmic en un 87% i intercromosòmica en el 13% restant (Edelmann et al. 1999; Shaikh et al. 2001; Shaikh et al. 2007; Torres-Juan et al. 2007).

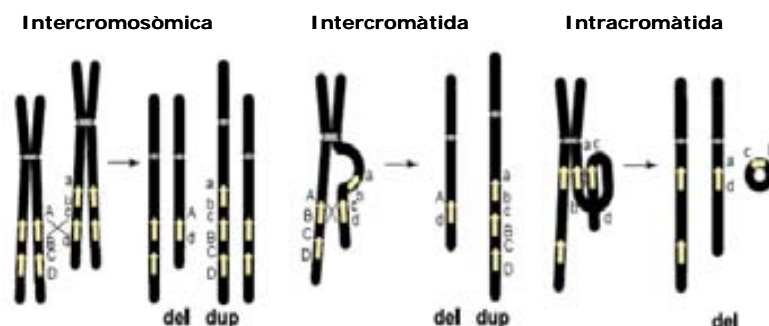


Figura 5.2: Tipus de recombinació homòloga no-al·lelica (NAHR) entre LCRs. Sobre un cromosoma imaginari es dibuixen els LCRs en forma de fletxes grogues i es simulen els tres tipus d'entrecreuaments no al·lèlics intercomosòmics, intracromosòmics (intercromàtida i intracromàtida) que es poden produir entre LCRs orientats en la mateixa direcció i es mostra quin seria el producte de la recombinació (duplicacions o delecions).

5.2 Array-CGH i noves malalties genòmiques.

Davant d'un pacient amb múltiples anomalies congènites es desperta la sospita d'una anomalia genètica. En el cas d'un pacient amb característiques clíniques associades a una síndrome coneguda (com seria la SDG/VCF) es realitza un cariotip i una anàlisi molecular de major resolució de la regió cromosòmica associada a la malaltia, en aquest cas la regió 22q11.2. Quan el cariotip no revela cap anomalia i l'estudi molecular descarta la microdeleció més freqüent, s'ha de recórrer a tècniques més resolutives com l'*array*-CGH que permetin valorar altres reordenaments submicroscòpics. Actualment l'abaratiment en els costos d'aquesta tecnologia està contribuint de manera decisiva en la seva implementació en la pràctica clínica i fa possible l'anàlisi del genoma humà complet a una elevada resolució, permetent la identificació de microdeleccions i microduplicacions fins a 1000 vegades més petites que les identificades en un cariotip amb bandes G (3-5Mb). Aquest fet ha revolucionat la genètica clínica; primer, perquè la ràtio de malalties genòmiques ha incrementat considerablement, i després pel gir que s'està produint en la forma d'aproximació al descobriment d'aquestes malalties genòmiques. Prèviament les malalties eren descrites a partir de les característiques fenotípiques i es buscava aleshores quina era l'anomalia genètica comú, en canvi ara en la descripció de les noves malalties genòmiques s'identifica primer el genotip i després es van definint les característiques clíniques associades. Malauradament el coneixement sobre els efectes fenotípics de la majoria de les CNVs descrites en el genoma humà no es produeix a la mateixa velocitat que els avenços tecnològics i la interpretació dels resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi d'*array*-CGH pot resultar complexa.

La tècnica d'*array*-CGH s'ha aplicat en l'anàlisi de 18 pacients amb característiques clíniques de SDG/VCF, i d'11 pacients amb esquizofrènia i trets facials de la SDG/VCF. Els dos arrays de BACs, un dissenyat per cobrir tot el cromosoma 22 i l'altre per una anàlisi global de tot el genoma, han permès identificar 45 CNVs (14 pèrdues, 14 guanys i 17 regions amb guanys i pèrdues) en els 18 pacients amb fenotip de SDG/VCF, i 31 CNVs (9 guanys, 16 pèrdues i 6 regions amb guanys i pèrdues) en els 11 casos amb esquizofrènia. En una valoració conjunta de les CNVs identificades mitjançant aquests arrays de BACs s'observa que un 13-15% de les regions detectades com a variables no estaven descrites com a CNVs a la *Database of Genomic Variants*, mentre que la majoria (84-87%)

solapaven amb CNVs prèviament identificades per altres autors. Aquesta classificació de les CNVs, en funció de la informació descrita en la literatura i recollida en les bases de dades, s'ha utilitzat per discriminar entre variants estructurals patològiques i les que no ho són. Tot i així, cal tenir present que el mapa actual de CNVs és encara preliminar i que moltes de les regions recollides com a variables no han estat validades per altres tècniques. Alguns treballs publicats recentment prediuen que les CNVs descrites podrien tenir una llargada i una freqüència sobreestimada (de Smith et al. 2007; Kidd et al. 2008; Perry et al. 2008). A més a més, les primeres regions variables es van descriure a partir d'experiments realitzats amb *arrays* de BACs, per tant el seu tamany estava determinat per la llargada de la sonda (150-200Kb), que marcava la resolució màxima que es podia obtenir en aquestes circumstàncies. Prova d'això és que una segona anàlisi de 30 mostres de HapMap, que s'havien analitzat prèviament amb *arrays* de BACs (Redon et al. 2006), va demostrar, utilitzant *arrays* d'una major resolució, que 1020 de 1153 loci (88%) que havien estat descrits com a CNVs eren, en realitat, de tamany inferior del que s'havia reportat, i que en 876 d'aquestes CNVs (76%) el tamany real era inferior al 50% (Perry et al. 2008). El fet de treballar sobre un coneixement "poc" consolidat és una realitat a la que ens referirem en diversos punts d'aquesta discussió, ja que condiciona enormement la interpretació dels resultats.

Entre tots els loci identificats com a guanys o pèrdues mitjançant els *arrays* de BACs, 17 regions (11 en l'estudi II-A i 6 en l'estudi II-B) es van analitzar posteriorment per MLPA. D'aquesta validació destaca un elevat percentatge (64,7%) de loci que no han pogut ser verificats. Diverses causes poden justificar aquest fet: la primera són els criteris poc restrictius aplicats a l'hora d'interpretar els resultats dels *arrays* de BACs, ja que es va considerar com anòmal qualsevol BAC, que tingués en ambdues hibridacions (directa i "dye-swap"), un valor de \log_2 ratio per sobre de 0,2 (guany) o inferior a -0,2 (pèrdua). L'èxit de validació ha estat especialment baix en les 10 regions definides per 1 únic BAC, on tan sols una CNV ha pogut ser corroborada (10%). En canvi entre les 7 regions identificades per més d'un BAC, se n'han validat 5 (71,4%). El criteri de considerar com a possible CNV totes les regions malgrat que tan sols estiguessin suportades per un únic BAC es va establir perquè eren les primeres mostres hibridades amb aquests *arrays* i, donat que hi havia algunes regions del genoma poc cobertes en l'*array* on els BACs estaven molt espaiats, es va preferir no descartar cap CNV encara que impliqués un

únic BAC. Un segon fet que pot explicar el baix èxit en la validació per MLPA és que les sondes dissenyades per l'anàlisi no mapessin dins la regió realment variable detectada amb el BAC. La llargada mitjana dels BACs és d'unes 150Kb i, segons s'ha pogut comprovar *a posteriori* per les dades d'altres estudis, amb només un 30% de la seva seqüència duplicada o delecionada ja interpretariem un guany o pèrdua de tota la regió del BAC (Kidd et al., 2008). Per detectar aquesta variant, mitjançant la tècnica de MLPA, s'hauria d'haver dissenyat la sonda (seqüència d'uns 60 pb) just en la regió del BAC corresponent al guany o la pèrdua. Com ja s'ha comentat anteriorment el mapa de CNVs actual és preliminar, s'ha descrit que la concordança entre les CNVs detectades mitjançant diferents plataformes (BAC vs SNP array), és només del 43% (Redon et al. 2006). En el nostre treball per totes les regions no validades es van dissenyar dues sondes diferents de MLPA, en tots els casos la segona sonda tampoc va permetre validar el resultat, suggerint-nos que o es tractava de CNVs que impliquen només una porció de la seqüència del BAC o eren falsos positius de l'array.

Respecte les 6 CNVs identificades en els treballs de l'estudi II i validades mitjançant MLPA, el següent pas va ser determinar el seu origen de novo o heretat. Entre les variants de novo es van identificar dos CNVs a la regió 1q21.1 en un pacient amb clínica de la SDG/VCF i una microduplicació a 15q13.1 en un cas amb esquizofrènia. La rellevància clínica d'aquestes dues CNVs seran avaluades més endavant en aquesta discussió. Per altra banda es van identificar 4 CNVs heretades d'un progenitor sense patologia. Determinar l'origen heretat o de novo d'una CNV ens permet suggerir la seva possible implicació en la patologia, així com determinar la necessitat d'estudiar altres membres de la família o d'oferir un consell genètic. En termes generals una CNV de novo en un pacient amb els progenitors sans, és més probable que sigui la causa de la malaltia que una CNV heretada. Tot i així davant d'una CNV rara i heretada no podem descartar la seva implicació en la patologia. Existeixen múltiples casos de CNVs que mostren una penetrància incompleta, com per exemple la mateixa microdeleció o microduplicació 22q11.2, o les microdeleccions 16p13.11 i 15q13.2 (Hannes et al. 2009; van Bon et al. 2009) entre d'altres, on s'observen diferències fenotípiques fins i tot entre membres d'una mateixa família. Cal, per tant, valorar la naturalesa de la CNV i considerar que pugui estar influent en el fenotip, si bé no ser-ne l'única causa. Les bases de dades, com DECIPHER on es recullen noves malalties genòmiques, ens poden ajudar a valorar si es tracta d'una CNV ja identificada en individus sans o en casos amb

patologia i valorar-ne el fenotip. També poden servir d'indicador de la possible patogenicitat el seu contingut en gens i funció. Les CNVs que impliquen un alt nombre de gens o gens relacionats amb la malaltia mereixen una especial consideració. Tot i així, la implicació d'un sol gen o l'absència de gens coneguts en la regió no ens permet afirmar que la CNV no sigui patològica (Reymond et al. 2007). Per últim també es pot valorar la naturalesa del CNV, ja que en general les delecions resulten sovint més patogèniques que les duplicacions (Lupski and Stankiewicz 2005).

Així doncs, tot aquest nou abordatge en la identificació de malalties genòmiques requereix de l'anàlisi de grans cohorts d'individus per tal de poder determinar la patogenicitat d'aquestes CNVs rares, així com disposar d'una detallada informació fenotípica dels individus portadors d'aquestes CNVs que permeti establir una acurada relació genotip-fenotip (Mefford and Eichler 2009). En aquest sentit, s'està veient que l'agrupació de pacients en funció d'una sola categoria clínica pot resultar una mala estratègia. Així, per exemple, la microdeleció 15q13.3 va ser identificada primerament en un grup de pacients amb retard mental i trets dismòrfics (Sharp et al. 2006), una reavaluació del trets fenotípics dels pacients amb aquesta CNV va permetre associar-la amb l'epilèpsia (Sharp et al. 2008), fet que demostra que una detallada informació clínica dels pacients i els seus familiars és clau en el reconeixement i descripció dels trets clínics associats a aquestes noves malalties genòmiques. Finalment una altra conseqüència d'aquesta nova aproximació a l'estudi de les malalties genòmiques és que està posant de relleu que diferents fenotips poden estar associats a una mateixa CNV, de manera que a la definició d'aquestes síndromes difícilment s'hi hauria arribat seguint una aproximació basada en classificació fenotips previs abans d'estudiar-ne el genotip.

5.3 Regió 1q21.1

En l'anàlisi mitjançant CGH-array de 18 pacients amb fenotip de la SDG/VCF però sense la delecio a 22q11.2 (estudi II-A), s'ha identificat un pacient portador d'una microduplicació intersticial de 212Kb ((aCGH 1q21.1(B36:chr1:144149999-144361868++)) i una microdelecio contigua de 1,15Mb (aCGH 1q21.1(B36:chr1:145073765-146329018--)). Ambdós reordenaments s'havien generat *de novo* en el pacient, probablement per mecanismes de recombinació homòloga entre les duplicacions segmentàries flanquejants (Figura 5.3). Les característiques clíniques d'aquest pacient inclouen defecte cardíac congènit (coartació de l'aorta), insuficiència velofaríngea, retard mental moderat i, durant la infància, dèficit d'atenció i hiperactivitat, bronquitis i asma freqüents, i un estrabisme que va ser corregit quirúrgicament. La coexistència de dues CNVs *de novo* complica la interpretació de la relació genotip-fenotip.

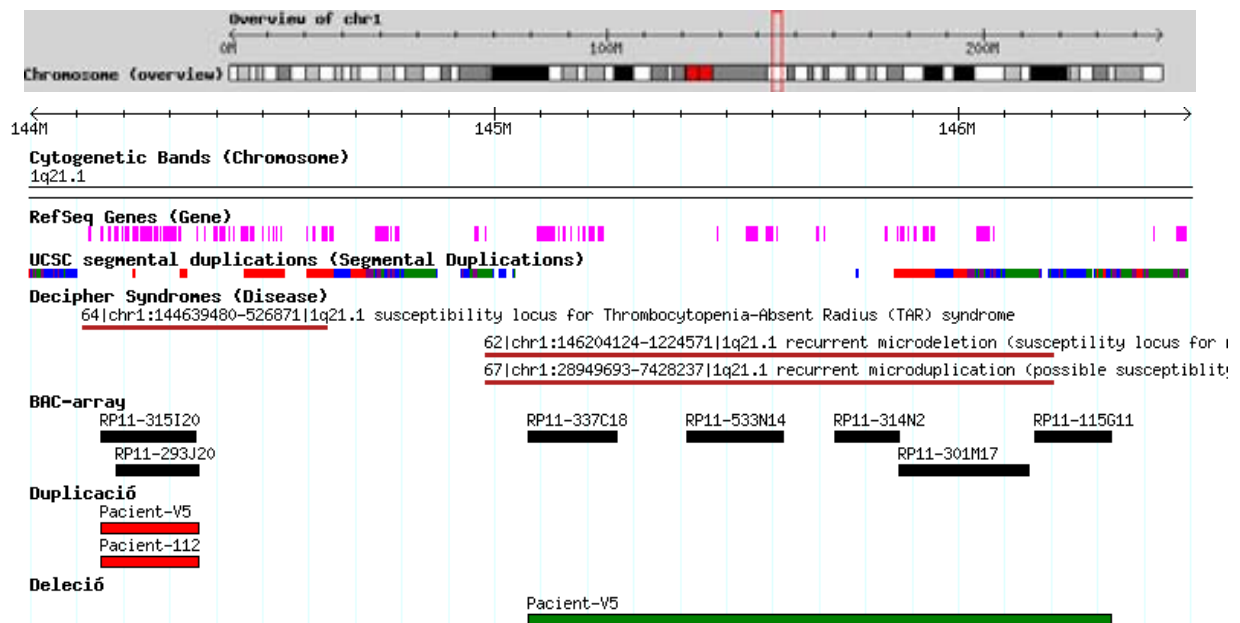


Figura 5.3: Regió cromosòmica 1q21.1: La figura mostra els BACs de l'array, indicadors de les dues CNVs observades en el pacient V5. Es mostra també la microduplicació del cas 112 i les síndromes recollides en la base de dades DECIPHER, per aquesta regió: 62|susceptibility locus for neurodevelopmental disorders; 67|possible susceptibility locus for neurodevelopmental disorders.

La microduplicació, recíproca a la microdelecio associada a la síndrome de TAR, no es troba descrita en la literatura ni en les bases de dades i es desconeix si algun dels 12 gens inclosos en aquesta CNV podria estar implicat en els defectes cardíacs. En l'anàlisi mitjançant MLPA de 326 individus control no s'ha identificat cap cas amb aquesta anomalia, mentre que entre 73 pacients amb cardiopatia s'ha

identificat un segon pacient amb aquesta microduplicació, heretada del seu pare aparentment sa. La interpretació de l'efecte fenotípic que pot tenir aquesta microduplicació és difícil de determinar i només es podrà resoldre amb la identificació de més individus amb la mateixa CNV, un fet cabdal en el context del consell genètic i el diagnòstic prenatal.

Respecte la microdeleció 1q21.1, en els darrers mesos del 2008 s'han publicat dues sèries de casos amb aquesta anomalia. La primera sèrie, que inclou també el nostre pacient, descriu 25 individus amb aquesta microdeleció recurrent. Es recullen com a característiques clíniques més destacables, el retard mental lleu o moderat, la microcefàlia, anomalies cardíques i cataractes (Mefford et al. 2008). La segona sèrie inclou 27 casos amb la microdeleció (21 amb dades clíniques) i descriuen com a característica més freqüent el retard en el desenvolupament i/o problemes d'aprenentatge, així com una alta freqüència de problemes de conducta com el desordre d'atenció i hiperactivitat, autisme, ansietat/depressió, conductes antisocials, agressivitat i algunes al·lucinacions. En aquesta segona sèrie només hi ha un cas que presenti defecte cardíac (una vàlvula aòrtica bicúspide). Ambdós treballs posen de relleu una penetrància reduïda i una gran variabilitat en l'expressivitat fenotípica d'aquesta microdeleció, fins i tot entre membres de la mateixa família. Ambdós estudis parteixen de llargues sèries de casos pediàtrics referits pel diagnòstic de retard mental, autisme i/o anomalies congènites, fet que podria estar condicionant el fenotip que descriuen (Brunetti-Pierri et al. 2008). Per una altra banda, la microdeleció 1q21.1 ha estat recentment associada amb l'esquizofrènia. Dos estudis independents han descrit un percentatge significativament major d'individus amb aquesta microdeleció entre els pacients amb esquizofrènia que en la població control (International Schizophrenia Consortium 2008; Stefansson et al. 2008). Malauradament, però, aquestes sèries no recullen altres defectes congènits com serien les anomalies cardíques o del paladar. Totes aquestes dades en conjunt suggereixen un cert solapament clínic entre aquestes dues malalties genòmiques i deixa amb un interrogant la necessitat d'analitzar la regió 1q21.1 en els pacients amb característiques clíniques de SDG/VCF sense la microdeleció 22q11.2, especialment si presenten trastorns de conducta o esquizofrènia.

5.4 Identificació de CNVs en l'esquizofrènia

Les CNVs, al igual que altres formes de variants genètiques, poden originar-se *de novo*, ser heretades, rares o comunes. En relació al paper que poden tenir les CNVs rares i *de novo* en l'etiologia de l'esquizofrènia, s'interpreten com altres reordenaments cromosòmics que s'han descrit associats a trastorns del neurodesenvolupament, com el retard mental o l'autisme (de Vries et al. 2005; Jacquemont et al. 2006; Sebat et al. 2007; Stankiewicz and Beaudet 2007; Szatmari et al. 2007). Per altra banda, les CNVs comuns podrien actuar sobre el risc per l'esquizofrènia segons el model "*common disease-common variant*" que proposa que la patologia s'origina a partir dels efectes combinats de múltiples polimorfismes comuns, cada un amb un petit impacte sobre el risc per la malaltia.

A part de la microdeleció 22q11.2, que és un dels majors factors de risc genètic per l'esquizofrènia, ja que incrementa el seu risc a uns nivells similars als descrits entre bessons monozigòtics (Karayiorgou et al. 1995; Murphy et al. 1999; Bassett et al. 2005), en aquesta tesi hem abordat també l'anàlisi d'altres CNVs en pacients amb esquizofrènia, emprant dues estratègies. La primera, va consistir en l'anàlisi mitjançant BAC-arrays d'onze pacients amb esquizofrènia i trets dismòrfics, amb l'objectiu d'identificar microdelecions i microduplicacions, que, de manera anàloga a la microdeleció 22q11.2, augmentessin el risc de desenvolupar esquizofrènia. La segona estratègia va ser l'anàlisi, mitjançant MLPA, de 140 gens localitzats en regions prèviament descrites com a CNVs, amb l'objectiu d'identificar diferències en la freqüència de CNVs comunes i/o rares entre la població control (n=604) i els pacients amb esquizofrènia (n=654).

En l'estudi III, on s'han analitzat 140 gens localitzats en regions descrites com a CNVs, sorprèn la baixa proporció de loci que han mostrat variacions en nombre de còpia, 28 de 140 (20%). A més a més, entre aquestes 28 regions trobem només 7 loci (*PPYR1*, *DDT*, *CYFIP1*, *CYP2E1*, *PCDHA9*, *GSTM1*, i *CXCL12*) que mostren canvis amb una freqüència superior al 1%. Entre les raons que poden justificar aquest baix percentatge de CNVs comuns trobem les comentades anteriorment, en referència a la sobreestimació del tamany de les CNVs recollides a les bases de dades. També cal contemplar la possibilitat que una elevada proporció de les CNVs analitzades en aquest estudi es trobin amb una freqüència molt baixa en la població, per sota de 1 cada 1000 individus, donat que la selecció que es va

fer de les regions va excloure els loci de múltiples còpies, com per exemple els que coincidien amb duplicacions segmentàries anotades en el genoma.

En les poques CNVs relativament comuns que es van identificar, es va valorar l'existència de diferències en la freqüència del número de còpies entre pacients i controls. En la distribució dels genotips es descriuen diferències significatives en la freqüència del nombre de còpies de dos gens de la superfamília de les glutatió transferases (GSTs: *glutathione S-transferases*) *GSTM1* i *GSTT2*. Es va determinar que els individus portadors de almenys una còpia de *GSTM1* o de *GSTT2* presenten un major risc de desenvolupar l'esquizofrènia (OR=1.41; CI=1.12-1.77; p=0.004 i OR=1.405; CI=1.07-1.84; p=0.0008, respectivament) i s'observa un efecte additiu degut a la presència de tenir > 0 còpies dels dos gens (OR=1.92; CI= 1.32-2.78; p=0.0008). Les proteïnes GSTs tenen un important rol en la detoxificació cel·lular, són enzims multifuncionals que catalitzen la conjugació de glutatió reduït a grups electrofílics de gran quantitat de compostos altament oxidants, incloent carcinògens, contaminants ambientals, i productes de l'estrès oxidatiu (Mannervik 1985; Hayes and Strange 2000). En humans existeixen vuit famílies diferents que codifiquen per GSTs solubles, i cadascuna d'elles està composta per una o més isoformes homo o heterodimèriques i que es troben organitzades en clústers: els *alpha* (GSTA) localitzats a 6p12.2, els *mu* (GSTM) a 1q13.3, els *pi* (GSTP) a 11q13.1, els *theta* (GSTT) a 22q11.23, *zeta* (GSTZ) a 14q24.3, els *Chi* o *omega* (GSTS o GSTO) a 10q25.1 i els *kappa* (GSTK) a 7q34 (Hayes et al., 2005). La presència de més còpies d'aquests gens podria suposar un increment en l'activitat d'aquests enzims, que desencadenaria un desequilibri entre els nivells de la forma reduïda i oxidada del glutatió. Diverses anàlisis d'expressió, estudis genètics i quantificacions *in vivo* dels nivells de glutatió en cervell i en teixits *postmortem* avalen que la desregulació del metabolisme del glutatió es podria trobar implicada en l'esquizofrènia (Do et al. 2000; Tosic et al. 2006; Gysin et al. 2007). Aquests resultats, aporten noves evidències d'una possible implicació d'aquests gens en l'esquizofrènia, però el que resulta més interessant és l'efecte additiu en el nombre de còpies de dues CNVs, que en aquest cas codifiquen per enzims d'una mateixa família de proteïnes. Determinades variants estructurals podrien tenir, per separat, un efecte molt baix, i és només quan es combinen en un mateix individu que augmentaria el risc de patir una malaltia. La localització d'aquests clústers en regions que solapen o estan flanquejades per CNVs suggereix

que l'estudi de les variants en nombre de còpies del conjunt de les diferents GSTs, pot tenir un gran interès en la recerca genètica de l'esquizofrènia (Rodríguez-Santiago et al. 2009).

Per altra banda en els estudis II-B i III d'aquesta tesi s'han identificat vuit CNVs rares, totes guanys de material genòmic: 2 microduplicacions *de novo* (que afecten els gens *CABIN1* a 22q11.23 i *NDNL2* a 15q13.1); 2 guanys heretats d'un progenitor (que contenen els gens *SNAP29* a 22q11.2 i *ZNHIT3* a 17q12) i 4 que no s'ha pogut determinar si l'origen és *de novo* (a l'interior dels quals hi ha els gens *WVOX* a 16q23, *PRKRIP1* a 7q22.1, *MYOM2* a 8p23.3 i *SSTR5* a 16p13.3). Totes aquestes CNVs són potencials candidates per la malaltia ja que no s'han identificat en cap de les mostres control analitzades (n=604), però hi ha tres CNVs que resulten especialment interessants: la microduplicació 22q11.23 (*CABIN1*) i la microduplicació 16p13.3 (*SSTR5*), perquè han mostrat un cert grau de recurrència, identificant-se en més d'un pacient, i la microduplicació 15q13.1 (*NDNL2*) originada *de novo* en un pacient sense antecedents familiars de malaltia psiquiàtrica, i que correspon al segon cas descrit a la literatura amb esquizofrènia i una duplicació *de novo* en aquesta regió cromosòmica, a continuació abordarem aquestes tres regions amb més detall.

La **microduplicació 22q11.23** present en dos pacients amb esquizofrènia, es localitza en una regió identificada en estudis de lligament significatius per l'esquizofrènia. En un dels dos pacients es va poder determinar que el seu origen era *de novo*, mentre que en l'altre es desconeix si és heretada. Aquest guany, identificat mitjançant dues sondes de MLPA localitzades sobre els gens *DDT* i *CABIN1*, va ser validat mitjançant SNP-array, podent així definir 1,9Mb duplicades en el pacient 1 (arr 22q11.23(21338007-23327473)x3) i 1,3 Mb en el pacient 2 (arr 22q11.23(21995356-23327473)x3). Els punts de trencament d'ambdues microduplicacions coincideixen en l'extrem telomèric localitzat sobre un LCR, però difereixen en l'extrem centròmeric, que coincidia amb dos LCRs diferents (Figura 5.4). La localització dels extrems d'aquests reordenaments en duplicacions segmentàries paràlogues suggereix que aquestes microduplicacions s'han generat per NAHR. En el segment comú de les dues microduplicacions (1,3 Mb) s'hi localitzen 27 gens, alguns d'ells interessants candidats funcionals per l'esquizofrènia. El producte del gen *CABIN1* (*calcineurin binding protein*) s'uneix específicament a la forma activada de la calcineurina, proteïna que juga un paper important en la regulació del senyal de transducció dopaminèrgica (Greengard et

al., 2001) i en la inducció de certes formes N-metil-D-aspartat del receptor dependent de plasticitat sinàptica (Mulkey et al. 1994; Zeng et al. 2001). L'alteració de la funció de la calcineurina es creu que podria comprometre la crítica relació entre els senyals dopaminèrgic i glutaminèrgic. Un altre gen candidat localitzat en aquesta regió és el *ADORA2A* (*adenosine A2A receptor*). Codifica per un dels subtipus de receptors de les adenosines i es tracta d'una proteïna abundant en el gangli basal i una de les principals dianes de la cafeïna. Diverses troballes apunten a una associació entre polimorfismes d'aquest gen i l'ansietat generada per la cafeïna (Alsene et al. 2003). Els receptors d'adenosina colocalitzen amb els de la dopamina (*DRD2* i *DRD3*) en el cervell, i l'existència de formes heteromèriques de receptors formats per subunitats A2A/D2, A2A/D3 i A2A/mGlu5, estan essent investigades en la recerca de noves teràpies per l'esquizofrènia (Wardas 2008).

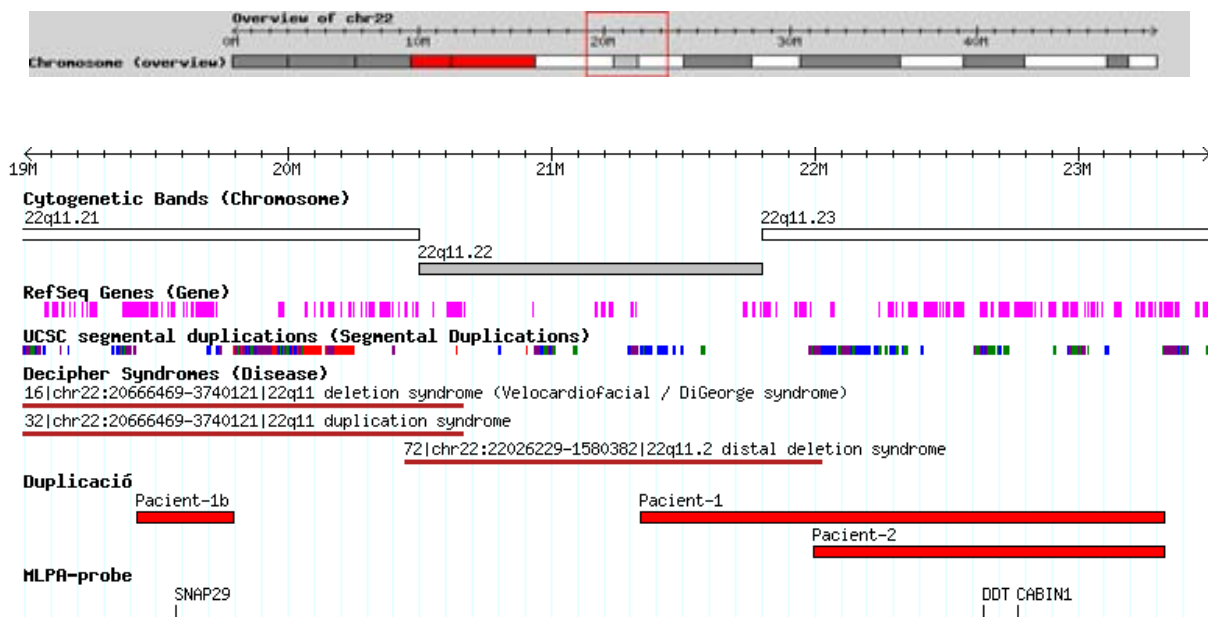


Figura 5.4: Microduplicació 22q11.23. La figura mostra el tamany de les dues microduplicacions identificades en el pacient 1 i el pacient 2, així com la localització les sondes de MLPA. S'indica també la segona CNV detectada en el pacient 1, que s'inclou dins la regió de 3Mb pròpia de la SDG/VCF.

En el pacient 1, amb la microduplicació de 1,9Mb *de novo*, es va identificar una segona CNV més centromèrica en el mateix cromosoma 22, concretament es tracta d'una **midroduplicació** d'un 367Kb (aCGH 22q11.2(B36:19424781-19792353++)) que afecta el gen *SNAP29* i es localitza entre els LCR22-C i D de dins la regió de 3Mb més comunament delecionada en la SDG/VCF (vegeu Figura 5.4). Aquesta variant és heretada per via maternar (sense trastorn psiquiàtric però

afectada d'epilèpsia). Aquest fet, juntament amb l'existència de dos altres germans, d'un total de cinc, afectats per trastorns psiquiàtrics, ens va portar a analitzar amb més detall aquesta família. La duplicació a la regió *SNAP29* es va identificar en tots els individus dels que es va poder obtenir DNA, els dos germans amb malaltia psiquiàtrica (un germà amb esquizofrènia i una germana amb depressió major), però també en una germana sana (veure Figura suplementària S5 de la publicació derivada de l'estudi III). Malgrat no es va poder realitzar l'anàlisi complet de la família, aquesta microduplicació ha estat identificada en 5 individus, 4 amb patologia neurològica (dos casos amb esquizofrènia, un amb depressió major i un amb epilèpsia). Les persones amb epilèpsia mostren un increment en el risc de desenvolupar esquizofrènia (Qin et al. 2005), i existeixen altres CNVs que han estat també implicades amb els dos trastorns com la microdeleció 15q13.3 (Helbig et al. 2009), la microdeleció 22q11.2 (Moreno Izco et al. 2009). També entre els pacients recentment descrits amb esquizofrènia i microdeleció 1q21.1 hi havia un cas que presentava epilèpsia (Mefford and Eichler 2009). Entre els vuit gens localitzats en aquesta microduplicació de la regió 22q11.2 destaquen el *PIK4CA* i el *SNPA29* com a candidats interessants pels trastorns del neurodesenvolupament observats en aquesta família. El gen *PIK4CA* és un bon candidat funcional ja que codifica per un enzim implicat en la via del fofatidilinositol, que és inhibida pel liti, molècula emprada en el tractament dels trastorns afectius. Diversos SNPs d'aquest gen han estat associats amb l'esquizofrènia en general (Jungerius et al., 2008; Saito et al., 2003; Wonodi et al., 2005) i també amb l'esquizofrènia de pacients amb la microdeleció 22q11.2 (Vorstman et al. 2009). Respecte el gen *SNAP29*, codifica per una molècula candidata en la regulació del desassemblatge del complex SNARE (Su et al. 2001), complex implicat en la fusió de membranes i alliberació de neurotransmissors. Una eficient formació i dissociació d'aquest complex és particularment important en les neurones que experimenten un elevat potencial d'acció (Littleton et al. 1998; Sanyal et al. 2001). En cèl·lules neuronals d'hipocamp de rata, cultivades in vitro, s'ha observat que una sobre expressió de *SNAP29* inhibeix substancialment la transmissió sinàptica amb una finestra de freqüència específica (0.1-1Hz), suggerint que *SNAP29* actua com un modulador negatiu per la alliberació de neurotransmissors, probablement alentint el reciclatge de la maquinària de SNARE i el recanvi de vesícules sinàptiques (Pan et al. 2005).

Una altra CNV recurrent, identificada en tres pacients amb esquizofrènia, és el guany detectat en el gen *SSTR5* (*somatostatin receptor 5*) Aquest guany només

es va poder avaluar i confirmar, mitjançant *arrays*, en un dels tres pacients, en el qual la microduplicació afecta a 5kb de la regió 16p13.3, on s'inclou únicament el gen *SSTR5* (arr 16q23.1(76755512-77263464)x3) (Figura 5.5). Malauradament, en cap cas va ser possible determinar si eren CNVs *de novo* o heretades. El gen *SSTR5* és un interessant candidat pels trastorns psiquiàtrics, i ha estat associat amb els desordre bipolar (Nyegaard et al., 2002). La somatostatina es troba àmpliament distribuïda pel sistema nerviós central i desenvolupa funcions relacionades amb la neurotransmissió (Rubinow et al. 1988). El gen *SSTR5* es creu que podria tenir una funció en els complexos receptors de proteïnes G, especialment amb el receptor de la dopamina D2 (*DRD2*) (Patel et al. 1995).

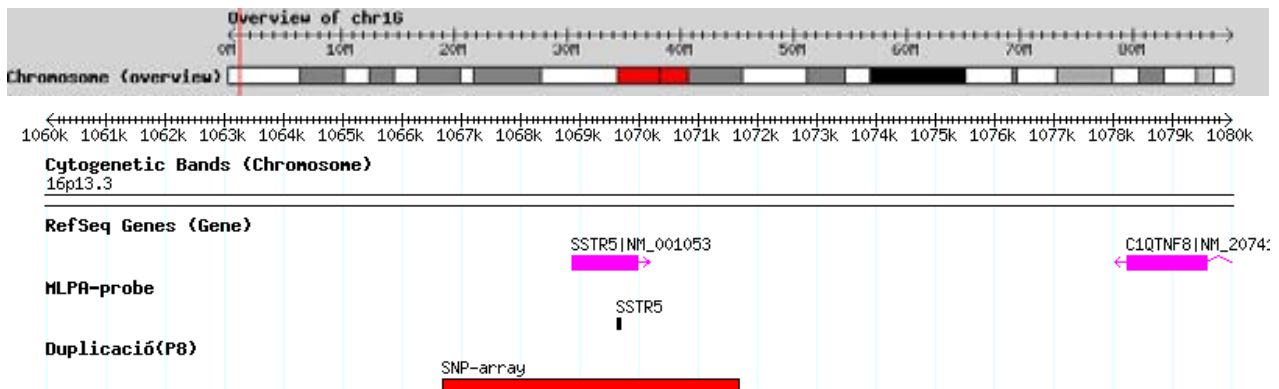


Figura 5.5: Guany en la regió del gen *SSTR5*. S'indica la localització de la sonda de MLPA pel gen *SSTR5* i la llargada de la microduplicació verificada mitjançant l'array de SNPs (Illumina370K).

Finalment, la **microduplicació 15q13.1** (gen *NDNL2*) va ser detectada mitjançant l'array de BACs de 5.6K (RP11-408F10 i RP11-374K20) en l'estudi II-B, i corroborada en l'estudi III. Aquesta microduplicació definida en ~500Kb per l'array d'illumina-370K (arr 15q13.1(B36:27261995-27730663)x3) (Figura 4.3 - pag137), solapa amb una microduplicació més gran (1,4Mb) prèviament descrita a la literatura, també *de novo* en un pacient amb esquizofrènia (Kirov et al. 2008) i amb una deleció de 3,95Mb identificada en un pacient amb retard mental (Sharp et al. 2006). La duplicació parcial del gen *APBA2* ha estat descrita en pacients amb autisme (Sutcliffe et al. 2003). La duplicació del gen *TJP1* s'ha observat en un individu control, mentre que la deleció en *TJP1* s'ha observat en un cas amb esquizofrènia (2008). La microduplicació identificada en aquest treball afecta només els gen *NDNL2* i *KIAA0572*, que codifica per una putativa proteïna transmembrana.

El gen *NDNL2* és membre de la família necdin/MAGE de supressors del creixement, i la seva funció es creu que és la de facilitar l'entrada de la cèl·lula dins el cicle d'arrest cel·lular (G0). En relació als teixits que poden tenir interès en l'esquizofrènia, trobem que aquest gen s'expressa al cervell (hipotàlem) i en cèl·lules dendrítiques. Mostra també alts nivells d'expressió en sang (cèl·lules B i T), tiroides, amígdala i testicles. La troballa d'aquest pacient, portador d'una microduplicació més petita que la descrita prèviament a la literatura, permet suggerir el gen *NDNL2* com a principal candidat de la regió per a l'esquizofrènia, en comptes del gen *APBA2* com s'havia suggerit en el treball de Kirov et al. (Kirov et al. 2008).

Noves perspectives en l'estudi genètic de l'esquizofrènia

De manera anàloga a altres malalties psiquiàtriques, els estudis genètics en el camp de l'esquizofrènia, han aportat pobres resultats. Entre les possibles causes d'aquest fet s'apunten varis factors: la heterogeneïtat de locus implicats, una penetrància incompleta i una interacció amb factors no genètics, fets que contribueixen a una baixa contribució dels al·lels de risc (odd ratios < 2). Aquests al·lels de baix risc serien difícilment identificats en els estudis de lligament, els quals no tenen suficient poder per detectar-los, i només podrien ser descrits en els estudis d'associació, sempre i quan es tractes d'un al·lel comú en la població analitzada (freqüència > 0.05). Aquestes condicions fan que sovint els resultats en la identificació de gens candidats no es puguin replicar, essent aquest un dels principals esculls en la recerca genètica de l'esquizofrènia.

La recent descripció d'una nova forma de variabilitat genètica, les CNVs, ha generat noves expectatives en la recerca genètica de la esquizofrènia (i de totes les malalties complexes). S'ha descrit que en aquestes regions variables en nombre de còpia existeix un enriquiment de gens implicats en el desenvolupament del sistema nerviós central (de Smith et al. 2007) i alguns d'aquests gens, com per exemple el *PDE4*, *CHRNA7* i *DISC1*, són importants candidats per malalties psiquiàtriques. Els resultats d'aquesta tesi, en concordança amb treballs recentment publicats, posen de relleu la implicació de diverses CNVs rares amb l'esquizofrènia (Sullivan et al., 2008; Walsh et al., 2008; Stefansson et al., 2008; Kirov et al., 2008; Xu et al., 2008; International Schizophrenia Consortium 2008). Aquestes CNVs, majoritàriament poc freqüents s'han identificades en un nombre petit de pacients i per tant només permeten explicar la causa genètica d'un percentatge baix de casos

amb esquizofrènia. Tot i així estan contribuint a definir nous loci i gens candidats per a aquestes malalties (McClellan et al. 2007), i es pronostica que el nombre de CNVs associades amb malalties del neurodesenvolupament anirà en augment en els propers anys (McCarroll et al. 2008).

Actualment doncs, els estudis genètics en el camp de l'esquizofrènia s'estan debatent entre dues hipòtesis: *malaltia comú-variant comú*, que postula que les malalties comuns són originades per moltes variants freqüents que tenen un efecte petit o moderat en la malaltia, o *malaltia comú-variant rara*, que sosté que els trets complexes comuns són conseqüència d'una suma de variants de baixa freqüència amb una elevada penetrància. Aquests dos models comporten dues estratègies ben diferents en la recerca dels gens implicats en l'etiologia d'aquesta malaltia. El primer model planteja la necessitat d'estudiar àmplies mostres per tal de capturar les variants amb un efecte petit en la malaltia, en canvi l'estudi de grans mostres de pacients no és la millor estratègia si com proposa la segona hipòtesi existeixen mutacions individualment rares en diferents gens i regions del genoma.

El desenvolupament de plataformes de genotipació de SNPs, amb un cost cada vegada més baix, permeten realitzar estudis de GWA en grans mostres de pacients i controls. Aquest tipus d'anàlisi incorpora l'avantatge dels estudis d'associació (amb poder per detectar al·lels amb efectes petits) i la dels estudis de lligament on s'analitza tot el genoma en global sense haver fet prèviament una selecció de gens o regions candidates. Addicionalment, aquestes plataformes permeten la detecció simultània de CNVs. Un interès creixent dels investigadors en poder apreciar aquesta font de variabilitat està portant a les companyies comercials de genotipació a desenvolupar productes (Affymetrix 6.0™ and Human1M BeadChip, Illumina™) amb una major cobertura de les regions que contenen CNVs, algunes d'elles poc cobertes en les primeres plataformes basades en SNPs. Tot i així la cobertura que ofereixen actualment les plataformes és encara relativa i la capacitat d'aquesta arrays per discriminar entre amplis rangs de còpies d'un CNV està encara per determinar. Per altra banda, el descobriment de noves CNVs mitjançant tecnologies i experiments de reseqüenciació està posant de manifest que les actuals plataformes SNP/CNV només permeten identificar, aproximadament, la meitat dels locus variables en nombre de còpies del genoma humà (Kidd et al., 2008).

Aquestes noves eines i estratègies obren una finestra d'optimisme en la recerca de les bases genètiques de l'esquizofrènia. Tot i així, l'èxit futur d'aquests treballs dependrà també d'altres factors com la capacitat de reunir llargues sèries de pacients amb el fenotip correctament avaluat, de col·laboracions efectives on es comparteixin pacients per la recerca i de l'habilitat en l'anàlisi de bases de dades molt extenses i complexes. Esperem que ens els propers anys es vagin elucidant les causes genètiques de l'esquizofrènia i es puguin determinar els mecanismes patogènics de la malaltia, contribuint així a millorar els tractaments farmacològics dels pacients i la seva qualitat de vida.

6. Conclusions

1. Els 12 pacients identificats amb la microdeleció 22q11.2 mostren característiques clíniques de la SDG/VCF, on la insuficiència velofaríngea, els trets facials dismòrfics i les anomalies immunològiques son manifestacions comunes i presents en el 100% dels casos.
2. L'anàlisi de FISH en nuclis interfàsics ens ha permès descartar la presència de la microduplicació 22q11.2 en 295 pacients amb fenotip de SDG/VCF, indicant que el fenotip associat a aquesta CNV probablement té poc solapament amb l'espectre fenotípic de la SDG/VCF.
3. La tècnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), es mostra com una estratègia fiable, ràpida i econòmica per a l'anàlisi de la regió 22q11.2 en àmplies sèries de pacients amb esquizofrènia.
4. S'ha constatat que la freqüència de la microdeleció 22q11.2 és de l'1% en pacients amb esquizofrènia, mentre que la seva microduplicació recíproca no es troba associada amb la patologia.
5. L'anàlisi mitjançant array-CGH ha demostrat ser una bona aproximació a l'hora de caracteritzar CNVs addicionals en pacients amb fenotip de SDG/VCF sense la microdeleció 22q11.2 típica.
6. S'ha descrit, per primera vegada, la microduplicació recíproca de la microdeleció associada a la síndrome de TAR, en dos pacients i es suggereix la seva possible implicació en els defectes cardíacs congènits.
7. S'ha identificat un pacient portador d'una microdeleció a la regió 1q21.1 i les característiques clíniques d'aquest pacient: defectes cardíacs, insuficiència velofaríngea, retard mental lleu i problemes de conducta, contribueixen a definir el fenotip d'aquesta nova malaltia genòmica, que suggereix un cert solapament clínic amb la SDG/VCF.

8. L'anàlisi de CNVs en pacients amb esquizofrènia posa de manifest l'existència de microduplicacions rares associades amb la malaltia.
9. S'ha identificat una microduplicació *de novo* a la regió 15q13.1 en un pacient amb esquizofrènia esporàdica. En ser el segon cas descrit a la literatura, es conclou que aquesta CNV es troba associada amb l'esquizofrènia. S'ha acotat la regió mínima i se suggereix el gen *NDNL2* com a candidat més plausible.
10. S'han identificat dues CNVs recurrents en pacients amb esquizofrènia i no presents en mostres control. Les microduplicacions a la regió 22q11.23 (1,3-1,9Mb) i 16p13.3 (5kb) apunten als gens *CABIN1*, *ADORA2A* i *SSTR5* com a bons candidats per la patologia psiquiàtrica.
11. S'ha identificat una família amb diferents membres afectes de trastorns psiquiàtrics, portadora d'una microduplicació atípica a la regió 22q11.2, on s'hi localitzen potencials gens candidats com *SNAP29* i *PIK4CA*.
12. S'ha descrit una associació significativa entre el genotip nul de dos gens glutatió transferasa (*GSTM1* i *GSTT2*) amb un efecte additiu que incrementa la vulnerabilitat a l'esquizofrènia. Se suggereix que l'estudi del nombre de còpies *del* conjunt de gens GSTs pot resultar d'interès en la recerca de la vulnerabilitat genètica a l'esquizofrènia.

7. Referències

- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8104-8109
- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT (2006) Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 439:851-855
- Alberti A, Romano C, Falco M, Cali F, Schinocca P, Galesi O, Spalletta A, Di Benedetto D, Fichera M (2007) 1.5 Mb de novo 22q11.21 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features. *Clin Genet* 71:177-182
- Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA (2005) Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes *DEFA1* and *DEFA3*. *Hum Mol Genet* 14:2045-2052
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L (2008) Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 40:827-834
- Alsene K, Deckert J, Sand P, de Wit H (2003) Association between *A2a* receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology* 28:1694-1702
- Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, Giannotti A, Gabrielli O, Novelli G, Dallapiccola B (1999) Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet* 7:903-909
- Andreasen NC, Rice J, Endicott J, Coryell W, Grove WM, Reich T (1987) Familial rates of affective disorder. A report from the National Institute of Mental Health Collaborative Study. *Arch Gen Psychiatry* 44:461-469
- Arinami T (2006) Analyses of the associations between the genes of 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J Hum Genet* 51:1037-1045
- Armengol L, Rabionet R, Estivill X (2008) The emerging role of structural variations in common disorders: initial findings and discovery challenges. *Cytogenet Genome Res* 123:108-117
- Armour JA, Palla R, Zeeuwen PL, den Heijer M, Schalkwijk J, Hollox EJ (2007) Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. *Nucleic Acids Res* 35:e19
- Arnold PD, Siegel-Bartelt J, Cytrynbaum C, Teshima I, Schachar R (2001) Velo-cardio-facial syndrome: Implications of microdeletion 22q11 for schizophrenia and mood disorders. *Am J Med Genet* 105:354-362
- Augusseau S, Jouk S, Jalbert P, Prieur M (1986) DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet* 74:206
- Babcock M, Pavlicek A, Spiteri E, Kashork CD, Ioshikhes I, Shaffer LG, Jurka J, Morrow BE (2003) Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution. *Genome Res* 13:2519-2532
- Babcock M, Yatsenko S, Hopkins J, Brenton M, Cao Q, de Jong P, Stankiewicz P, Lupski JR, Sikela JM, Morrow BE (2007) Hominoid lineage specific

Referències

- amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 16:2560-2571
- Bailey JA, Church DM, Ventura M, Rocchi M, Eichler EE (2004) Analysis of segmental duplications and genome assembly in the mouse. *Genome Res* 14:789-801
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297:1003-1007
- Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE (2001) Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11:1005-1017
- Barrett JC, Cardon LR (2006) Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat Genet* 38:659-662
- Bassett AS, Chow EW, Husted J, Hodgkinson KA, Oechslin E, Harris L, Silversides C (2009) Premature death in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *J Med Genet* 46:324-330
- Bassett AS, Chow EW, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA (2005) Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 138:307-313
- Bassett AS, Chow EW, Weksberg R (2000) Chromosomal abnormalities and schizophrenia. *Am J Med Genet* 97:45-51
- Battaglia A, Gurrieri F, Bertini E, Bellacosa A, Pomponi MG, Paravatou-Petsotas M, Mazza S, Neri G (1997) The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology* 48:1081-1086
- Baumeister AA, Francis JL (2002) Historical development of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *J Hist Neurosci* 11:265-277
- Bearden CE, Jawad AF, Lynch DR, Sokol S, Kanesh SJ, McDonald-McGinn DM, Saitta SC, Harris SE, Moss E, Wang PP, Zackai E, Emanuel BS, Simon TJ (2004) Effects of a functional COMT polymorphism on prefrontal cognitive function in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 161:1700-1702
- Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS, Hummel M, Amato S, Tartaglia N, Berg J, Sutton VR, Lalani SR, Chinault AC, Cheung SW, Lupski JR, Patel A (2008) 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet* 82:214-221
- Benes FM (2000) Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:251-269
- Benes FM (2009) Neural circuitry models of schizophrenia: is it dopamine, GABA, glutamate, or something else? *Biol Psychiatry* 65:1003-1005
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39:17-23
- Blennow E, Lagerstedt K, Malmgren H, Sahlen S, Schoumans J, Anderlid B (2008) Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. *Clin Genet* 74:61-67
- Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM, Mahle WT, Campbell RM (2003) A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics* 112:101-107
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, et al. (2009) A variant near MTNR1B is associated

- with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41:89-94
- Brunet A, Armengol L, Pelaez T, Guillamat R, Valles V, Gabau E, Estivill X, Guitart M (2008) Failure to detect the 22q11.2 duplication syndrome rearrangement among patients with schizophrenia. *Behav Brain Funct* 4:10
- Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballin MR, Guitart M (2006) Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet A* 140:2426-2432
- Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, et al. (2008) Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 40:1466-1471
- Burbach JP, van der Zwaag B (2009) Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci* 32:69-72
- Burmeister M, McInnis MG, Zollner S (2008) Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet* 9:527-540
- Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De la Fourniere F, Thomas-Anterion C, Verny C, Letournel F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Campion D, Hannequin D (2006) Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain* 129:2966-2976
- Cannon TD, Mednick SA, Parnas J, Schulsinger F, Praestholm J, Vestergaard A (1993) Developmental brain abnormalities in the offspring of schizophrenic mothers. I. Contributions of genetic and perinatal factors. *Arch Gen Psychiatry* 50:551-564
- Cardno AG, Jones LA, Murphy KC, Sanders RD, Asherson P, Owen MJ, McGuffin P (1999) Dimensions of psychosis in affected sibling pairs. *Schizophr Bull* 25:841-850
- Carelle-Calmels N, Saugier-Veber P, Girard-Lemaire F, Rudolf G, Doray B, Guerin E, Kuhn P, Arrive M, Gilch C, Schmitt E, Fehrenbach S, Schnebelen A, Frebourg T, Flori E (2009) Genetic compensation in a human genomic disorder. *N Engl J Med* 360:1211-1216
- Castle DJ, Murray RM (1991) The neurodevelopmental basis of sex differences in schizophrenia. *Psychol Med* 21:565-575
- Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 206:379-390
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169
- Chibuk TK, Bischof JM, Wevrick R (2001) A necdin/MAGE-like gene in the chromosome 15 autism susceptibility region: expression, imprinting, and mapping of the human and mouse orthologues. *BMC Genet* 2:22
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 8:1025-1037
- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK (2008) The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 13:36-64
- Clark AG, Li J (2007) Conjuring SNPs to detect associations. *Nat Genet* 39:815-816

Referències

- Cohen E, Chow EW, Weksberg R, Bassett AS (1999) Phenotype of adults with the 22q11 deletion syndrome: A review. *Am J Med Genet* 86: 359-365
- Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK (2006) A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38: 75-81
- Conti E, Grifone N, Sarkozy A, Tandoi C, Marino B, Digilio MC, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B (2003) DiGeorge subtypes of nonsyndromic conotruncal defects: evidence against a major role of TBX1 gene. *Eur J Hum Genet* 11: 349-351
- Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE (2007) Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet* 39: S22-29
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ (2005) The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 42: 193-204
- Cusco I, del Campo M, Vilardell M, Gonzalez E, Gener B, Galan E, Toledo L, Perez-Jurado LA (2008) Array-CGH in patients with Kabuki-like phenotype: identification of two patients with complex rearrangements including 2q37 deletions and no other recurrent aberration. *BMC Med Genet* 9: 27
- Daniels JK, Williams NM, Williams J, Jones LA, Cardno AG, Murphy KC, Spurlock G, Riley B, Scambler P, Asherson P, McGuffin P, Owen MJ (1996) No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high or low catechol O-methyltransferase activity. *Am J Psychiatry* 153: 268-270
- Davies K, Stiehm ER, Woo P, Murray KJ (2001) Juvenile idiopathic polyarticular arthritis and IgA deficiency in the 22q11 deletion syndrome. *J Rheumatol* 28: 2326-2334
- de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PL, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, et al. (2009) Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet* 41: 211-215
- de la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P (1981) A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* 57: 253-256
- de Smith AJ, Tsalenko A, Sampas N, Scheffer A, Yamada NA, Tsang P, Ben-Dor A, Yakhini Z, Ellis RJ, Bruhn L, Laderman S, Froguel P, Blakemore AI (2007) Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. *Hum Mol Genet* 16: 2783-2794
- de Smith AJ, Walters RG, Froguel P, Blakemore AI (2008) Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. *Cytogenet Genome Res* 123: 17-26
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA (2005) Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 77: 606-616
- DiGeorge AM, Harley RD (1965) The association of aniridia, Wilms's tumor, and genital abnormalities. *Trans Am Ophthalmol Soc* 63: 64-69
- Do KO, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuenod M (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 12: 3721-3728

- Dohrenwend BP, Levav I, Shrout PE, Schwartz S, Naveh G, Link BG, Skodol AE, Stueve A (1992) Socioeconomic status and psychiatric disorders: the causation-selection issue. *Science* 255:946-952
- Donahue WF, Ebling HM (2007) Fosmid libraries for genomic structural variation detection. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 5:Unit 5 20
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV (2003) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12:205-216
- Dudbridge F, Gusnanto A (2008) Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genet Epidemiol* 32:227-234
- Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, et al. (1999) The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402:489-495
- Eberle MA, Ng PC, Kuhn K, Zhou L, Peiffer DA, Galver L, Viaud-Martinez KA, Lawley CT, Gunderson KL, Shen R, Murray SS (2007) Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. *PLoS Genet* 3:1827-1837
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE (1999) A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 8:1157-1167
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR (2001) Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6917-6922
- Eichler EE, Nickerson DA, Altshuler D, Bowcock AM, Brooks LD, Carter NP, Church DM, Felsenfeld A, Guyer M, Lee C, Lupski JR, Mullikin JC, Pritchard JK, Sebat J, Sherry ST, Smith D, Valle D, Waterston RH (2007) Completing the map of human genetic variation. *Nature* 447:161-165
- Emanuel BS (2008) Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev* 14:11-18
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73:1027-1040
- Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, Kalscheuer V, Ropers HH, Spaich C, Tzschach A (2007) Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet A* 143:172-178
- Fan JB, Ma J, Zhang CS, Tang JX, Gu NF, Feng GY, St Clair D, He L (2003) A family-based association study of T1945C polymorphism in the proline dehydrogenase gene and schizophrenia in the Chinese population. *Neurosci Lett* 338:252-254
- Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward JM, Gough SC, de Smith A, Blakemore AI, Froguel P, Owen CJ, Pearce SH, Teixeira L, Guillevin L, Graham DS, Pusey CD, Cook HT, Vyse TJ, Aitman TJ (2007) FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet* 39:721-723
- Farrell MJ, Stadt H, Wallis KT, Scambler P, Hixon RL, Wolfe R, Leatherbury L, Kirby ML (1999) HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ Res* 84:127-135

Referències

- Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF (2006) A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79:439-448
- Fernandes C, Hoyle E, Dempster E, Schalkwyk LC, Collier DA (2006) Performance deficit of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in a delayed matching-to-place task suggests a mild impairment of working/episodic-like memory. *Genes Brain Behav* 5:433-440
- Fernandez L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares M, Martinez I, Fernandez B, Quero J, Garcia-Guereta L, Garcia-Alix A, Burgueros M, Galan-Gomez E, Carbonell-Perez JM, Perez-Granero A, Torres-Juan L, Heine-Suner D, Rosell J, Delicado A (2008) Unrelated chromosomal anomalies found in patients with suspected 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet A* 146A:1134-1141
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7:85-97
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP (2003) DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361-374
- Fine SE, Weissman A, Gerdes M, Pinto-Martin J, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS (2005) Autism spectrum disorders and symptoms in children with molecularly confirmed 22q11.2 deletion syndrome. *J Autism Dev Disord* 35:461-470
- Flejter WL, Bennett-Baker PE, Ghaziuddin M, McDonald M, Sheldon S, Gorski JL (1996) Cytogenetic and molecular analysis of inv dup(15) chromosomes observed in two patients with autistic disorder and mental retardation. *Am J Med Genet* 61:182-187
- Frayling TM (2007) Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* 8:657-662
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449:851-861
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10:241-251
- Friedman JI, Vrijenhoek T, Markx S, Janssen IM, van der Vliet WA, Faas BH, Knoers NV, Cahn W, Kahn RS, Edelmann L, Davis KL, Silverman JM, Brunner HG, van Kessel AG, Wijmenga C, Ophoff RA, Veltman JA (2008) CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry* 13:261-266
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, et al. (2006) Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 79:500-513
- Fryburg JS, Lin KY, Golden WL (1996) Chromosome 22q11.2 deletion in a boy with Opitz (G/BBB) syndrome. *Am J Med Genet* 62:274-275
- Fung WL, Chow EW, Webb GD, Gatzoulis MA, Bassett AS (2008) Extracardiac features predicting 22q11.2 Deletion Syndrome in adult congenital heart disease. *Int J Cardiol*
- Funke B, Epstein JA, Kochilas LK, Lu MM, Pandita RK, Liao J, Bauerndistel R, Schuler T, Schorle H, Brown MC, Adams J, Morrow BE (2001) Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial

- syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum Mol Genet* 10:2549-2556
- Funke BH, Lencz T, Finn CT, DeRosse P, Poznik GD, Plocik AM, Kane J, Rogus J, Malhotra AK, Kucherlapati R (2007) Analysis of TBX1 variation in patients with psychotic and affective disorders. *Mol Med* 13: 407-414
- Giannotti A, Digilio MC, Marino B, Mingarelli R, Dallapiccola B (1994) Cayler cardiofacial syndrome and del 22q11: part of the CATCH22 phenotype. *Am J Med Genet* 53:303-304
- Glaser B, Schumacher J, Williams HJ, Jamra RA, Ianakiev N, Milev R, Ohlraun S, Schulze TG, Czerski PM, Hauser J, Jonsson EG, Sedvall GC, Klopp N, Illig T, Becker T, Propping P, Williams NM, Cichon S, Kirov G, Rietschel M, Murphy KC, O'Donovan MC, Nothen MM, Owen MJ (2005) No association between the putative functional ZDHHC8 single nucleotide polymorphism rs175174 and schizophrenia in large European samples. *Biol Psychiatry* 58: 78-80
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT (2003) Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry* 160:469-476
- Goff DC, Coyle JT (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1367-1377
- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, Beck KD, Luine V, Lucas LR, Nadler JV, Karayiorgou M (1999) The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet* 21:434-439
- Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL (2007) The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8685-8690
- Gong W, Gottlieb S, Collins J, Blescia A, Dietz H, Goldmuntz E, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS, Driscoll DA, Budarf ML (2001) Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *J Med Genet* 38:E45
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell R J, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307:1434-1440
- Goodier JL, Kazazian HH, Jr. (2008) Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135:23-35
- Gothelf D, Feinstein C, Thompson T, Gu E, Penniman L, Van Stone E, Kwon H, Eliez S, Reiss AL (2007) Risk factors for the emergence of psychotic disorders in adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 164:663-669
- Gothelf D, Presburger G, Levy D, Nahmani A, Burg M, Berant M, Blieden LC, Finkelstein Y, Frisch A, Apter A, Weizman A (2004) Genetic, developmental, and physical factors associated with attention deficit hyperactivity disorder in patients with velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 126B:116-121
- Gotter AL, Shaikh TH, Budarf ML, Rhodes CH, Emanuel BS (2004) A palindrome-mediated mechanism distinguishes translocations involving LCR-B of chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 13: 103-115
- Greenberg F, Crowder WE, Paschall V, Colon-Linares J, Lubianski B, Ledbetter DH (1984) Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. *Hum Genet* 65:317-319
- Gregory TR (2005) Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nat Rev Genet* 6:699-708

Referències

- Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, et al. (2004) The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 428:529-535
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1:4
- Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A (2001) Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 27:293-298
- Guryev V, Saar K, Adamovic T, Verheul M, van Heesch SA, Cook S, Pravenec M, Aitman T, Jacob H, Shull JD, Hubner N, Cuppen E (2008) Distribution and functional impact of DNA copy number variation in the rat. *Nat Genet* 40:538-545
- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ (2007) Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16621-16626
- Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJ, Eichler EE, Vermeesch JR (2009) Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 46:223-232
- Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4):593-624
- Hassed SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ (2004) A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Clin Genet* 65:400-404
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR (2009) A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 5:e1000327
- Hay BN (2007) Deletion 22q11: spectrum of associated disorders. *Semin Pediatr Neurol* 14:136-139
- Hayes JD, Strange RC (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61:154-166
- Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, et al. (2009) 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* 41:160-162
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdottir S, Steinthorsdottir V, Manolescu A, Jones GT, et al. (2008) The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 40:217-224
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, et al. (2007) A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316:1491-1493
- Hierck BP, Molin DG, Boot MJ, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (2004) A chicken model for DGCR6 as a modifier gene in the DiGeorge critical region. *Pediatr Res* 56:440-448
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR (2005) Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307:1072-1079

- Hiroi N, Zhu H, Lee M, Funke B, Arai M, Itokawa M, Kucherlapati R, Morrow B, Sawamura T, Agatsuma S (2005) A 200-kb region of human chromosome 22q11.2 confers antipsychotic-responsive behavioral abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19132-19137
- Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PC, Traupe H, de Jongh G, den Heijer M, Reis A, Armour JA, Schalkwijk J (2008) Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet* 40:23-25
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26:93-96
- Howes OD, McDonald C, Cannon M, Arseneault L, Boydell J, Murray RM (2004) Pathways to schizophrenia: the impact of environmental factors. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1:S7-S13
- Huang B, Crolla JA, Christian SL, Wolf-Ledbetter ME, Macha ME, Papenhausen PN, Ledbetter DH (1997) Refined molecular characterization of the breakpoints in small inv dup(15) chromosomes. *Hum Genet* 99:11-17
- Hurles ME, Dermitzakis ET, Tyler-Smith C (2008) The functional impact of structural variation in humans. *Trends Genet* 24:238-245
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951
- International Schizophrenia Consortium (2008) Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455:237-241
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29:306-309
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP, Munnich A, Colleaux L, Philippe A (2006) Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 43:843-849
- Jacquet H, Raux G, Thibaut F, Hecketsweiler B, Houy E, Demilly C, Haouzir S, Allio G, Fouldrin G, Drouin V, Bou J, Petit M, Champion D, Frebourg T (2002) PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet* 11:2243-2249
- Jalali GR, Vorstman JA, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, Emanuel BS (2008) Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat* 29:433-440
- Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148:1301-1308
- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE (2001) Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 139:715-723
- Jentsch JD, Roth RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20:201-225
- Jerome LA, Papaioannou VE (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* 27:286-291
- Jungerius BJ, Hoogendoorn ML, Bakker SC, Van't Slot R, Bardoel AF, Ophoff RA, Wijmenga C, Kahn RS, Sinke RJ (2008) An association screen of myelin-

Referències

- related genes implicates the chromosome 22q11 PIK4CA gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 13:1060-1068
- Kalkman HO, Subramanian N, Hoyer D (2001) Extended radioligand binding profile of iloperidone: a broad spectrum dopamine/serotonin/norepinephrine receptor antagonist for the management of psychotic disorders. *Neuropsychopharmacology* 25:904-914
- Kamnasaran D, Muir WJ, Ferguson-Smith MA, Cox DW (2003) Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia. *J Med Genet* 40:325-332
- Karayorgou M, Gogos JA, Galke BL, Jeffery JA, Nestadt G, Wolyniec PS, Antonarakis SE, Kazazian HH, Housman DE, Driscoll DA, Pulver AE (1996) Genotype and phenotype analysis at the 22q11 schizophrenia susceptibility locus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:835-843
- Karayorgou M, Morris MA, Morrow B, Shprintzen RJ, Goldberg R, Borrow J, Gos A, Nestadt G, Wolyniec PS, Lasseter VK, et al. (1995) Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7612-7616
- Katzman PJ, Wang B, Sawhney M, Wang N (2005) Differential detection of deletion 22q11.2 syndrome by specialty and indication. *Pediatr Dev Pathol* 8:557-567
- Kazazian HH, Jr., Moran JV (1998) The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet* 19:19-24
- Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH (1982) The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 101:197-200
- Kendler KS, Karkowski LM, Walsh D (1998) The structure of psychosis: latent class analysis of probands from the Roscommon Family Study. *Arch Gen Psychiatry* 55:492-499
- Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, Hansen N, et al. (2008) Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 453:56-64
- Kim JS, Kornhuber HH, Holzmüller B, Schmid-Burgk W, Mergner T, Krzepinski G (1980) Reduction of cerebrospinal fluid glutamic acid in Huntington's chorea and in schizophrenic patients. *Arch Psychiatr Nervenkr* 228:7-10
- Kimber WL, Hsieh P, Hirotsune S, Yuva-Paylor L, Sutherland HF, Chen A, Ruiz-Lozano P, Hoogstraten-Miller SL, Chien KR, Paylor R, Scambler PJ, Wynshaw-Boris A (1999) Deletion of 150 kb in the minimal DiGeorge/velocardiofacial syndrome critical region in mouse. *Hum Mol Genet* 8:2229-2237
- Kirby ML, Bockman DE (1984) Neural crest and normal development: a new perspective. *Anat Rec* 209:1-6
- Kirby ML, Gale TF, Stewart DE (1983) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220:1059-1061
- Kirchhoff M, Bisgaard AM, Duno M, Hansen FJ, Schwartz M (2007) A 17q21.31 microduplication, reciprocal to the newly described 17q21.31 microdeletion, in a girl with severe psychomotor developmental delay and dysmorphic craniofacial features. *Eur J Med Genet* 50:256-263
- Kirov G, Gumus D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, O'Donovan MC, Erdogan F, Owen MJ, Ropers HH, Ullmann R (2008a) Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 17:458-465
- Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ (2005) Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest* 115:1440-1448

- Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, Hillmer A, Toncheva D, Owen MJ, O'Donovan MC (2008b) A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Mol Psychiatry*
- Kitsiou-Tzeli S, Kolialexi A, Fryssira H, Galla-Voumvouraki A, Salavoura K, Kanariou M, Tsangaris GT, Kanavakis E, Mavrou A (2004) Detection of 22q11.2 deletion among 139 patients with Di George/Velocardiofacial syndrome features. *In Vivo* 18:603-608
- Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, Taillon BE, Chen Z, Tanzer A, Saunders AC, Chi J, Yang F, Carter NP, Hurler ME, Weissman SM, Harkins TT, Gerstein MB, Egholm M, Snyder M (2007) Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 318:420-426
- Kornhuber J (1992) Phencyclidine and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 149:848-849
- Kunugi H, Vallada HP, Sham PC, Hoda F, Arranz MJ, Li T, Nanko S, Murray RM, McGuffin P, Owen M, Gill M, Collier DA (1997) Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and schizophrenia: a transmission disequilibrium study in multiply affected families. *Psychiatr Genet* 7:97-101
- Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E, Kato T, Ohye T, Kogo H, Emanuel BS (2007) Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. *Genome Res* 17:461-469
- Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS (2003) The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738
- Lacassie Y, Arriaza MI (1996) Opitz GBBB syndrome and the 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet* 62:318
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6:243-250
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nussbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Lawrie SM, Whalley H, Kestelman JN, Abukmeil SS, Byrne M, Hodges A, Rimmington JE, Best JJ, Owens DG, Johnstone EC (1999) Magnetic resonance imaging of brain in people at high risk of developing schizophrenia. *Lancet* 353:30-33
- Leana-Cox J, Jenkins L, Palmer CG, Plattner R, Sheppard L, Flejter WL, Zackowski J, Tsien F, Schwartz S (1994) Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications. *Am J Hum Genet* 54:748-756
- Lee AS, Gutierrez-Arcelus M, Perry GH, Vallender EJ, Johnson WE, Miller GM, Korbel JO, Lee C (2008) Analysis of copy number variation in the rhesus macaque genome identifies candidate loci for evolutionary and human disease studies. *Hum Mol Genet* 17:1127-1136
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235-1247
- Lee JA, Inoue K, Cheung SW, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR (2006) Role of genomic architecture in PLP1 duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet* 15:2250-2265

Referències

- Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK (2007) Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12:572-580
- Lettre G, Rioux JD (2008) Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 17:R116-121
- Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, et al. (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5:e254
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G (2006) Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med* 12:1016-1022
- Lewis SW, Murray RM (1987) Obstetric complications, neurodevelopmental deviance, and risk of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 21:413-421
- Li D, He L (2006) Association study of the G-protein signaling 4 (RGS4) and proline dehydrogenase (PRODH) genes with schizophrenia: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 14:1130-1135
- Li T, Ma X, Sham PC, Sun X, Hu X, Wang Q, Meng H, Deng W, Liu X, Murray RM, Collier DA (2004) Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B:13-15
- Li T, Sham PC, Vallada H, Xie T, Tang X, Murray RM, Liu X, Collier DA (1996) Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 6:131-133
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283:1-5
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:712-720
- Lindsay EA, Baldini A (2001) Recovery from arterial growth delay reduces penetrance of cardiovascular defects in mice deleted for the DiGeorge syndrome region. *Hum Mol Genet* 10:997-1002
- Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, Bradley A, Baldini A (1999) Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature* 401:379-383
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A (2001) Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410:97-101
- Liou YJ, Tsai SJ, Hong CJ, Wang YC, Lai IC (2001) Association analysis of a functional catechol-o-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenic patients in Taiwan. *Neuropsychobiology* 43:11-14
- Littleton JT, Chapman ER, Kreber R, Garment MB, Carlson SD, Ganetzky B (1998) Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron* 21:401-413
- Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE (2006) Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* 79:275-290
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN (2003) Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33:177-182
- Lund J, Roe B, Chen F, Budarf M, Galili N, Riblet R, Miller RD, Emanuel BS, Reeves RH (1999) Sequence-ready physical map of the mouse chromosome 16

- region with conserved synteny to the human velocardiofacial syndrome region on 22q11.2. *Mamm Genome* 10:438-443
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-422
- Lupski JR (2006) Genome structural variation and sporadic disease traits. *Nat Genet* 38:974-976
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1:e49
- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spiegel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L (2009) Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41:82-88
- Mah S, Nelson MR, Delisi LE, Reneland RH, Markward N, James MR, Nyholt DR, Hayward N, Handoko H, Mowry B, Kammerer S, Braun A (2006) Identification of the semaphorin receptor PLXNA2 as a candidate for susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:471-478
- Makinodan M, Tatsumi K, Manabe T, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Shimoda S, Noriyama Y, Kishimoto T, Wanaka A (2008) Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *J Neurosci Res* 86:2190-2200
- Mannervik B (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 57:357-417
- Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP (2004) DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med* 13:273-279
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:477-488
- Masson E, Le Marechal C, Chandak GR, Lamoril J, Bezieau S, Mahurkar S, Bhaskar S, Reddy DN, Chen JM, Ferec C (2008) Trypsinogen copy number mutations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6:82-88
- Mazzarella R, Schlessinger D (1998) Pathological consequences of sequence duplications in the human genome. *Genome Res* 8:1007-1021
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38:86-92
- McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, Shapero MH, et al. (2008) Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* 40:1166-1174
- McClellan JM, Susser E, King MC (2007) Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br J Psychiatry* 190:194-199
- McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Bason L, Christensen K, Lynch D, Sullivan K, Canning D, Zavod W, Quinn N, Rome J (1995) Autosomal dominant "Opitz" GBBB syndrome due to a 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet* 59:103-113

Referències

- McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH (1999) The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns* 10:11-24
- McDonald-McGinn DM, LaRossa D, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Wang P, Solot C, Schultz P, Lynch D, Bingham P, Keenan G, Weinzimer S, Ming JE, Driscoll D, Clark BJ, 3rd, Markowitz R, Cohen A, Moshang T, Pasquariello P, Randall P, Emanuel BS, Zackai EH (1997) The 22q11.2 deletion: screening, diagnostic workup, and outcome of results; report on 181 patients. *Genet Test* 1:99-108
- McElhinney DB, Driscoll DA, Levin ER, Jawad AF, Emanuel BS, Goldmuntz E (2003) Chromosome 22q11 deletion in patients with ventricular septal defect: frequency and associated cardiovascular anomalies. *Pediatrics* 112:e472
- McGrath JJ (2007) The surprisingly rich contours of schizophrenia epidemiology. *Arch Gen Psychiatry* 64:14-16
- McKinney C, Merriman ME, Chapman PT, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PB, McLean L, O'Donnell JL, Pokorny V, Spellerberg M, Stamp LK, Willis J, Steer S, Merriman TR (2008) Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:409-413
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC (2007) A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316:1488-1491
- Meechan DW, Maynard TM, Gopalakrishna D, Wu Y, LaMantia AS (2007) When half is not enough: gene expression and dosage in the 22q11 deletion syndrome. *Gene Expr* 13:299-310
- Mefford HC, Eichler EE (2009) Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease. *Curr Opin Genet Dev*
- Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, et al. (2008) Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 359:1685-1699
- Meltzer HY, Stahl SM (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2:19-76
- Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultchi AI, Morrow BE, Kucherlapati R (2001) TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104:619-629
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-1423
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE (2006) An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16:1182-1190
- Moon HJ, Yim SV, Lee WK, Jeon YW, Kim YH, Ko YJ, Lee KS, Lee KH, Han SI, Rha HK (2006) Identification of DNA copy-number aberrations by array-

- comparative genomic hybridization in patients with schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 344:531-539
- Moreno Izco F, Zuazo Zamalloa E, Gonzalez Alvaredo S, Bereciartu Irastorza P (2009) [22q11 deletion syndrome: an expanding phenotype]. *Neurologia* 24:69-71
- Moss EM, Batshaw ML, Solot CB, Gerdes M, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Wang PP (1999) Psychoeducational profile of the 22q11.2 microdeletion: A complex pattern. *J Pediatr* 134:193-198
- Mukai J, Dhilla A, Drew LJ, Stark KL, Cao L, MacDermott AB, Karayiorgou M, Gogos JA (2008) Palmitoylation-dependent neurodevelopmental deficits in a mouse model of 22q11 microdeletion. *Nat Neurosci* 11:1302-1310
- Mukai J, Liu H, Burt RA, Swor DE, Lai WS, Karayiorgou M, Gogos JA (2004) Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat Genet* 36:725-731
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486-488
- Munoz S, Garay F, Flores I, Heusser F, Talesnik E, Aracena M, Mellado C, Mendez C, Arnaiz P, Repetto G (2001) [Clinical heterogeneity of the chromosome 22q11 microdeletion syndrome]. *Rev Med Chil* 129:515-521
- Murphy KC, Jones LA, Owen MJ (1999) High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 56:940-945
- Nagase T, Ishikawa K, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (1998) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* 5:31-39
- Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, Patarnello T, Valle G, Danieli GA (2002) Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet* 110:418-421
- Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FT, Christofolini DM, Kulikowski LD, Cernach MC, Emanuel BS, Melaragno MI (2008) Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet* 51:226-230
- Norton N, Williams HJ, Owen MJ (2006) An update on the genetics of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 19:158-164
- Nyegaard M, Borglum AD, Bruun TG, Collier DA, Russ C, Mors O, Ewald H, Kruse TA (2002) Novel polymorphisms in the somatostatin receptor 5 (SSTR5) gene associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 7:745-754
- O'Donovan MC, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, et al. (2009) Analysis of 10 independent samples provides evidence for association between schizophrenia and a SNP flanking fibroblast growth factor receptor 2. *Mol Psychiatry* 14:30-36
- Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Terao T, Suzuki T, Mita T, Abe K (1998) Association study of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Japanese schizophrenics. *Neurosci Lett* 243:109-112
- Olney JW, Farber NB (1995) NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13:335-345
- Oskarsdottir S, Persson C, Eriksson BO, Fasth A (2005) Presenting phenotype in 100 children with the 22q11 deletion syndrome. *Eur J Pediatr* 164:146-153
- Otani K, Ujike H, Tanaka Y, Morita Y, Kishimoto M, Morio A, Uchida N, Nomura A, Kuroda S (2005) The ZDHHC8 gene did not associate with bipolar disorder or schizophrenia. *Neurosci Lett* 390:166-170

Referències

- Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, Lenzi T, Keegan CE, Sutton VR, Belmont J, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Roeder E, Patel A (2008) Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med* 10:267-277
- Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC (2005) Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet* 21:518-525
- Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptacek LJ, Fu YH (2006) Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet* 38:1114-1123
- Pagon RA (2006) GeneTests: an online genetic information resource for health care providers. *J Med Libr Assoc* 94:343-348
- Palomo T, Archer T, Kostrzewa RM, Beninger RJ (2004) Gene-environment interplay in schizopsychotic disorders. *Neurotox Res* 6:1-9
- Pan PY, Cai Q, Lin L, Lu PH, Duan S, Sheng ZH (2005) SNAP-29-mediated modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 280:25769-25779
- Pantano L, Armengol L, Villatoro S, Estivill X (2008) ProSeeK: a web server for MLPA probe design. *BMC Genomics* 9:573
- Pantelis C, Yucel M, Wood SJ, McGorry PD, Velakoulis D (2003) Early and late neurodevelopmental disturbances in schizophrenia and their functional consequences. *Aust N Z J Psychiatry* 37:399-406
- Park J, Chen L, Ratnashinge L, Sellers TA, Tanner JP, Lee JH, Dossett N, Lang N, Kadlubar FF, Ambrosone CB, Zachariah B, Heysek RV, Patterson S, Pow-Sang J (2006) Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1473-1478
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995) The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249-1265
- Paterlini M, Zakharenko SS, Lai WS, Qin J, Zhang H, Mukai J, Westphal KG, Olivier B, Sulzer D, Pavlidis P, Siegelbaum SA, Karayiorgou M, Gogos JA (2005) Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. *Nat Neurosci* 8:1586-1594
- Pavlicek A, House R, Gentles AJ, Jurka J, Morrow BE (2005) Traffic of genetic information between segmental duplications flanking the typical 22q11.2 deletion in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome. *Genome Res* 15:1487-1495
- Paylor R, Lindsay E (2006) Mouse models of 22q11 deletion syndrome. *Biol Psychiatry* 59:1172-1179
- Paylor R, McIlwain KL, McAninch R, Nellis A, Yuva-Paylor LA, Baldini A, Lindsay EA (2001) Mice deleted for the DiGeorge/velocardiofacial syndrome region show abnormal sensorimotor gating and learning and memory impairments. *Hum Mol Genet* 10:2645-2650
- Pe'er I, de Bakker PI, Maller J, Yelensky R, Altshuler D, Daly MJ (2006) Evaluating and improving power in whole-genome association studies using fixed marker sets. *Nat Genet* 38:663-667
- Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA, Park HS, Kim JI, Seo JS, Yakhini Z, Laderman S, Bruhn L, Lee C (2008) The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet* 82:685-695

- Persson C, Niklasson L, Oskarsdottir S, Johansson S, Jonsson R, Soderpalm E (2006) Language skills in 5-8-year-old children with 22q11 deletion syndrome. *Int J Lang Commun Disord* 41:313-333
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211
- Porteous D (2008) Genetic causality in schizophrenia and bipolar disorder: out with the old and in with the new. *Curr Opin Genet Dev* 18:229-234
- Portnoi MF (2009) Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* 52:88-93
- Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F, Taillemite JL, Marlin S (2005) 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A* 137:47-51
- Prescott K, Ivins S, Hubank M, Lindsay E, Baldini A, Scambler P (2005) Microarray analysis of the Df1 mouse model of the 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet* 116:486-496
- Puech A, Saint-Jore B, Merscher S, Russell RG, Cherif D, Sirotkin H, Xu H, Factor S, Kucherlapati R, Skoultchi AI (2000) Normal cardiovascular development in mice deficient for 16 genes in 550 kb of the velocardiofacial/DiGeorge syndrome region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10090-10095
- Qin P, Xu H, Laursen TM, Vestergaard M, Mortensen PB (2005) Risk for schizophrenia and schizophrenia-like psychosis among patients with epilepsy: population based cohort study. *Bmj* 331:23
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10:434-449
- Rauch A, Hofbeck M, Cesnjevar R, Koch A, Rauch R, Buheitel G, Singer H, Weyand M (2004) Search for somatic 22q11.2 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A* 124A:165-169
- Rauch A, Pfeiffer RA, Leipold G, Singer H, Tigges M, Hofbeck M (1999) A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 64:659-666
- Ravnan JB, Chen E, Golabi M, Lebo RV (1996) Chromosome 22q11.2 microdeletions in velocardiofacial syndrome patients with widely variable manifestations. *Am J Med Genet* 66:250-256
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-454
- Reymond A, Henrichsen CN, Harewood L, Merla G (2007) Side effects of genome structural changes. *Curr Opin Genet Dev* 17:381-386
- Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517
- Roberts C, Ivins SM, James CT, Scambler PJ (2005) Retinoic acid down-regulates *Tbx1* expression in vivo and in vitro. *Dev Dyn* 232:928-938
- Robin NH, Shprintzen RJ (2005) Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr* 147:90-96
- Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Alkhalidi LS, Armengol L, Gonzalez E, Badenas C, Estivill X, Mila M (2007) Contiguous deletion of the *NDP*, *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *Am J Med Genet A* 143A:916-920
- Rodriguez-Santiago B, Brunet A, Sobrino B, Serra-Juhe C, Flores R, Armengol L, Vilella E, Gabau E, Guitart M, Guillamat R, Martorell L, Valero J, Gutierrez-

Referències

- Zotes A, Labad A, Carracedo A, Estivill X, Perez-Jurado LA (2009) Association of common copy number variants at the glutathione S-transferase genes and rare novel genomic changes with schizophrenia. *Mol Psychiatry*
- Roth DB, Porter TN, Wilson JH (1985) Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5:2599-2607
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24-26
- Rubinow DR, Davis CL, Post RM (1988) Somatostatin in neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12 Suppl:S137-155
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, et al. (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, et al. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409:928-933
- Saito T, Stopkova P, Diaz L, Papolos DF, Boussemart L, Lachman HM (2003) Polymorphism screening of PIK4CA: possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 116B:77-83
- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Chakraborty PK, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS (2004) Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet* 13:417-428
- Saitta SC, McGrath JM, Mensch H, Shaikh TH, Zackai EH, Emanuel BS (1999) A 22q11.2 deletion that excludes UFD1L and CDC45L in a patient with conotruncal and craniofacial defects. *Am J Hum Genet* 65:562-566
- Sanyal S, Tolar LA, Pallanck L, Krishnan KS (2001) Genetic interaction between shibire and comatose mutations in *Drosophila* suggest a role for snap-receptor complex assembly and disassembly for maintenance of synaptic vesicle cycling. *Neurosci Lett* 311:21-24
- Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, Wilson DI, Goodship JA, Cross IE, Burn J (1992) Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet* 339:1138-1139
- Scherer NJ, D'Antonio LL, Kalbfleisch JH (1999) Early speech and language development in children with velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet* 88:714-723
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57
- Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR (2003) Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays* 25:1061-1070
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, et al. (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316:445-449
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam

- TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528
- Shaffer LG, Lupski JR (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34:297-329
- Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS (2001) Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* 3:6-13
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS (2000) Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9:489-501
- Shaikh TH, O'Connor RJ, Pierpont ME, McGrath J, Hacker AM, Nimmakayalu M, Geiger E, Emanuel BS, Saitta SC (2007) Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res* 17:482-491
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Segraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE (2006) Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 38:1038-1042
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE (2005) Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 77:78-88
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, et al. (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 40:322-328
- Shaw CJ, Lupski JR (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R57-64
- Shaw CJ, Lupski JR (2005) Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 116:1-7
- She X, Jiang Z, Clark RA, Liu G, Cheng Z, Tuzun E, Church DM, Sutton G, Halpern AL, Eichler EE (2004) Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. *Nature* 431:927-930
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A (2002) A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:1296-1302
- Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, Chen SX, Collier DA, Craddock NJ, Kendler KS, Li T, O'Donovan M, O'Neill FA, Owen MJ, Walsh D, Weinberger DR, Sun C, Flint J, Darvasi A (2008) Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS Genet* 4:e28
- Shih RA, Belmonte PL, Zandi PP (2004) A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders. *Int Rev Psychiatry* 16:260-283
- Shprintzen RJ (1994) Velocardiofacial syndrome and DiGeorge sequence. *J Med Genet* 31:423-424

Referències

- Shprintzen RJ (2008) Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev* 14: 3-10
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV, Young D (1978) A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J* 15:56-62
- Shprintzen RJ, Higgins AM, Antshel K, Fremont W, Roizen N, Kates W (2005) Velo-cardio-facial syndrome. *Curr Opin Pediatr* 17: 725-730
- Singh SM, McDonald P, Murphy B, O'Reilly R (2004) Incidental neurodevelopmental episodes in the etiology of schizophrenia: an expanded model involving epigenetics and development. *Clin Genet* 65: 435-440
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blacato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841
- Sivertsen A, Lie RT, Wilcox AJ, Abyholm F, Vindenes H, Haukanes BI, Houge G (2007) Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. *Am J Med Genet A* 143: 129-134
- Slack A, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ (2006) On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2: e48
- Slegers K, Brouwers N, Gijssels I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, Del-Favero J, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2006) APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 129: 2977-2983
- Smith A, St Heaps L, Robson L (2002) Apparently unrelated cytogenetic abnormalities among 462 probands referred for the detection of del(22q) by FISH. *Am J Med Genet* 113: 346-350
- Smith AB, Peterson P, Wieland J, Moriarty T, DeLisi LE (1996) Chromosome 18 translocation (18;21) (p11.1;p11.1) associated with psychosis in one family. *Am J Med Genet* 67: 560-563
- Sobin C, Kiley-Brabeck K, Karayiorgou M (2005a) Associations between prepulse inhibition and executive visual attention in children with the 22q11 deletion syndrome. *Mol Psychiatry* 10: 553-562
- Sobin C, Kiley-Brabeck K, Karayiorgou M (2005b) Lower prepulse inhibition in children with the 22q11 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 162: 1090-1099
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407
- Solot CB, Knightly C, Handler SD, Gerdes M, McDonald-McGinn DM, Moss E, Wang P, Cohen M, Randall P, Larossa D, Driscoll DA (2000) Communication disorders in the 22Q11.2 microdeletion syndrome. *J Commun Disord* 33: 187-203; quiz 203-184
- Stachon AC, Baskin B, Smith AC, Shugar A, Cytrynbaum C, Fishman L, Mendoza-Londono R, Klatt R, Teebi A, Ray PN, Weksberg R (2007) Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A* 143A: 2924-2930

- Stalmans I, Lambrechts D, De Smet F, Jansen S, Wang J, Maity S, Kneer P, et al. (2003) VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat Med* 9:173-182
- Stankiewicz P, Beaudet AL (2007) Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 17:182-192
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18:74-82
- Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, et al. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455:232-236
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavare S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 315:848-853
- Straub RE, MacLean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F, Shinkwin R, Webb BT, Zhang J, Walsh D, et al. (1995) A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: evidence for genetic heterogeneity. *Nat Genet* 11:287-293
- Su Q, Mochida S, Tian JH, Mehta R, Sheng ZH (2001) SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14038-14043
- Suarez BK, Hampe CL (1994) Linkage and association. *Am J Hum Genet* 54:554-559; author reply 560-553
- Sullivan KE (2007) DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Adv Exp Med Biol* 601:37-49
- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60:1187-1192
- Sullivan PF, Lin D, Tzeng JY, van den Oord E, Perkins D, Stroup TS, Wagner M, Lee S, Wright FA, Zou F, Liu W, Downing AM, Lieberman J, Close SL (2008) Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Mol Psychiatry* 13:570-584
- Sutcliffe JS, Han MK, Amin T, Kesterson RA, Nurmi EL (2003) Partial duplication of the APBA2 gene in chromosome 15q13 corresponds to duplicon structures. *BMC Genomics* 4:15
- Swillen A, Devriendt K, Legius E, Prinzie P, Vogels A, Ghesquiere P, Fryns JP (1999) The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome (VCFS): from infancy to adolescence. *Genet Couns* 10:79-88
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, et al. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39:319-328
- Theveniau-Ruissy M, Dandonneau M, Mesbah K, Ghez O, Mattei MG, Miquerol L, Kelly RG (2008) The del22q11.2 candidate gene *Tbx1* controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. *Circ Res* 103:142-148
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, Danielli GA, Gualandi F, Muntoni F, Abbs S, Zanetti P, Angelini C, Ferlini A, Fanin M, Patarnello T (2002) Investigating the mechanism of chromosomal deletion: characterization of 39 deletion breakpoints in introns 47 and 48 of the human dystrophin gene. *Genomics* 80:523-530

Referències

- Tokuyasu TA, Cotter PD, Segraves R, Harris J, Elder ME, Gonzales M, Pinkel D, Albertson DG, Rauen KA (2007) Detection of single clone deletions using array CGH: identification of submicroscopic deletions in the 22q11.2 deletion syndrome as a model system. *Am J Med Genet A* 143A:925-932
- Torres-Juan L, Rosell J, Sanchez-de-la-Torre M, Fibla J, Heine-Suner D (2007) Analysis of meiotic recombination in 22q11.2, a region that frequently undergoes deletions and duplications. *BMC Med Genet* 8:14
- Torrey EF, Taylor EH, Bracha HS, Bowler AE, McNeil TF, Rawlings RR, Quinn PO, Bigelow LB, Rickler K, Sjostrom K, et al. (1994) Prenatal origin of schizophrenia in a subgroup of discordant monozygotic twins. *Schizophr Bull* 20:423-432
- Tosic M, Ott J, Barral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F, Matthey ML, Parnas J, Preisig M, Saraga M, Solida A, Timm S, Wang AG, Werge T, Cuenod M, Do KQ (2006) Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 79:586-592
- Tsuang MT, Winokur G, Crowe RR (1980) Morbidity risks of schizophrenia and affective disorders among first degree relatives of patients with schizophrenia, mania, depression and surgical conditions. *Br J Psychiatry* 137:497-504
- Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet* 40:90-95
- Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, Olson MV, Eichler EE (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37:727-732
- Usiskin SI, Nicolson R, Krasnewich DM, Yan W, Lenane M, Wudarsky M, Hamburger SD, Rapoport JL (1999) Velocardiofacial syndrome in childhood-onset schizophrenia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38:1536-1543
- Valles V, Van Os J, Guillamat R, Gutierrez B, Campillo M, Gento P, Fananas L (2000) Increased morbid risk for schizophrenia in families of in-patients with bipolar illness. *Schizophr Res* 42:83-90
- van Bon BW, Mefford HC, Menten B, Koolen DA, Sharp AJ, Nillesen WM, Innis JW, et al. (2009) Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: A clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet*
- van Rossum JM (1967) [The effect of psychostimulants on the central and autonomic nervous system]. *Schweiz Z Sportmed* 15:26-40
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
- Vorstman JA, Chow EW, Ophoff RA, van Engeland H, Beemer FA, Kahn RS, Sinke RJ, Bassett AS (2009) Association of the PIK4CA schizophrenia-susceptibility gene in adults with the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B:430-433
- Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS (2006) MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat* 27:814-821
- Wadey R, McKie J, Papapetrou C, Sutherland H, Lohman F, Osinga J, Frohn I, Hofstra R, Meijers C, Amati F, Conti E, Pizzuti A, Dallapiccola B, Novelli G, Scambler P (1999) Mutations of UFD1L are not responsible for the majority of cases of DiGeorge Syndrome/velocardiofacial syndrome without deletions within chromosome 22q11. *Am J Hum Genet* 65:247-249

- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, et al. (2008) Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320:539-543
- Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M (2007) PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 17:1665-1674
- Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC (2004) High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet* 75:267-281
- Wang S, Sun CE, Walczak CA, Ziegler JS, Kipps BR, Goldin LR, Diehl SR (1995) Evidence for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6pter-p22. *Nat Genet* 10:41-46
- Wardas J (2008) Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci* 13:4071-4096
- Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660-669
- Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE (2001) Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:825-844
- Weksberg R, Stachon AC, Squire JA, Moldovan L, Bayani J, Meyn S, Chow E, Bassett AS (2007) Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet* 120:837-845
- Weterings E, van Gent DC (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 3:1425-1435
- Williams HJ, Williams N, Spurlock G, Norton N, Zammit S, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC (2003) Detailed analysis of PRODH and PsPRODH reveals no association with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B:42-46
- Wilming LG, Snoeren CA, van Rijswijk A, Grosveld F, Meijers C (1997) The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum Mol Genet* 6:247-258
- Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J (1993) DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 30:852-856
- Wilson DI, Cross IE, Goodship JA, Brown J, Scambler PJ, Bain HH, Taylor JF, Walsh K, Bankier A, Burn J, et al. (1992) A prospective cytogenetic study of 36 cases of DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51:957-963
- Wilson GM, Flibotte S, Chopra V, Melnyk BL, Honer WG, Holt RA (2006) DNA copy-number analysis in bipolar disorder and schizophrenia reveals aberrations in genes involved in glutamate signaling. *Hum Mol Genet* 15:743-749
- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL (2007) A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80:91-104
- Wonodi I, Hong LE, Avila MT, Buchanan RW, Carpenter WT, Jr., Stine OC, Mitchell BD, Thaker GK (2005) Association between polymorphism of the SNAP29 gene promoter region and schizophrenia. *Schizophr Res* 78:339-341
- Woodward KJ, Cundall M, Sperle K, Sistermans EA, Ross M, Howell G, Gribble SM, Burford DC, Carter NP, Hobson DL, Garbern JY, Kamholz J, Heng H, Hodes ME, Malcolm S, Hobson GM (2005) Heterogeneous duplications in patients

Referències

- with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination. *Am J Hum Genet* 77:966-987
- Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, Gogos JA, Karayiorgou M (2008) Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 40:880-885
- Yamagishi H, Garg V, Matsuoka R, Thomas T, Srivastava D (1999) A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science* 283:1158-1161
- Yang C, Huang CH, Cheong ML, Hung KL, Lin LH, Yu YS, Chien CC, Huang HC, Chen CW, Huang CJ (2009) Unambiguous molecular detections with multiple genetic approach for the complicated chromosome 22q11 deletion syndrome. *BMC Med Genet* 10:16
- Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA (2006) BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 34:445-450
- Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, Chernos J, Bernier F, Sprysak K, Christiansen J, Haase S, Elyas B, Lilley M, Bamforth S, McDermid HE (2005) Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 76:865-876
- Yu S, Cox K, Friend K, Smith S, Buchheim R, Bain S, Liebelt J, Thompson E, Bratkovic D (2008) Familial 22q11.2 duplication: a three-generation family with a 3-Mb duplication and a familial 1.5-Mb duplication. *Clin Genet* 73:160-164
- Zammit S, Allebeck P, David AS, Dalman C, Hemmingsson T, Lundberg I, Lewis G (2004) A longitudinal study of premorbid IQ Score and risk of developing schizophrenia, bipolar disorder, severe depression, and other nonaffective psychoses. *Arch Gen Psychiatry* 61:354-360
- Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi-Reig L, Philpot BD, Miyakawa T, Bear MF, Tonegawa S (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 107:617-629
- Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M (2008) Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet* 53:215-219
- Zinkstok J, Schmitz N, van Amelsvoort T, Moeton M, Baas F, Linszen D (2008) Genetic variation in COMT and PRODH is associated with brain anatomy in patients with schizophrenia. *Genes Brain Behav* 7:61-69
- Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszys G, Daszkowska J, Maruszewski B, Burczynski P (2008) Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr* 167:1135-1140

Abreviatures

BAC: Cromosoma bacterià artificial (*Bacterial Artificial Chromosome*).

CGH: Hibridació genòmica comparada (*Comparative Genomic Hybridization*)

CNV: Variació en nombre de còpies (*Copy Number Variation*).

DS: Duplicacions segmentàries.

DSM: *Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders*

FISH: Hibridació in-situ fluorescent (*Fluorescent in situ hybridization*).

FoSTeS: *Fork Stalling and Template Switching*. Model de replicació.

GWAS: Estudi d'associació global del genoma (*Genome Wide Association Study*)

IVF: Insuficiència velofaríngia

LCR: Repetició de baix número de còpies (*Low copy Repeat*), és equivalent al terme duplicació segmentària

LCR22: Blocs de repeticions de baix número de còpies específics del cromosoma 22 humà.

Mb: Megabases. Milions de parells de bases (10^6)

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NAHR: Recombinació homòloga no al·lèlica (*NonAllelic Homologous Recombination*).

NHEJ: Recombinació no basada en seqüències homologues (*Non-Homologous End Joining*).

PGH: Projecte Genoma Humà.

PPI: Inhibició pre-pols (*Prepulse inhibition*).

RM: Retard mental

SDG/VCF: Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial

SNP: Polimorfisme de nucleòtid simple (*Single Nucleotide Polymorphism*).

TDAA: Trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat

Annex I

En aquest annex es presenta la publicació derivada de l'estudi III d'aquesta tesi. Rodríguez-Santiago et al., 2009.

ORIGINAL ARTICLE

Association of common copy number variants at the glutathione S-transferase genes and rare novel genomic changes with schizophrenia

B Rodríguez-Santiago¹, A Brunet^{2,3}, B Sobrino⁴, C Serra-Juhé¹, R Flores¹, LI Armengol², E Vilella⁵, E Gabau³, M Guitart³, R Guillamat³, L Martorell⁵, J Valero⁵, A Gutiérrez-Zotes⁵, A Labad⁵, A Carracedo⁴, X Estivill² and LA Pérez-Jurado^{1,6}

¹Unitat de Genètica, Universitat Pompeu Fabra, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain; ²Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain; ³Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Spain; ⁴Grupo de Medicina Xenómica, CEGEN-IML, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; ⁵Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain and ⁶Programa de Medicina Molecular i Genètica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Copy number variants (CNVs) are a substantial source of human genetic diversity, influencing the variable susceptibility to multifactorial disorders. Schizophrenia is a complex illness thought to be caused by a number of genetic and environmental effects, few of which have been clearly defined. Recent reports have found several low prevalent CNVs associated with the disease. We have used a multiplex ligation-dependent probe amplification-based (MLPA) method to target 140 previously reported and putatively relevant gene-containing CNV regions in 654 schizophrenic patients and 604 controls for association studies. Most genotyped CNVs (95%) showed very low (<1%) population frequency. It is interesting to note that a few novel rare variants were only present in patients suggesting a possible pathogenic involvement, including 1.39 Mb overlapping duplications at 22q11.23 found in two unrelated patients, and duplications of the somatostatin receptor 5 gene (*SSTR5*) at 16p13.3 in three unrelated patients. Furthermore, among the few relatively common CNVs observed in patients and controls, the combined analysis of gene copy number genotypes at two glutathione S-transferase (*GST*) genes, *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1) (1p13.3) and *GSTT2* (glutathione S-transferase theta 2) (22q11.23), showed a statistically significant association of non-null genotypes at both loci with an additive effect for increased vulnerability to schizophrenia (odds ratio of 1.92; $P=0.0008$). Our data provide complementary evidences for low prevalent, but highly penetrant chromosomal variants associated with schizophrenia, as well as for common CNVs that may act as susceptibility factors by disturbing glutathione metabolism.

Molecular Psychiatry advance online publication, 9 June 2009; doi:10.1038/mp.2009.53

Keywords: structural variation; copy number variant; 22q11.23 duplication; genetic predisposition to disease; glutathione transferase/genetics

Introduction

Recent studies have highlighted structural variants as a largely under-explored source of human genetic variation¹ that may be a common underlying factor in human disease.^{2,3} Such variation includes insertions, deletions, inversions, duplications and translocations of DNA sequences, and encompasses copy number

differences also known as copy number variants (CNVs).^{1,4} CNVs are likely to contribute significantly to human diversity and disease susceptibility, a postulate further substantiated by the enriched CNV affecting genes involved in drug and hormone metabolism, immune response, as well as in the detoxification of environmental and dietary pro-carcinogens.^{5,6} Reported examples include low copy numbers of the *CCL3L1*, *FCGR3B* and *DEFB4* genes, which are associated with increased susceptibility to AIDS, immunologically mediated glomerulonephritis and Crohn's disease, respectively.^{7–9} In addition, evidence is accumulating that multiple rare CNVs contribute to the genetic component of vulnerability

Correspondence: Professor LA Pérez-Jurado, Unitat de Genètica, Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Dr Aiguader 88, E-08003, Barcelona, Spain.
E-mail: luis.perez@upf.edu
Received 19 December 2008; revised 24 April 2009; accepted 4 May 2009

to neuropsychiatric conditions, such as autism or schizophrenia.¹⁰ Some karyotypic and submicroscopic CNV abnormalities associated with schizophrenia have been described, such as the 3 Mb hemizygous microdeletion at 22q11 causing velo-cardio-facial syndrome (VCFS).^{11–13} Other chromosomal aberrations have been detected in affected individuals with schizophrenia and other psychiatric disorders,¹⁴ leading to the discovery of potential disease-causing mutations in *DISC1*, *PDE4B*¹⁵ and *NPAS3*.¹⁶

The increasing use of genome-scan array technologies has revealed several new CNVs at different loci in schizophrenic patients. In an initial report, four aberrant regions containing genes involved in neuronal function were observed in 12 schizophrenic patients,¹⁷ although these results were not reproduced later by using an independent method.¹⁸ Variation of multiple loci were reported in the study of a small sample of 30 patients without enough control data.¹⁹ The lack of reproducibility emphasizes the importance of reliable methods for CNVs validation before full-scale association studies are carried out.¹⁸ Despite this controversy, there is a rapidly growing number of well-defined CNVs associated with schizophrenia with low prevalence, but high penetrance. Hemizygous deletions of varying sizes affecting the *CNTNAP2* gene at 7q34–36.1 were found in three unrelated individuals with a complex phenotype of schizophrenia, epilepsy and cognitive impairment.²⁰ Overall, thirteen aberrations with two of them likely pathogenic, a 2p16.3 deletion disrupting the *NRXN1* gene in affected siblings and a *de novo* 15q13.1 duplication spanning the *APBA2* gene, were found among 93 schizophrenic patients.²¹ Furthermore, three recent studies have established that rare *de novo* germline mutations contribute to schizophrenia vulnerability in sporadic cases and that rare genomic lesions at many different loci can account, at least in part, for the genetic heterogeneity of this disease, including recurrent deletions at 1q21.1, 15q13.3 and 15q11.2.^{22–24} It is interesting to note that genes involved in pathways important for brain development are over-represented among those disrupted by structural variants in patients, suggesting that rare mutations affecting those genes contribute to schizophrenia.²⁵ Therefore, the role of structural genomic variation in the development of schizophrenia, either directly causing the disease or acting as susceptibility factor, is a topic of considerable interest.

To further understand the contribution of this type of genomic variation to human diversity and complex diseases, we have designed a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) based method to target previously reported and putatively relevant gene-containing CNV regions in a high-throughput manner. The approach allowed to carry out large-scale association studies with 140 selected CNVs in 654 schizophrenic patients and 604 controls. Overall, eight variants were detected only in patients, two of them in more than one case (>1 Mb duplications at

22q11.23 and duplications of the somatostatin receptor 5 gene (*SSTR5*) at 16p13.3), which were further characterized by array technology. Among the few CNVs with relatively high population prevalence, variation at the *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1) and *GSTT2* (glutathione S-transferase theta 2), encoding two members of a superfamily of proteins that catalyse the conjugation of reduced glutathione (GSH) to a variety of electrophilic and hydrophobic compounds, were found associated to the disease. Genotypes containing *GSTM1* and the *GSTT2*-specific copy were found significantly associated with an increased vulnerability to schizophrenia with additive effect. Our results indicate that rare but highly penetrant CNVs can be responsible for a reduced number of schizophrenia cases, whereas common CNVs, such as those affecting the glutathione S-transferase (GST) genes, may influence a risk of developing the disease.

Materials and methods

Subjects

Unrelated patients ($n=654$; 451 male patients and 204 female patients, mean age = 46.52 ± 17.08 years) were recruited from in-patient and out-patient services in two different psychiatric hospitals (*Consortori Hospitalari Parc Taulí*, Sabadell, Spain and *Institut Universitari de Psiquiatria Pere Mata*, Reus, Spain). All patients had a consensus diagnosis from two senior psychiatrists according to several semi-structured interviews for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) criteria. Concordant values between psychiatrists varied between 0.6 and 0.95. Unrelated subjects ($n=604$; 339 male individuals and 265 female individuals, mean age = 41.42 ± 12.83 years) from the same geographical region (Catalonia, Spain) and free of signs of neuropsychiatric illness were used as controls. Additional details of the selection and recruitment of patients and controls have already been reported.²⁶ Family relatives of several probands with CNVs were also recruited for this study. Isolation of DNA was carried out from peripheral blood following standard procedures. All samples were obtained under institutional review board-approved informed consent.

Selection of gene containing CNVs

The database of genomic variants (DGVs, <http://projects.tcag.ca/variation>)²⁷ was used to select gene-containing CNV regions reported in more than one individual or by more than one method, including those with functional candidate genes for schizophrenia. A subset of variants was selected from our data generated by bacterial artificial chromosome (BAC)-array comparative genomic hybridization (aCGH) experiments.²⁸ Given the putative limitation of the MLPA method to quantify variation at complex or multiple copy loci, we only targeted genes located in theoretical single-copy loci in the reference genome, avoiding those overlapping with segmental



Figure 1 Rare duplication-type copy number variants (CNVs) found in patients with schizophrenia. Each panel represents the regions harbouring the rare or unique duplications found in patients, showing from top to bottom: scale in Mb, cytogenetic band, reference sequenced genes (in pink), regional segmental duplication (SD), possible CNVs reported in the database of genomic variants (DGVs) (orange bars), position of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) probes, microsatellite markers (when appropriate) and single-nucleotide polymorphism (SNP) or oligo probes in the used array, and extent of the duplicated fragment in the patient (red bar).

duplications (SDs). For the sequence-related *GST* genes, we designed copy-specific probes with mismatches in the ligation nucleotides. Supplementary Table S1 shows a complete list of the selected genes.

Multiplex-ligation PCR amplification

We successfully combined 140 probes in four MLPA panels in a dual-colour strategy previously described²⁹ (Supplementary Figure S1). Oligonucleotides were designed following MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) recommendations (http://www.mlpa.com/files/protocol_synthetic_probe_design.pdf) and are listed in Supplementary Table S1. Additional probes designed to assess gene copy number changes at the 22q11.22-23 region in further detail are shown in Supplementary Table S2 and located in Figure 1. For targets that presented highly similar sequences with other loci or pseudogenes (such as *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTT2*), we designed a copy-specific MLPA probe by selecting a nucleotide at the probe ligation site that was only present in the desired gene

copy. *GSTT2* is a single copy gene in the Celera human genome assembly, whereas there is a second copy per chromosome in the reference National Center for Biotechnology Information (NCBI) human genome sequence (*GSTT2B*). Mismatch nucleotides were detected by sequence alignment between the different homologous sequences. A mismatch at the ligation site is usually enough to avoid ligation and therefore, PCR amplification from other loci.³⁰

The MLPA reactions were carried out essentially as described previously,³⁰ with slight modifications to allow for double colour detection.²⁹ We used the relative peak height (RPH) method recommended by MRC-Holland, as previously described, for data analysis.^{31,32} Theoretically, heterozygous deletions and duplications showed a relative peak height of approximately 0.5 and 1.5, respectively. Owing to the high frequency of deletions at the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTT2* targeted loci, copy number detection at these positions was normalized independently. Individuals with peaks corresponding to two copies were visually

Table 1 Frequencies of the multiallelic CNVs observed in 654 schizophrenic patients and 604 controls

Copy number	0 N (%)		1 N (%)		2 N (%)		3 N (%)		4 N (%)	
	Controls	Patients	Controls	Patients	Controls	Patients	Controls	Patients	Controls	Patients
<i>PPYR1</i>			29 (5.1)	20 (3.3)	453 (79.9)	496 (82.7)	80 (14.1)	78 (13.0)	5 (0.9)	6 (1.0)
<i>DDT</i>			0	1 (0.2)	563 (99.3)	588 (98.0)	4 (0.7)	11 (1.8)		
<i>CYFIP1</i>			7 (1.1)	7 (1.1)	597 (98.0)	613 (98.2)	5 (0.8)	4 (0.6)		
<i>CYP2E1</i>			3 (0.5)	1 (0.2)	577 (94.7)	596 (95.5)	28 (4.6)	27 (4.3)	1 (0.2)	0
<i>PCDHA9</i>	4 (0.7)	3 (0.5)	86 (14.8)	73 (12.7)	492 (84.4)	500 (86.7)	1 (0.2)	1 (0.2)		
<i>GSTM1</i>	289 (49.4)	243 (40.9)	247 (42.2)	291 (49.0)	49 (8.4)	59 (9.9)	0	1 (0.2)		
<i>GSTT1</i>	105 (17.7)	142 (22.0)	290 (48.9)	309 (47.9)	195 (32.9)	190 (29.5)	3 (0.5)	4 (0.6)		
<i>GSTT2</i>	478 (80.6)	482 (74.7)	108 (18.2)	152 (23.6)	7 (1.2)	11 (1.7)				

Abbreviations: CI, confidence interval; CNVs, copy number variants; OR, odds ratio.

Frequencies of *GSTT1* and *GSTT2* are shown excluding the two patients with large 22q11.23 duplications. Frequency of non-null copy number genotypes (1, 2 or 3 copies) for *GSTM1* and *GSTT2* was significantly increased in patients.

χ^2 test values: *GSTM1*: (P -value = 0.004, OR = 1.41, CI = 1.12–1.77), *GSTT2*: (P -value = 0.01, OR = 1.40, 95% CI = (1.07–1.84).

After Bonferroni's correction for multiple testing, *GSTM1* association remained significant (<0.006), whereas *GSTT2* association was not (>0.006). *GSTT1* was not statistically different when comparing controls and patients with schizophrenia (P = 0.064).

identified and consequently used as reference for the remaining samples.

To validate the assay reproducibility and genotype assignment MLPA reactions from 150 random samples were obtained in duplicate and independently analysed in a blind fashion by two investigators (BR-S and AB). There was full concordance in genotype assignment both between experiments and between investigators.

Microsatellite analysis

A total of five microsatellite markers distributed along 22q11.22–23 (*D22S0232i*, *D22S0055i*, *D22S0163i*, *D22S0184i*, and *D22S0153i*) were genotyped by PCR and subsequent electrophoretic analysis (GeneScan; Applied Biosystems, Foster, CA, USA) in first-degree relatives of the schizophrenic patients carrying the genomic duplication found by MLPA (see Supplementary Table S3 for primer sequences, PCR conditions and detection methods and Figure 1 for location).

Microarray analysis

To confirm and better characterize the different variants detected by MLPA we used two commercial arrays, either an oligoarray for CGH (Agilent 44 K or 244 K, Santa Clara, CA, USA) or a single-nucleotide polymorphism (SNP)-array for comparative intensity analysis (Illumina 370Duo, San Diego, CA, USA). We performed the experiments and the subsequent analyses of aCGH as previously described in detail.³³ For the SNP-array, 2 μ g of genomic DNA were hybridized onto the HumanCNV370-DNA Analysis BeadChip (Illumina, Inc) using the Infinium assay following the manufacturer's recommendations. We then applied the PennCNV tool³⁴ for fine-mapping of CNVs from high-density SNP genotyping data.

Statistical analysis

Fisher's exact test for count data, Pearson's χ^2 test and Bonferroni's adjustment for multiple comparisons were applied when appropriate for measuring significant differences in gene copy number frequencies between patients and controls.

Results

Genomic DNA CNV

Change in copy number by MLPA was only detected by 28 of the 140 (20%) probes targeting candidate genes and loci. Thus, 112 probes (80%) did not detect variation in the studied individuals. Considering both types of variation (gains or losses) in the entire sample, only 7 loci (*PPYR1*, *DDT*, *CYFIP1*, *CYP2E1*, *PCDHA9*, *GSTM1* and *CXCL12*) showed copy number changes with frequency above 1%. CNV at 15 loci (11%) was observed in both patients and controls, whereas six rare variants were identified only in subjects from the control group and eight rare variants were found only in the patient group (Table 1 and Supplementary Table S4).

Rare variants found in patients

The eight rare variants found exclusively in patients consisted all in gains involving the *CABIN1*, *SNAP29*, *NDNL2*, *WVOX*, *ZNHIT3*, *PRKRIP1*, *MYOM2* and *SSTR5* genes. They all were considered as potential candidate rearrangements to play a role in the disease and were subsequently validated and characterized by using array technologies, except in two cases with no additional DNA available. The main findings are summarized in Table 2.

Two of the rearrangements were found in more than one schizophrenic patient. In two unrelated cases (patients 1 and 2), the duplication affected two closely located probes on chromosomal band

Table 2 Characterization and validation by array technologies of rare CNVs found in patients with schizophrenia

Patient	MLPA probe	CVN type	Chromosome	Inheritance	Validation	Start variant	End variant	Size	Flanking SDs	Affected genes ^a
P1	CABIN1	Gain	22q11.23	De novo ^b	Illumina-370 K	21 338 007	23 327 473	1.9 Mb	Yes	31 genes
P2		Gain		NA	Illumina-370 K	21 995 356	23 327 473	1.3 Mb	Yes	27 genes
P1	SNAP29	Gain	22q11.21	Mother	Illumina-370 K	19 424 781	19 792 353	367.5 kb	Yes	8 genes
P3	NDNL2	Gain	15q13.1	De novo	Illumina-370 K	27 261 995	27 730 663	468.6 kb	No	NDNL2, KIAA0527
P4	WWOX	Gain	16q23.1	NA	Agilent-244 K	76 755 512	77 263 464	507.9 kb	No	WWOX
P5	ZNHIT3	Gain	17q12	Father	Agilent-244 K	31 889 297	31 948 060	58.7 kb	Yes	ZNHIT3, MYOHD1
P6	PRKRIP1	Gain	7q22.1	NA	MLPA				Yes	PRKRIP1
P7	MYOM2	Gain	8p23.3	NA	MLPA				Yes	MYOM2
P8	SSTR5	Gain	16p13.3	NA	Illumina-370 K	1 066 680	1 071 696	5.0 kb	No	SSTR5
P9, P10					MLPA					

Abbreviations: CNVs, copy number variants; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; NA, not analysed; SDs, segmental duplications.

^aSupplementary Table S5 contains the list of genes involved in duplications found in patients.

^bInheritance was assessed by MLPA (Supplementary Figures S2 and S3). Microsatellite analysis showed an intrachromosomal rearrangement produced in the chromosome inherited from the father (Supplementary Figure S4).

22q11.23, targeting the *DDT* and *CABIN1* genes. A specific MLPA assay spanning more genes in the region showed a common duplicated interval (Figure 1, Supplementary Figures S2 and S3) containing 27 genes (Supplementary Table S5). The study of parents and sibling of patient 1 by MLPA and microsatellite markers showed that the duplication was a *de novo* event that had occurred in the paternally inherited chromosome (Supplementary Figure S2). The inferred haplotypes using the sibling's sample to define the phase showed that the rearrangement was produced by intrachromosomal recombination (Supplementary Figure S4). Additional validation was obtained with the Illumina SNP-array that confirmed duplications of at least 1.87 Mb in patient 1 and 1.33 Mb in patient 2, with identical telomeric breakpoints and different centromeric breakpoints, all likely located in flanking segmental duplication clusters (DCs) (Figure 1). A finer calculation of the size of the duplications was predicted based on the homology between the common distal DC1868 and two proximal DCs (DC1837 for patient1 and DC1846 for patient2) that likely mediated the rearrangement by non-allelic homologous recombination (NAHR) allowing to infer a 1.39-Mb overlapping interval in both patients (Supplementary Table S6). Duplications of this large region have never been reported as polymorphisms in the DGV. It is interesting to note that patient 1 showed an additional gain type CNV at 22q11.21, 1.5-Mb distal to the *de novo* duplication at 22q11.23, showed by the *SNAP29* MLPA probe and validated by SNP-array as a 367.5-kb segment containing eight genes (Table 2 and Supplementary Table S5). This variant was also found in his epileptic mother as well as in the patient's brother who also carries a diagnosis of schizophrenia, but was not part of the initial study because related individuals were excluded.

The second recurrent rearrangement found in three patients was a 5-kb duplication at 16p13.3 containing the entire *SSTR5* gene that was validated by SNP-array in patient 8. At this locus, only deletion-type CNVs have been reported in DGV and we also found a control individual with deletion, but none with duplication. Parental samples were not available to determine whether the *SSTR5* rearrangements were *de novo* or inherited in the three cases.

A gain of the *NDNL2* MLPA probe at 15q13.1 in patient 3 was not found in the parental samples. The *de novo* duplication was defined by the SNP-array as 594 kb in size containing the *NDNL2* gene and a portion (the first three exons) of the overlapping *KIAA0527* gene (Table 2 and Figure 1). The *WWOX* MLPA probe variation in patient 4 was also validated by SNP-array that showed a 508-kb duplicated segment including four exons in the middle part of the *WWOX* gene. The observed gain of *ZNHIT3* probe in patient 5 was inherited from his unaffected father. The size of the duplication on the 244 K Agilent oligo-aCGH was 59 kb, containing entirely the *ZNHIT3* gene and disrupting the *MYO19* gene. It is interesting to

Table 3 Overview of clinical characteristics of the patients with schizophrenia studied for candidate CNVs

Patient	Gender age of onset	Diagnosis (DSM-IV)	Family history	Intellectual capacity	Other features
P1	M 17	Undifferentiated SCZ	Brother with SCZ (onset at:32), mother with epilepsy ^a	Learning disability	Unspecified neurological deficiency, unsociable
P2	F 34	Residual SCZ	Mother with anxiety disorder and late onset deafness	Normal intelligence	Late onset bilateral hearing loss
P3	M 16	Paranoid SCZ	Negative for psychiatric conditions	Normal intelligence	Unspecified neurological deficiency, shyness
P4	F 18	Residual SCZ	Brother committed suicide	Learning disability Analphabet	Hypertension, morbid obesity, megaloblastic anemia
P5	M 17	SCZA	Several affected relatives ^a	Normal intelligence	Unspecified neurological deficiency
P6	M 27	Residual SCZ	Father committed suicide	Normal intelligence	Hypertension COPD and cardiopathy
P7	M 17	Disorganised SCZ	Adopted, biological parents with mental disorders by report	Normal intelligence	Drug abuse (amphetamines) Aggressive.
P8	F 16	Residual SCZ	Father with paranoid personality disorder	Normal intelligence	Unspecified neurological deficiency, alcohol abuse, introvert
P9	F 32	Residual SCZ	Mother with SCZA, brother 1 with SCZ, brother 2 with UPD	Normal intelligence	Not available
P10	F 32	Residual SCZ	Brother under psychiatric treatment	Normal intelligence	COPD, obesity, severe aortic stenosis

Abbreviations: CNVs, copy number variants; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DSM-IV, diagnostic and statistical manual of mental disorders; SCZ, schizophrenia; SCZA, schizoaffective disorder; UPD, unspecified personality disorder.

^aSee Supplementary Figure S5 for pedigree with more details.

Table 4 Combined frequencies of *GSTM1* and *GSTT2* null (0) and non-null (≥ 1) copy number genotypes in controls and patients with schizophrenia

Copy number	Controls N (%)	Patients N (%)
≥ 1 copy of both <i>GSTM1</i> and <i>GSTT2</i>	46 (8.6%)	89 (15.3%)
0 copies <i>GSTM1</i> or <i>GSTT2</i>	489 (91.4%)	493 (84.7%)

The number of individuals with at least 1 copy of both genes was significantly increased in schizophrenia patients when comparing with controls (χ^2 test, $P=0.0008$, OR = 1.92, 95% CI = 1.32–2.78).

note that there are some paternal relatives affected by diverse psychiatric disorders (Supplementary Figure S5). As mentioned, the rearrangements in patients 6 and 7 containing the *PRKRIP1* and *MYOM2* genes, respectively, could not be further characterized due to the lack of enough DNA for array-based experiments.

The analysis of the genomic context surrounding these rare CNVs found in schizophrenic patients showed the presence of SD at one or both breakpoints in six of the ten duplications found, suggesting that NHAR is the most common mutational mechanism.

Table 3 contains the most relevant clinical features of the patients who presented rare genomic aberrations and Supplementary Figure S5 shows the

pedigree and additional information from relatives of patients 1 and 5.

Association of common CNVs and schizophrenia

Among the relatively common CNVs analysed in the initial survey, significant differences in frequencies between patients and controls were observed only for *GSTM1*. The frequency of non-null genotypes (1, 2 or 3 gene copies) was significantly increased in patients with respect to controls (P -value = 0.004, OR = 1.41, CI = 1.12–1.77) (Table 1).

Given the complex structure of the 22q11.22-23 region surrounding *CABIN1* and *DDT* with multiple SD and harbouring evolutionarily duplicated GST

genes, we applied the specific MLPA assay that included *GSTT1* and *GSTT2*-specific probes to the entire sample to assess for more subtle rearrangements in the region and/or disease association with common variants. Remarkably, *GSTT2* non-null genotypes (*GSTT2**1/0 and *GSTT2**1/1) were also associated with an increased risk of developing schizophrenia with an odds ratio of 1.405 (CI=1.07–1.84; $P=0.01$). However, no significant association of *GSTT1* copy number with schizophrenia was found in our sample (Table 1). The combined analysis of GST-genes detected an additive effect of *GSTM1* and *GSTT2* non-null genotypes in the susceptibility to schizophrenia with an odds ratio of 1.92 (CI=1.32–2.78; $P=0.0008$) (Table 4). After Bonferroni's correction for multiple testing, the disease association of *GSTM1* and the additive effect of *GSTM1* and *GSTT2* remained significant ($P<0.006$).

Supplementary Figure S6 shows the boxplots of *GSTM1* and *GSTT2* relative peak height ratios obtained by MLPA versus the copy number genotype assigned together with an example of the corresponding electropherogram peak pattern observed.

Discussion

We describe here the application of a rapid and economic MLPA-based method to study a set of 140 gene sequences located in previously described CNVs in a large sample of individuals comprising control subjects and schizophrenic patients. An important proportion (80%) of the loci studied showed no variation in any of the individuals ($n=1259$). This low detection yield of copy number changes by MLPA in loci previously described as polymorphic CNVs may be because of one or several of the following reasons: (i) the different methods for CNV analysis may have different false positive and/or false negative rates; (ii) the designed MLPA probes targeting a small single-copy gene sequences of 50–80 bp might lie outside the actual variable region; (iii) the frequency of those variations may indeed be very low, under 1 in 1000 individuals in specific populations. In any case, our data confirm the previous belief that the size and frequency of the CNVs represented in the public databases are likely overestimated, with entries not fully validated and based on experimental data that do not allow their correct definition. In fact, the concordant rate for CNV calling of two different platforms (BAC vs. SNP arrays) was less than half (43%) when studying the same individuals.³⁵ Given the low population frequency observed for most putatively relevant CNVs, genotyping strategies with PCR-based methods such as MLPA will be needed for large-scale association studies in different populations. Despite its great utility and the ongoing efforts to improve its accuracy, the DGV should not yet be used to define population frequencies of specific CNVs in the substitution of experimental control population, as we have shown in this study.

Several chromosomal aberrations have been identified by cytogenetic and molecular techniques as a possible cause of schizophrenia, including large rearrangements, inversions and balanced translocations.^{22–25,36} The recurrent microdeletion at 22q11.21, causing the DiGeorge and velo-cardio-facial syndromes, is associated with schizophrenia in 30–40% of cases.^{22–25,36} More recently, the emergent use of whole genome-scan platforms has facilitated the detection of smaller genomic structural mutations associated with schizophrenia, in general rare variants at very low frequencies.^{22–25,36} A few of those variants are also recurrent, such as the deletions at 15q11.2 including the *CYFIP1* gene (0.5 Mb, 0.55% of patients vs. 0.19% of controls),²⁴ and the deletions at 15q13.3 (2.2 Mb, 0.17% of patients vs. 0.1% of controls) and 1q21.1 (1.3 Mb, 0.23% of patients vs. 0.02% of controls), and can be associated with other phenotypes with incomplete penetrance, including mental retardation, congenital malformations and epilepsy.^{23,24} Architectural features of the genomic regions with complex SD that predispose to misalignment and non-allelic homologous recombination may explain the recurrent nature of these rearrangements. We only targeted two of those four regions in our MLPA panel, with the *GNB1L* (22q11) and *CYFIP1* (15q11.2) probes. We did not detect any rearrangement in the 22q11.21 DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome critical region in patients or controls, most likely because patients with this diagnostic suspicion had been previously studied on clinical grounds and excluded from this study. We did detect 15q11.2 deletions although the frequency was not significantly different between groups, in contrast with the previous report.²⁴ Duplications at 15q11.2 were also observed with identical frequencies in both controls and patients.

We have also found a few novel and rare CNVs exclusively present in patients, two of them in more than one unrelated individual, which were considered as potentially pathogenic. The duplications at 22q11.23 found in two unrelated patients overlapped a 1.39-Mb interval in a region of significant linkage to schizophrenia and had occurred *de novo* at least in the case with available parents for study. Of the 27 genes included in the common duplication that, if dosage sensitive, may contribute to the disease phenotype, two of them are good functional candidates: *CABIN1* and *ADORA2A*. Calcineurin binding protein 1 (*CABIN1*) binds specifically to the activated form of calcineurin to inhibit calcineurin-mediated signal transduction in multiple tissues including brain, and also interacts with amphiphysin (*AMPH*), a protein associated with the cytoplasmic surface of synaptic vesicles.³⁷ The adenosine A2A receptor (*ADORA2A*) is one of several receptor subtypes for adenosine and a major target of caffeine, abundant in basal ganglia, vasculature and platelets. A mouse model overexpressing *ADORA2A* showed an up-regulation in the prefrontal cortex, suggesting a contribution to memory dysfunction in depression.³⁸

When co-expressed in the same neuron, adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor form A2A/D3 heteromeric receptor complexes, in which A2A receptors antagonistically modulate both the affinity and the signalling of the D3 receptors.^{39–41} As the D3 receptor is one of the therapeutic targets in schizophrenia, the A2A/D3 receptor interactions have been proposed as an alternative antipsychotic target.^{41,42}

Interestingly, a second 367-kb duplication spanning eight genes on chromosome 22 was also found in patient 1, centromeric to the *de novo* duplication. This CNV was inherited from his epileptic mother and was also present in his schizophrenic brother. Two genes within the interval are good functional candidates: *SNAP29* codes for a protein of the SNARE family that plays a role in synaptic vesicle function, whereas *PI4KCA* regulates the biosynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, also implicated in synaptic vesicle function as well as in signal transduction. Given the replicated association of the 22q11 region with schizophrenia, both *SNAP29* and *PI4KCA* polymorphisms have been analysed in targeted studies showing stronger evidence for *PI4KCA* as a susceptibility gene for the disorder.^{43,44}

The other recurrent CNV found was a gain of the *SSTR5* MLPA probe that was further characterized in patient 8 as a small duplication containing the entire *SSTR5* gene coding for the somatostatin receptor 5. This receptor binds somatostatin to inhibit the release of several hormones and secretory proteins throughout the body, including the nervous system. Remarkably, *SSTR5* interacts physically through hetero-oligomerization with other G-protein-coupled receptors, specifically the dopamine D2 receptor (*DRD2*) located on postsynaptic dopaminergic neurons and involved in reward-mediating mesocortico-limbic pathways.⁴⁵ Polymorphisms at the *SSTR5* gene have been associated with bipolar affective disorder,⁴⁶ whereas polymorphisms at the *DRD2* gene have been found significantly associated with schizophrenia following meta-analysis of several case-control studies.⁴⁷ In addition, variation in the *DRD2* gene could partially explain variation in the timing of clinical response to antipsychotics in the first episode of schizophrenia.⁴⁸ Therefore, it is tempting to speculate that the gain of *SSTR5* copy number may increase the susceptibility to schizophrenia by altering the stoichiometric composition of the different subunits and therefore, the function of these hetero-oligomeric G-protein-coupled receptor complexes.

The *de novo* ~600-kb duplication found in patient 3 at 15q13.1 containing the *NDNL2* and *KIAA0574* genes overlaps with a larger 1.4-Mb duplication spanning the same and two additional genes, *APBA2* and *TJP1*, also reported in a patient with schizophrenia.²¹ *NDNL2* encodes a necdin-like protein of ubiquitous expression, whereas *KIAA0574* encodes a putative transmembrane protein of unknown function. This interval is also included in the 3.95-Mb deletion found in a mentally retarded patient.⁴⁹

Partial rearrangements of the region have also been reported, including duplication of the *APBA2* gene in an autistic patient,⁵⁰ duplication of the *TJP1* gene in one control subject and deletion of the *TJP1* gene in a schizophrenia case.²³ This region is flanked by SD, known as breakpoints BP3A and BP4, whose presence probably explains the regional instability, including inversions in the control population.

The possible link between the remaining unique CNVs and schizophrenia is less clear. The 16q23.1 gain in patient 4 only affects and may disrupt the middle portion of the WW domain containing oxidoreductase (*WWOX*) gene, coding for a protein that belongs to a family of conserved proteins found in all eukaryotes that play diverse regulatory roles in a wide variety of cellular functions, such as protein degradation, transcription and RNA splicing. The duplication at 17q12 containing the zinc-finger, HIT type 3 (*ZNHIT3*), and disrupting the myosin XIX (*MYO19*) genes in patient 5 was inherited from the unaffected father. Apparently, there is a family history of psychosis in two relatives in the paternal family, but we did not have access to samples to establish whether the CNV was also present in the affected relatives. The extent of the rearrangement in patients 6 and 7 could not be determined. However, the gain in 7q22.1 containing the PRKR interacting protein 1 gene (*PRKRIP1*), a protein involved in cytokine-mediated biological processes,⁵¹ could also include other genes such as *ORAI2*, a calcium release-activated calcium modulator which may influence signal transduction, in case the rearrangement was mediated by the highly homologous flanking SD. The duplicated probe in patient 7 involves the myomesin 2 gene (*MYOM2*), coding for an integral protein the major structure of sarcomeres, with no apparent link to the disease.

The CNVs associated with schizophrenia described here and those previously reported, might have relatively high penetrance but are individually rare, contributing each to the aetiology of just a few patients or even a single case. In agreement with this postulate, there is a strong familial component of schizophrenia and related disorders in several of the cases with rare CNVs (Table 3). However, in a multifactorial disorder, more common variants of susceptibility with lower relative risk are expected. Among the few relatively common variants genotyped, significant association of CNV with the disorder was detected at two genes coding for GSTs, *GSTM1* and *GSTT2*, but not *GSTT1*. Individuals carrying at least one copy of the *GSTM1* or the *GSTT2*-specific gene copies (*GSTT2B* was not genotyped), showed an increased risk of developing schizophrenia (OR ~1.4 in both cases), with additive effects for having gene copy of both (OR=1.92; *P*=0.0008). Genetic polymorphisms and copy number at several GST genes have been analysed in case-control studies in different populations with contradictory results. The analysis of the genetic polymorphisms in *GSTT2* (Met139Ile variant) did

not reveal association,⁵² whereas association of the null *GSTM1* genotype with an increased risk for the disease was reported in Japanese⁵³ and Korean populations,⁵⁴ which represent the opposite effect to that observed in our study. A second study in Japanese population showed no difference between controls and patients when the *GSTM1* deletion was analysed.⁵² Our results for *GSTT1* variants are in agreement with the two studies carried out in Japanese population revealing similar frequencies of *GSTT1* null genotype in the patients and control groups,^{52,55} but in contrast to others describing association of null genotype with a significantly reduced risk of developing schizophrenia.⁵⁶ Although the discrepancies observed could be because of population differences, the strength of our results is based on a much larger dataset compared with previous reports.^{52–56}

The presence of more GST gene copies or specific GST gene variants in patients could account for an increased enzyme activity, leading to an imbalance between levels of reduced and oxidised form of GSH (GSSG). Dysfunction of GSH metabolism has been suggested to be a risk factor for the disease.⁵⁷ GSH and its oxidized dimer constitute the most important defence against oxidative stress and reactive oxygen species in both peripheral organs and brain.⁵⁸ GSH levels have been found significantly decreased in the cerebrospinal fluid of drug-free patients with schizophrenia as compared with those in controls, and non-invasive proton magnetic resonance spectroscopy showed a significant reduction of GSH in the medial prefrontal cortex of patients.⁵⁹ A negative correlation between GSH levels in the posterior medial-frontal cortex and the severity of negative symptoms in schizophrenic patients has also been reported.⁵⁵ *GSTM1* and *GSTT2* are members of a superfamily of proteins that catalyse the conjugation of reduced GSH to a variety of electrophilic and hydrophobic compounds. GSH has also been postulated to act as neuromodulatory and neurotransmitter^{60,61} with both reduced and oxidized forms preventing the excessive pathological dopamine release in the striatum,⁵⁸ that would lead to degenerative processes in dopaminergic terminals resulting finally in the loss of connectivity.

Given the evidence for replicated association of the 22q11.23 region with schizophrenia^{19,56,62–65} an alternative hypothesis to the direct effect of *GSTT2* copy number could be that the regional structural variation would influence the risk of schizophrenia by altering regulatory elements for other genes in close proximity, such as the previously mentioned candidates *CABIN1* and *ADORA2A*. In fact, this genomic region shows a high density of SD and CNV that may influence the expression of surrounding genes as demonstrated in other conditions.^{28,66} However, the finding of disease association with GST genes located elsewhere in the genome, strongly suggests a direct effect of *GSTT2* variation on the risk of schizophrenia.

Owing to the role of GSH in drug resistance metabolism, variation at the GST genes might also influence patients' response to therapies. In fact, the long-known antioxidant role of GSH is being reconsidered for clinical use in different oxidative stress states, including neuropsychiatric disorders with demonstrated excitotoxic neuronal damage.⁶⁷ A more detailed profiling of CNVs and functional variants in all genes involved in GSH metabolism might provide additional alleles or allelic combinations associated with disease susceptibility, and determine potential therapeutic targets aimed to preserve GSH balance in schizophrenia.

The rare chromosomal aberrations found in our cohort of patients with schizophrenia support previous findings, suggesting the need for alternative approaches to gene discovery in schizophrenia.^{25,68} In addition to the dominant common disease/common allele model, which posits that schizophrenia is caused by combinations of common alleles that each contribute a modest effect, some mutations predisposing to schizophrenia appear to be highly penetrant, individually rare and of recent origin, even specific to single cases or families. The finding of patients with new structural genomic aberrations can define novel candidate loci for the disease.⁶⁸ Given that the identification of rare variants in few cases may not conclusively establish causal links to illness unless large cohorts are analysed, robust and affordable methods such as MLPA can be used as an alternative to whole genome analyses in the search of candidate genes contained in structural variants, as well as for confirmation. The increasing list of candidate genes affected by dosage and potentially associated to the disease, provides clues for several key neurodevelopmental pathways that can be targeted for further investigations, representing a fundamental progress in psychiatric genetics.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We are indebted to patients and relatives for their support. We thank the Barcelona and Santiago de Compostela CEGEN units, especially Anna Puig, Anna Carreras and Mònica Bayés for their help with DNA-plate preparation and fragment analysis as well as Dr Andrés Medrano for his helpful comments. This work was funded by the Spanish Ministry of Health (PI070539 to LAPJ, RETIC G03/184 to XE, AC, LAPJ and EV, and PI050842 to EV), the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2005-01005 to XE), the EU FP6 (037627) and *Genoma España* to LAPJ and XE. B Rodríguez-Santiago is supported by a postdoctoral fellowship of the *Fondo Investigación Sanitaria* (FIS CD06/00019).

References

- 1 Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE. Structural variation of the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; **7**: 407–442.
- 2 Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; **3**: 199–242.
- 3 Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 85–97.
- 4 Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet* 2007; **39**(7 Suppl): S22–S29.
- 5 Hebring SJ, Adjei AA, Baer JL, Jenkins GD, Zhang J, Cunningham JM *et al*. Human SULT1A1 gene: copy number differences and functional implications. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 463–470.
- 6 Ouahchi K, Lindeman N, Lee C. Copy number variants and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2006; **7**: 25–29.
- 7 Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J *et al*. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 2006; **439**: 851–855.
- 8 Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevens CL *et al*. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 439–448.
- 9 Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G *et al*. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science (New York, NY)* 2005; **307**: 1434–1440.
- 10 Cook Jr EH, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 2008; **455**: 919–923.
- 11 Carlson C, Papolos D, Pandita RK, Faedda GL, Veit S, Goldberg R *et al*. Molecular analysis of velo-cardio-facial syndrome patients with psychiatric disorders. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 851–859.
- 12 Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 1999; **56**: 940–945.
- 13 Shprintzen RJ, Goldberg R, Golding-Kushner KJ, Marion RW. Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1992; **42**: 141–142.
- 14 MacIntyre DJ, Blackwood DH, Porteous DJ, Pickard BS, Muir WJ. Chromosomal abnormalities and mental illness. *Mol Psychiatry* 2003; **8**: 275–287.
- 15 Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR *et al*. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science (New York, NY)* 2005; **310**: 1187–1191.
- 16 Kamnasaran D, Muir WJ, Ferguson-Smith MA, Cox DW. Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia. *J Med Genet* 2003; **40**: 325–332.
- 17 Wilson GM, Flibotte S, Chopra V, Melnyk BL, Honer WG, Holt RA. DNA copy-number analysis in bipolar disorder and schizophrenia reveals aberrations in genes involved in glutamate signaling. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 743–749.
- 18 Sutrala SR, Goossens D, Williams NM, Heyrman L, Adolfsson R, Norton N *et al*. Gene copy number variation in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007; **96**: 93–99.
- 19 Moon HJ, Yim SV, Lee WK, Jeon YW, Kim YH, Ko YJ *et al*. Identification of DNA copy-number aberrations by array-comparative genomic hybridization in patients with schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **344**: 531–539.
- 20 Friedman JL, Vrijenhoek T, Markx S, Janssen IM, van der Vliet WA, Faas BH *et al*. CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry* 2008; **13**: 261–266.
- 21 Kirov G, Gumus D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M *et al*. Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 458–465.
- 22 Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, Gogos JA, Karayiorgou M. Strong association of *de novo* copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 2008; **40**: 880–885.
- 23 Stone JL, O'Donovan MC, Gurling H, Kirov GK, Blackwood DH, Corvin A *et al*. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 2008; **455**: 237–241.
- 24 Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S *et al*. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 2008; **455**: 232–236.
- 25 Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM *et al*. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science (New York, NY)* 2008; **320**: 539–543.
- 26 Gratacos M, Costas J, de Cid R, Bayes M, Gonzalez JR, Baca-Garcia E *et al*. Identification of new putative susceptibility genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of 306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; e-Pub ahead of print, PMID: 19086053.
- 27 Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y *et al*. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; **36**: 949–951.
- 28 Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V *et al*. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res* 2008; **18**: 683–694.
- 29 White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B *et al*. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat* 2004; **24**: 86–92.
- 30 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: e57.
- 31 Slater H, Bruno D, Ren H, La P, Burgess T, Hills L *et al*. Improved testing for CMT1A and HNPP using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with rapid DNA preparations: comparison with the interphase FISH method. *Hum Mutat* 2004; **24**: 164–171.
- 32 Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 2003; **40**: 907–912.
- 33 Cusco I, Del Campo M, Vilardell M, Gonzalez E, Gener B, Galan E *et al*. Array-CGH in patients with Kabuki-like phenotype: Identification of two patients with complex rearrangements including 2q37 deletions and no other recurrent aberration. *BMC Med Genet* 2008; **9**: 27.
- 34 Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF *et al*. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 2007; **17**: 1665–1674.
- 35 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD *et al*. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; **444**: 444–454.
- 36 Sullivan PF. Schizophrenia genetics: the search for a hard lead. *Curr Opin Psychiatry* 2008; **21**: 157–160.
- 37 Lai MM, Luo HR, Burnett PE, Hong JJ, Snyder SH. The calcineurin-binding protein cain is a negative regulator of synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34017–34020.
- 38 Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M *et al*. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 2007; **87**: 42–56.
- 39 Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V *et al*. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2004; **10**: 265–271.
- 40 Fuxe K, Ferre S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Marcellino D *et al*. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J Mol Neurosci* 2005; **26**: 209–220.
- 41 Torvinen M, Marcellino D, Canals M, Agnati LF, Lluís C, Franco R *et al*. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 400–407.
- 42 Deckert J, Brenner M, Durany N, Zochling R, Paulus W, Ransmayr G *et al*. Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *Neuroreport* 2003; **14**: 313–316.

- 43 Saito T, Guan F, Papolos DF, Rajouria N, Fann CS, Lachman HM. Polymorphism in SNAP29 gene promoter region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; **6**: 193–201.
- 44 Wonodi I, Hong LE, Avila MT, Buchanan RW, Carpenter Jr WT, Stine OC *et al*. Association between polymorphism of the SNAP29 gene promoter region and schizophrenia. *Schizophr Res* 2005; **78**: 339–341.
- 45 Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 2003; **55**: 509–550.
- 46 Nyegaard M, Borglum AD, Bruun TG, Collier DA, Russ C, Mors O *et al*. Novel polymorphisms in the somatostatin receptor 5 (SSTR5) gene associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 2002; **7**: 745–754.
- 47 Glatt SJ, Jonsson EG. The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; **141B**: 149–154.
- 48 Lencz T, Robinson DG, Xu K, Ekholm J, Sevy S, Gunduz-Bruce H *et al*. DRD2 promoter region variation as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first-episode schizophrenia patients. *Am J Psychiatry* 2006; **163**: 529–531.
- 49 Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA *et al*. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006; **38**: 1038–1042.
- 50 Sutcliffe JS, Han MK, Amin T, Kesterson RA, Nurmi EL. Partial duplication of the APBA2 gene in chromosome 15q13 corresponds to duplicon structures. *BMC Genomics* 2003; **4**: 15.
- 51 Yin Z, Haynie J, Williams BR, Yang YC. C114 is a novel IL-11-inducible nuclear double-stranded RNA-binding protein that inhibits protein kinase R. *J Biol Chem* 2003; **278**: 22838–22845.
- 52 Hashimoto T, Hashimoto K, Miyatake R, Matsuzawa D, Sekine Y, Shimizu E *et al*. Association study between the genetic polymorphisms of glutathione-related enzymes and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 1040–1046.
- 53 Harada S, Tachikawa H, Kawanishi Y. Glutathione S-transferase M1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 267–271.
- 54 Pae CU, Yu HS, Kim JJ, Kim W, Lee CU, Lee SJ *et al*. Glutathione S-transferase M1 polymorphism may contribute to schizophrenia in the Korean population. *Psychiatr Genet* 2004; **14**: 147–150.
- 55 Matsuzawa D, Obata T, Shirayama Y, Nonaka H, Kanazawa Y, Yoshitome E *et al*. Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: a 3T 1H-MRS study. *PLoS ONE* 2008; **3**: e1944.
- 56 Saadat M, Mobayen F, Farrashbandi H. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1: a candidate genetic modifier of individual susceptibility to schizophrenia. *Psychiatry Res* 2007; **153**: 87–91.
- 57 Tomic M, Ott J, Barral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F *et al*. Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 586–592.
- 58 Janaky R, Dohovics R, Saransaari P, Oja SS. Modulation of [3H]dopamine release by glutathione in mouse striatal slices. *Neurochem Res* 2007; **32**: 1357–1364.
- 59 Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D *et al*. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex *in vivo*. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 3721–3728.
- 60 Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y *et al*. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 1999; **73**: 889–902.
- 61 Shaw C (ed) *Glutathione in the Nervous System*. Taylor & Francis: Washington DC, 1998, pp 3–23.
- 62 Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I *et al*. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 34–48.
- 63 Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ *et al*. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 152–161.
- 64 Bulayeva KB, Glatt SJ, Bulayev OA, Pavlova TA, Tsuang MT. Genome-wide linkage scan of schizophrenia: a cross-isolate study. *Genomics* 2007; **89**: 167–177.
- 65 Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A *et al*. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 1296–1302.
- 66 Reymond A, Henrichsen CN, Harewood L, Merla G. Side effects of genome structural changes. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**: 381–386.
- 67 Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 4904–4911.
- 68 McClellan JM, Susser E, King MC. Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br J Psychiatry* 2007; **190**: 194–199.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

Material suplementari

Rodríguez-Santiago et al., 2009

Figure S1. Representative electropherograms of each of the four dual-colour MLPA panels used.

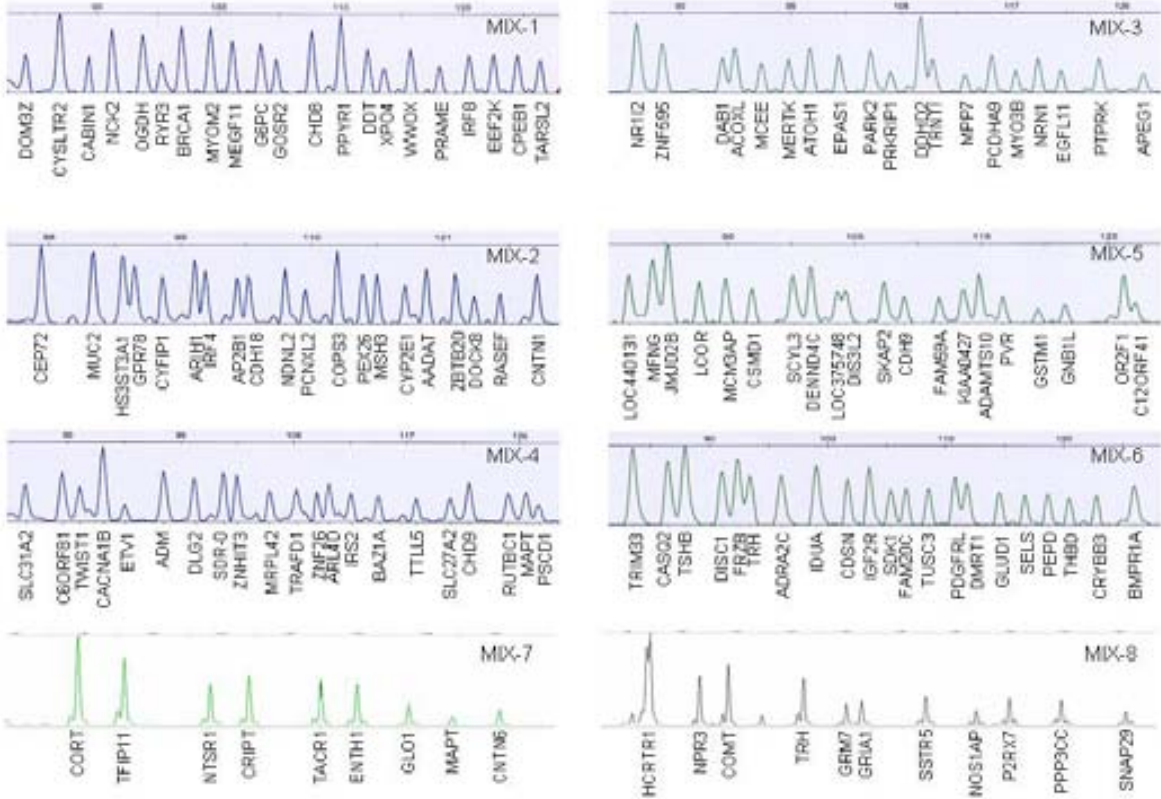
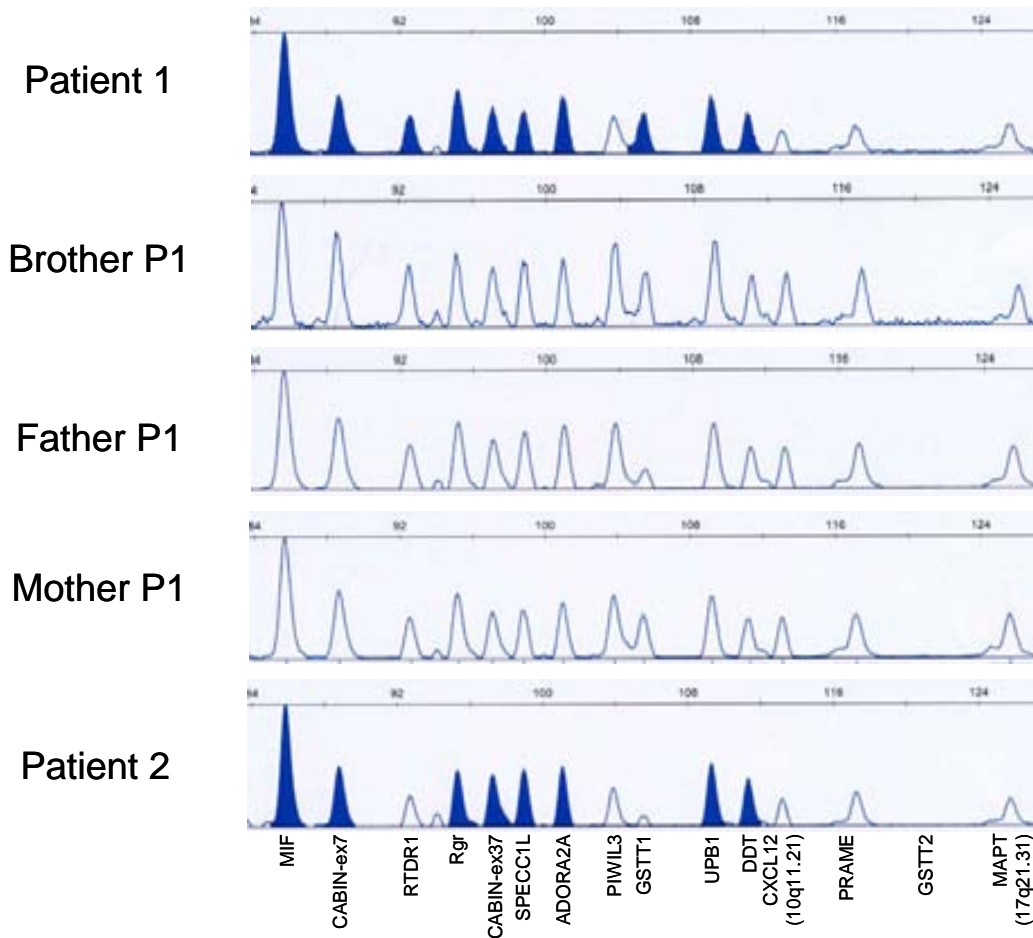
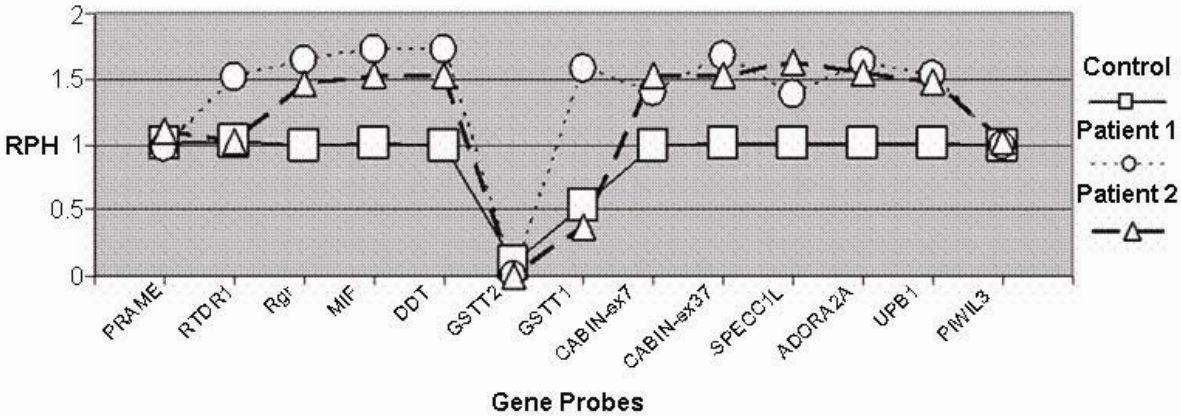


Figure S2. Electropherograms of MLPA peak patterns in the two patients with chr. 22q11.22-23 duplications and first degree relatives of patient 1.



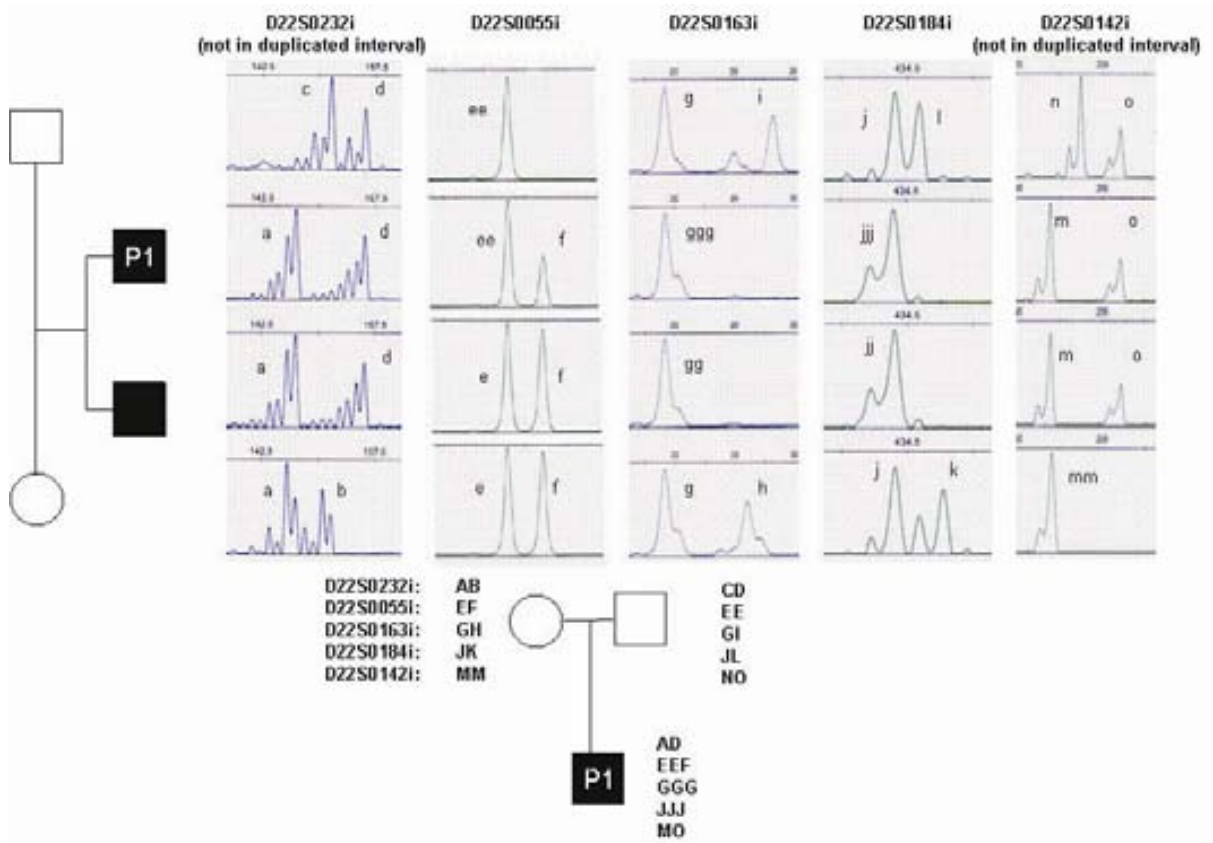
Dark peaks depict duplicated signal. A *de novo* duplication of several probes can be seen in Patient 1. Notice that gene probe peaks are not sorted by their genomic position. The Relative Peak Height (RPH) ratios of MLPA probes within 22q11.22-23 region arranged by their genomic position are shown in Figure S3 and Table S4.

Figure S3. Relative Peak Height (RPH) ratios of MLPA probes within the 22q11.22-23 region in patients 1 and 2.



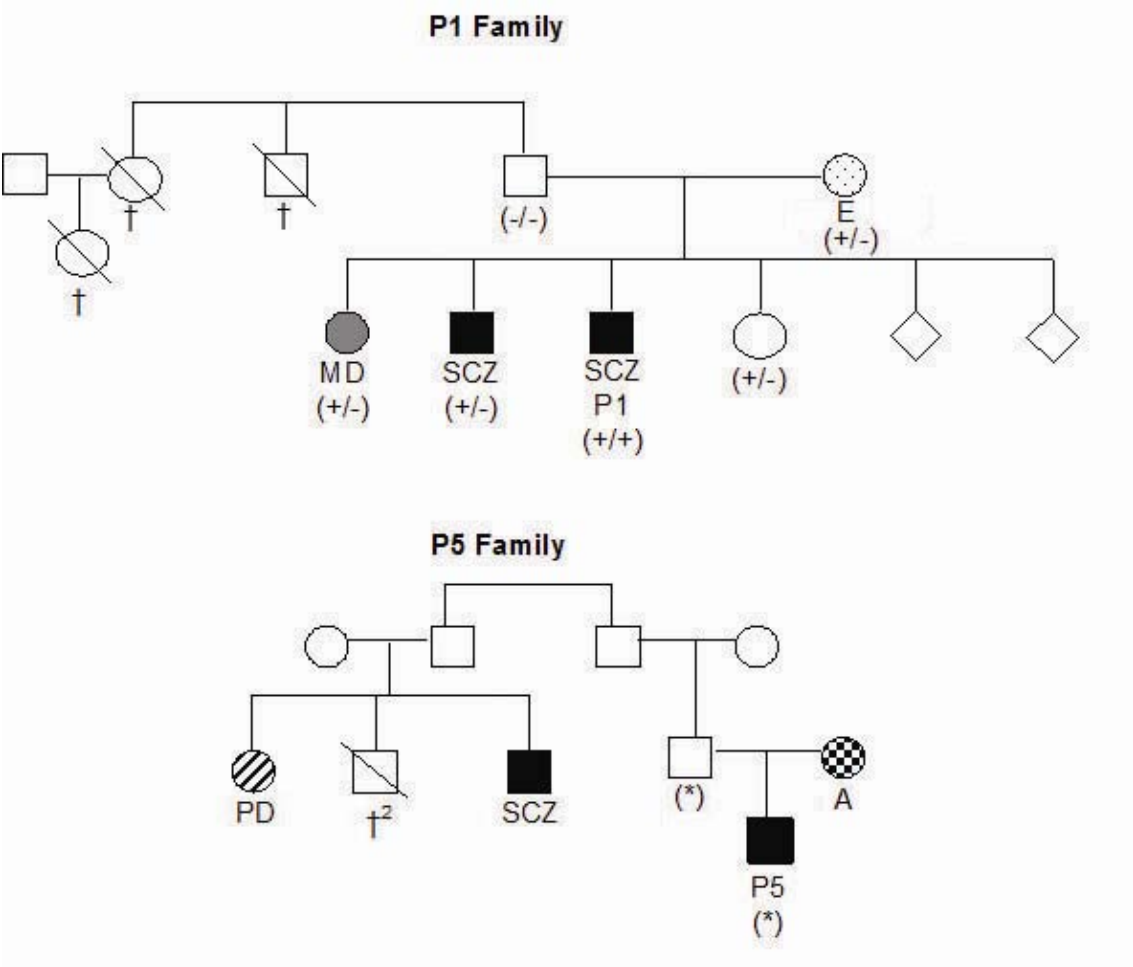
The control line corresponds to mean values obtained from 604 controls. Data from patients were normalized against control values. An RPH close to 1 means no change in copy number, while heterozygous deletions and duplications show RPHs of 0.5 and 1.5, respectively. *RTDR1* is only duplicated in patient 1 indicating that the duplication is larger on the centromeric side. *GSTT1* and *GSTT2* are highly variable loci within the duplicated fragments, and thus, do not necessarily show values in the duplicated range.

Figure S4. Segregation analysis of 22q11.22-23 microsatellite markers in family 1



A *de novo* duplication originated in the paternal chromosome was demonstrated. Haplotype data showed that the duplication had originated through an intrachromosomal recombination event in patient 1.

Figure S5. Pedigrees of the two families (from patients 1 and 5) with several relatives affected by mental illnesses. The diagnosis and the genotype at the specific CNV when available are shown under the symbol.



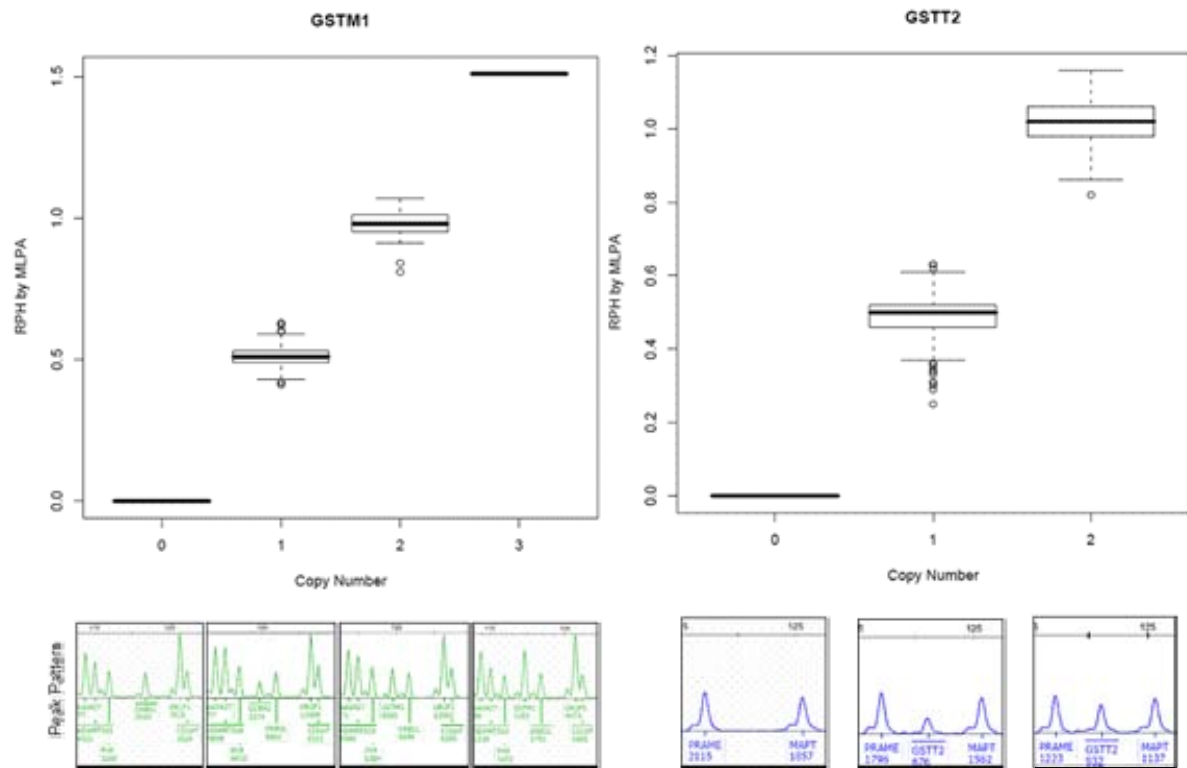
SCZ: Schizophrenia; E: Epilepsy; MD: Major depression; PD: Psychotic Disorder; A: Adaptative Disorder with Anxiety; † : Suicide; †² : death by drug abuse

(/): Individuals analysed for (SNAP29 gain / 22q11.23 dup); + indicates presence of the duplication

P1: SNAP29 gain and *de novo* 22q11.23 duplication

(*): Individuals analysed for ZNHIT3 gain; an asterisk indicates presence of the duplication

Figure S6. Boxplots of Relative Peak Height (RPH) ratio ranges of the different copy number genotypes obtained by MLPA at *GSTM1* and *GSTT2* loci with an example of the corresponding electropherogram shown below.



RPH ratios obtained by MLPA showed a clear separation without overlapping values between each class of copy number genotype assigned, which can also be observed by visual examination of electropherogram peak patterns.

Table S1. Selected genes from CNVs and oligonucleotide sequences used for detecting copy number changes by MLPA.

Chr	Locus Start	Locus End	Target	Start probe	End probe	Upstream hybridising sequence	Downstream hybridising sequence
1	10160657	10505141	CORT	10432653	10432701	cactgattgctccagcttctgctc	actgcgcgaggggaagaggaagag
1	31454967	32238918	HCRTR1	31859201	31859253	ggaatgcagcagtgctgctcgag	ctagccaaccgcacacggctctctcag
1	57288465	57408242	DAB1	57383571	57383628	gccaattgacgaggattgatgaagtttc cgca	gctcggggagacaagtattgtcaag
1	110019656	110059006	GSTM1	110033404	110033465	ggtcatagtcagtcgcattttgagAAC cagaccatggacaacat	atgcagctgggcatgatctgtacaatcc agcgttgaag
1	112958658	116542895	CASQ2	116084901	116084953	ctgtatattcttaaggggatcgcac	aatagagtttgatggcgagtttgcag
1	112958658	116542895	TRIM33	114771334	114771384	ctaattggagcaatacgtttccattgtg	atccccacctctgggcaaaagaatg
1	112958658	116542895	TSHB	115378260	115378314	ctgtaagtgtggcaagtgcataactga	ctatagtactgcatacatgaagccatc
1	160331092	160626632	NOS1AP	160331361	160331420	ggTgaacgggTggagcagctggcttta ag	tccactcacactccactatgggttctgcag
1	168048630	168151810	SCYL3	168111763	168111825	catctgittttgagtgaaagtggacac t	ggaagctaggaggaaatgaaactgtttgt aaag
1	229691383	229982619	DISC1	229973225	229973281	gcaaggatgtttgtgctggaagccaaa ga	tcaacagctgagaagggaataagagga g
1	230661638	231474039	PCNXL2	231461102	231461171	gtagctgtactctcatcgtacttctcaa cccgga	gaccactgagtctacatgagccataa aaattg
2	46386316	46727655	EPAS1	46427621	46427688	ccacagTgagctcccctcTggacaa ggcctccat	catgagactggcaatcagcttctcTcgaa cac
2	46386316	46727655	CRIP1	46704226	46704284	cagagcagagatgtacaggcatatca gaca	gtagccatctggaaataggctaaacccatc gaca
2	71185811	71226928	MCEE	71190684	71190745	gcagctgtgattgaaataaaaaaaag aaga	tccgcagtctaagtgaagagggtcaaaata gg
2	75216931	75236218	TACR1	75235471	75235471	ctcccctatcccctcttccggccatcctc	tgccactggcttccaagtctgcattggcc
2	105711636	105852218	NCK2	105875904	105875955	ggaagaacaacaactcaaggTgcag	ctcgtggacaatgtctactctgcattgg

2	111229505	111380194	*ACOXL	111279325	111279384	ctccagatggacagtagtaccattcgccttatt agga	acaagagtgcaagatcaatgccatgc
2	111616254	112463408	MERTK	112403168	112403228	ctatcactgaggcaagggaaagaagcc aagcct	taccccgtattccccgggaccctttccagg
2	170976681	171137832	MYO3B	171028132	171028185	tcfggaggtgatacggcgcacccggaaga aa	ccaccaacatgaagaggcaaacigt
2	183145945	183543329	FRZB	183411484	183411542	gtgactgcagtagtggagggaagga g	atctaaagtctctctggttaaacattccac
2	219915163	220098787	SPEG	220037490	220037550	gagcgtggcgatcgtggttctacactg c	aaagcggccaatgagtagtggctcggca gt
2	232245069	232714102	DIS3L2	232588537	232588607	ccacacgagggaagaaaaagagcat attfgaaa	cttcatgtccaaggaggatgtttcagaag gctggaag
3	1222123	1302426	CNTN6	1245373	1245432	cccttggcaccacacattatgtcccaga gg	atctagccaaggaaacccaaaaagtgagct gc
3	1855954	3331591	TRNT1	3145797	3145872	cagtatctattcaaatgaagttgcagtc tccgaaattc	cagtcactttcacagaaggacigaagag tctgacag
3	7499552	7539303	GRM7	7528228	7528287	catctctcagctgcgtttgtcccgaatg c	gtcatacccagacatgccaccatctcatgc c
3	116134773	116162034	ZBTB20	115553128	115553209	ggctacagggacatcgatcccgcgicg gfggtgcagtcagtcagtgcaaa	agctcattgacttcatgtacacggcggctgc
3	120926480	121091572	NR1I2	121008925	121008976	caaggccactggctatcactfcaatgt c	catgacatggaaggatgcaagggc
3	131142157	131422672	TRH	131178232	131178291	cgtcccagatcttcaatctgactggctct c	caaacgtcagcatcccaggcaaaaagaga gg
4	4287	240916	ZNF595	75628	75681	gttctcttccagccaagacccttc	accagtcaggggataagaagattcattcc
4	593208	1077531	IDUA	987800	987850	gtgcctgaggacatacagagatccagt	tctctcaggacggtgaagggtacac
4	3364142	4401887	ADRA2C	3739476	3739526	aagcacatcctctccgacggagg	agaaggggttcaggcagtgactcgca
4	8573073	9922209	GPR78	8639936	8639991	ccacaacggctctgtggacacagaga g	atgattcctgcctgcagcagacacactga g
4	9465774	95335613	ATOH1	94969641	94969700	cagctgcgcaatgttatcccgctgttcaa caa	cgacaagaagctgtccaatatgagacc

4	171230488	171388343	*AADAT	171246209	171246288	gacataattgagcagaggaccaaaatc gatgatctct	tggctgtggcctaccaaaatccaaacatgt ttccttttaagac
5	70009	1248692	CEP72	690722	690769	gcaggaagcgaagaatgcctgtt	ggaagattccagacgttttcggacc
5	19581960	19758529	CDH18	19579735	19579800	ctacaaggftctcgacagagaagaa actccatg	gtacaacatcacagtcactgcttcagaaa ttg
5	26791043	26970636	CDH9	26942629	26942701	catctgtatacaagaactaacagaga tgcagatgacgc	caactatggaatatagtgccaaagtggctc atag
5	32281118	32774401	NPR3	32750060	32750119	gagatcggcggtttgcctgactgcctgta a	tgtcactaccctgtagatccaatgtcagc
5	79882591	80063088	MSH3	80003860	80003935	caactttatgacagcaagtatacctactc acagactgttg	ttcatgtacgcccgctgtggcaaaagga tataag
5	140137124	140808866	PCDHA9	140208267	140208335	gttataccaagtcgaggagatccaga gggtcagc	ctctactgctcgcctctgatcctcgcgaatg tg
5	153062206	153273106	GRIA1	153134500	153134559	ctgacatctaaggccccaaatgttcctcc aa	aactggccaagtctacttggcagaagcca g
5	156930186	157165622	ENTH	157151261	157151321	caaattccaagggaaaccagacaactt acctg	tgatcttgacatagggcaaaccaagtccca c
6	5001	720274	IRF4	352509	352570	catttcctgagggctacgatttaccag aac	acatcagcaatccagaagattaccacag atc
6	5800622	5987503	NRN1	5944357	5944428	aggatttccacagctgcacggtcacag cccttaccgat	tgccaggaagggggcgaagatatgtgg gataaac
6	31136269	31650287	CDSN	31192430	31192496	cctatgggtggctacgaggtgggtggg ctcctctgacagttaa	ctggttccaggcatgacctacag
6	31979491	32317091	DOM3Z	32047183	32047228	ctactatagccccaccccccaactaacg	gtccagggcccccaactttgac
6	35712406	35910572	C6ORF81	35813872	35813921	ccaagagcatgatcctgcacagatata	ctcgcctgtgtacttctgtggag
6	38696947	38819063	GLO1	38763590	38763647	ccatttggatgtaccctccagaccataag	tcctgaaacctcacctggtcttcctaaca
6	66171873	66191469	EGFL11	66171850	66171909	gcagttctgcttatactatgaatgccca a	aaggatctccagcccaaaaatggtgaaact g
6	128252093	128389518	PTPRK	128339517	128339576	ccccatccaagtggaatgtaigtcttgt	tcaatggactgtgatgatcaaccggattt t
6	160292234	161362367	IGF2R	160332253	160332320	tcaacatctgtggaagtgtggatattgtc c	agtgccgggccaatcaagctgtttgtatgc acgacttg

6	161969747	163165803	PARK2	162784433	162784479	ctccagccatggtttccagtgga	ggtcgattcgcaccagcatct
7	106328	298664	FAM20C	290688	290760	cgTggacttctatcccaactggctcaag ttccacattg	gtatcaaccggtacgagctgtactccaga cacaac
7	3568874	3596875	SDK1	3645196	3645266	gggttttaccgcgfcggtgcgaaaca gaatgggagcac	tcctgcaaagaaatcagaagtccaagtc gc
7	13405467	14521413	ETV1	13941858	13941913	gftcaacctccctccatcgcagtcata	ccagatagcagctaccccccatggaccaca g
7	19044740	19144023	TWIST1	19122931	19122980	cagagcgacgagctggactccaaga	tgccaagctgcagctatgtggctca
7	26755073	26955685	*SKAP2	26850207	26850279	gatgcagaagatgggaagaatatga tgaccttttgc	tgggcctccagacaciatttcattagcctca gaac
7	44657349	44836117	*OGDH	44672861	44672938	gftctatggccggtgatgagctgaccctcg acaagg	tcttccacttgcccaccaccactttcatcgg gggacaggaatc
7	101687460	102574371	PRKRIP1	101827026	101827097	gagttccacgigtacagacatctgcgcc gga	gagaatatcagcgacagggactacatgga tgccatggctgag
7	142857897	143999571	OR2F1	143288436	143288496	gactcattggcatgtaggcatcctgggt cagtggtctcatcagctctc	ctgtgcagactgtatacccttfcagctgcc gtaactaggctg
8	1972946	2591249	MYOM2	1986315	1986374	cagaagagacataggcacttcgacca gt	cctaccgtaatatccaacacggtaccctgc tg
8	3586932	6236366	CSMD1	3044676	3044738	gggaaacattgcccttggctacgtcaa atcaaatc	tgctccgattcagtgcaaaagagcggtg
8	14670571	15809077	TUSC3	15525055	15525129	ggcaccacctcgaaaactattccatgatt gftatgttcactgc	tcttcagcctcagcggcagtgftctgtgtgc ag
8	17335551	17685810	PDGFRL	17491449	17491525	caactgtagagcttcgatgtaaaggg agtagaatgggtg	gagctaccctcgtatctctggacacaccttaa ggattc
8	21729708	22858325	PPP3CC	22374763	22374821	ccaccctcaactgctggctggttttctag a	attgtagaagcagggtgggaatttctctg
8	38227290	38229372	DDHD2	38228854	38228913	tgctttggatctcctcattgggaatgt	tccttactgtccgaggactaaaaagaattg atcc
9	2044	862798	DOCK8	318043	318126	gacctgaactcigaccagttcaaaagga tttctcggagctc	acacgccttcagtggcccgcaicaagtcag gcgagatctgcagtc
9	868258	872957	DMRT1	906765	906843	gaagaacatggagaaccgccatgca atgagctcccagttac	aggatgcattcttactaccgccctccctctt acctgggc
9	19310506	19423218	*DENND4C	19350377	19350443	caacatccaatcatttctggaacctcgtt tggtat	ttcagacgtttggacccttctctagtaacttgc

9	84854348	84860978	RASEF	84797675	84797760	gatgcagcccatgagactgtccattat gctggtagaacaaggc	tgacattgtgacactgctgtacagagg gacaaaaatg
9	97623032	97773602	*LOC37574 8	97717865	97717933	gtccgattggcctcactggaaccatcc tcagaacaac	atgaaggaaactgggtgtgtatggactgg
9	114280275	115042772	SLC31A2	114963678	114963725	gccaagctgctcaaccaggctacgtgt	gaacctgccaacctccatcagc
9	140005384	140273252	CACNA1B	140126675	140126728	gacaaagcagcatcagctgacgcg99 agtt	gaggaaggagattccggtgtgtg
10	28602653	28611866	MPP7	28609025	28609083	cctgttaggtatagcagctctggcagttg ct	gaactgaattcctggctgtaagaagtg
10	44050362	44194325	CXCL12	44192388	44192461	cctctcacagcccctgtgacagtgta tgggcttttc	tcacgacagattagatctgcagctcaag tttttg
10	45341719	49121538	PPYR1	46507740	46507809	caaccattatctatggctttctcaaca cc	aacttcaagaaggagatcaaggccccctgg tgcctgactgc
10	88505038	89299742	BMPR1A	88639760	88639852	cagaaatgattacttacaattccattat tgaatcaggac	agaatctgatatgcttctatggcacctg ggatgaaatcagactccgacc
10	88505038	89299742	GLUD1	88803079	88803141	ggctgctctgagaaagacatcgtgcac tctg	gcttggcatacacacaatggagcgttctgccc agg
10	98669574	98860467	*LCOR	98698978	98699036	ggctgaccaagactcacctctggacctt ac	tgtcagaaaagctcagtcagcagaacctagcg
10	134694412	135374737	CYP2E1	135197307	135197384	gacctgttcttggcgggacagagacc accagcacaact	ctgagatatgggcctcctgattctcatgaaat acctgag
11	368188	1313968	MUC2	1074785	1074836	ctccattacgggagtgccacta	catcacctttgatgggaagtactacgac
11	10149870	10309473	ADM	10284072	10284122	gtggaataagtgggctctgagctgtggg a	agagggaactcgggatgccag
11	84217259	84271303	DLG2	84311769	84311826	ctccttatttactgcaatgttctttgcatgtt ac	tgtgcactccgggactaactggaag
12	39368666	39466502	CNTN1	39602326	39602385	tggagaatgaataatgggacgttgat ct	cacaagtgcatacagataggttagga gga
12	47345081	47357512	C12orf41	47351847	47351913	ggctgactccatgcatctctcaagg agaagaagcgcgcatacttaccata	atcgaagaagtggaacatgaagctctagg cgtagtctgtgg
12	55606077	55610763	SDR-O	55610393	55610452	gtgattaatgtgaacctgtggggactg gtc	atcgaagtgaccttccatgctgcccaatg gtc

12	92385303	92387120	MRPL42	92385411	92385470	tgggaccaggattgaaacaagaatggc gggttcg	tggtgagaagccgtcaaggtaaccgct
12	110988648	111165315	TRAFD1	111063194	111063261	gagaaatgaggtgcccataccctctaataat gcatatgatg	aatcttgggtcaggatggaatctggattg
12	119900228	120069196	P2RX7	120088320	120088379	ctaggagacatcttccgagaaacagga cgat	aatttticagatggtggcaattcagggttgg
12	131995294	132288869	ZNF26	132096830	132096899	gagcttgagagattgaaagaagctat gcttgaagtgtg	tigggaaagacttaatctgagcaaaaaccca tg
13	20266985	20427181	XPO4	20334902	20334975	ccttttcaagctgcccacagccataatg gaagcag	tigtccgagagtggtgattctcttgaaaaaag gtagcatcg
13	29287822	29438243	*LOC44013 1	29419838	29419890	ctctggccgtcacgtgtggagtgaaa	ttctcagaagcggctgtccctgtgcac
13	48069307	48370518	CYSLTR2	48179735	48179782	ctgccctatcacacacitgaggacc	gtccactgacgacatggaagagtg
13	108167625	109357572	IRS2	109236046	109236105	gaacatcaacaagcgccgacgacc aagcacaagta	ccctgatcggccctctacaccaagga
14	20923484	20941004	CHD8	20929855	20929922	ccagaagcacaaagtgtgatggcgaatg gagtaatgg	gagatggacatccactgtttcataagaag aagg
14	34399507	34591592	BAZ1A	34413449	34413504	cccgacgaggaaagttttctactgtaaag	tcaccaacgagatctccgccactacga
14	75417994	75430186	TTL5	75418781	75418842	gcaatctttggcagccagacactaccta act	ccaattttggacaatatgaataatgggca gg
15	4998783	5138666	*JMJD2B	5028422	5028471	cataagatgaccctcatctcggccat	catctgaaagaagtaacgggatccc
15	18263733	21405800	CYFIP1	20479850	20479907	gtgaaatgtaacgagcagcctaacag agt	ggaaatctacgagaaaaaccgtggagggtt c
15	26086062	32778261	RYR3	31552915	31552970	gatgaagtggtactccagtgcatcgcc a	ccattcataaggagcagagggaagtctg
15	26768706	28766520	NDNL2	27348880	27348947	ggagctgaaagtgctccgagctgggca gttctt	gctgattaagaccagaaagaagattccg atcaagc
15	48172576	48330980	SLC27A2	48281994	48282053	tgatcactcatcagcgcataatggtatgg aa	ctggccctcacttttgaagcggattgaagg
15	63967839	64137439	MEGF11	63994880	63994941	catgaaacaactccaccctgtgaccatgtc accggca	ccctgttactgcagcccctggcttcaaaag
15	70456429	70907613	ARIH1	70642827	70642886	ccaccatgtgttaaagtgccaataatctctg atgc	taaaccttctgcgtgcaaatgtgggcg

15	80432018	81356434	<i>CPEB1</i>	81018338	81018421	ggtatgttatctggcttcgaactagag aagctgtccgatcc	tgcttcaggctgtctctcatgaccccgctga gcccagatg
15	99298613	100336759	<i>SELS</i>	99634311	99634393	gctggccacctatggctgtacatogtct tcagctgcatccttctct	acgtggtcttcagaagcttccgccggcct aagag
15	99298613	100336759	<i>TARSL2</i>	100072574	100072659	caaagtcaatgggaactgtgggacct ggaccgccattgg	aaggggacctctctagagctgtctacatt tgataatgaggaag
16	988527	1074819	<i>SSTR5</i>	1069623	1069682	gtgggtgctgggtttgcgggaatggtg g	ctgccccttccaccgtcaacatcgtcaac
16	21694370	22510343	<i>EEF2K</i>	22176077	22176158	cttcagccacttcactttgagcgttccgg ccatcagctga	tagtggaggacatccagggagttggggat ctctacactgac
16	51825384	52014243	<i>CHD9</i>	51915434	51915498	gatttctccagaagaagcatgtatgaacgt attctcac	tggtcccgttgtgagagaggaagtaagc
16	76771256	76773668	<i>WWOX</i>	77016313	77016388	ctggagctcaccaaagatggccctgga gaccaccttcaagt	gaatcatctggggcactctacctgttcca gctc
16	84512377	84607815	<i>IRF8</i>	84512481	84512560	ctgctgggggtggatgcccttactttgca cttaatttaataaggcca	ttctcggagagtagacglttaatacagaa gtgg
17	2026966	2250500	<i>*RUTBC1</i>	2229086	2229154	tgtatgaggatgtgtttgctgtgtgggag gtga	tcaagaggaagaaggcagctcgggggtg gcaagaag
17	13415317	13594294	<i>HS3ST3A1</i>	13445040	13445093	ctgatgctctgctcccctgctcacgtcccctt	tacgtcttactgcctggccgag
17	16658684	18263022	<i>COPS3</i>	17120085	17120156	ctfccaagaactatcccctcctggaca ctgtctcggggctctg	gatgacaagaacactcttggggcgtc
17	31064899	31067497	<i>AP2B1</i>	31068453	31068516	gtatccagccaggaaaccccccaattaca cggta	aggcccttctcagaatgggtgagatggatt ag
17	31429427	32016863	<i>ZNHIT3</i>	31925189	31925252	caacattaagaagcttattgtctcaatcc acacctc	aggcagttgatggtcaaccctcgatcagggg
17	38235012	38412429	<i>G6PC</i>	38313093	38313156	cagcaggtgtatactacgtgatggtcac atct	actcttccatcttccagggaaagataaag cc
17	38780759	38825561	<i>ARL4D</i>	38833165	38833223	ttgagccctctatgatgatcc	tcaagaggaagaaggcagctcgggggtg gcaagaag
17	41360800	42632332	<i>GOSR2</i>	42367394	42367459	gactctgacaccaccataccaatggac gaa	tcactgcagtttaactctccctccagaaaa gttcac
17	41402508	41560265	<i>MAPT</i>	41458365	41458434	gtcagtacgtagaggctctctggacttta gggctaaccagttctctttgta	aggactgtgccctctctggagacgtccac ccgtttc

17	74115005	74234926	<i>PSCD1</i>	74187952	74188019	ctgctttgagctttatccccgacaataa agacc	aagtatacaaggcctgcaagaccgagggc tgacy
18	28046335	28294302	<i>FAM59A</i>	28226856	28226915	gcttgaggagggtcactatgtca	ttggccaaagatagagattccggtacatt atgcag
18	44634522	44638410	<i>KIAA0427</i>	44637957	44638010	gagtcactactctcctctgcaatctca ggaigtgaaggaa	gatctgtccttttgcctctctatggagaacg aaaccg
19	8508853	8684664	<i>*ADAMTS10</i>	8568128	8568198	gctaacgccaaactttccaggactcga gtctgggaagcaccgtt	aacatcctcgtaaactcgcctcactctgctc acctgc
19	38468914	39273401	<i>PEPD</i>	38646733	38646809	gocgagtggttaagacggatattggagct ggaggttctgccta	taccaataaaatctccagcgagggcccac cgtgag
19	49726612	49900195	<i>PVR</i>	49852916	49852976	ggtaccitcaagtcctctgatccgtctctg tggacaacaaccatc	aacacaacttaatactgcaacgctcaccaa tgggtactgg
20	22977404	23127604	<i>THBD</i>	22976801	22976881	accocaggctagctgtgagtgccctgaa ggctacat	cctggacgacggtttcatctgcacggaca tcgacgagtgcgaaaaac
20	60305165	60897092	<i>NTSR1</i>	60816543	60816601	caaacagtgaggggaatcggagacggt ggcct	ggtttcttagcaaaagactcggacaagtc gaccctttctggacttgagcacactccac
21	46497879	46544424	<i>*MCM3AP</i>	46529354	46529414	cattaggttcaccaaacctcaagtgtt g	gaccctttctggacttgagcacactccac tttggactctgctggtagccacttc
22	16925634	20280089	<i>PEX26</i>	16947878	16947951	gctctgtctcccacaagttcctgtcacta ccgatgtgttcgccagc	tttggactctgctggtagccacttc gagtcattgg
22	16925634	20280089	<i>GNB1L</i>	18169603	18169662	gatccaaagttaacctcgaagggtgic agccgcatacgcctgccatga	ggagcccgctatggacccttgactttgactc gagtcattgg
22	17181436	19922249	<i>SNAP29</i>	19572774	19572837	gcatgtatattagtaggagggttcaca ccag	cactgctactcgactcctggaaaatggt gg
22	18259187	18435258	<i>COMT</i>	18335516	18335575	ctggtaagatgggggtctgcaaatg cag	gagcttggggatgtccagaactgaccccc aa
22	20474108	21679640	<i>PRAME</i>	21222657	21222734	gatttacggaagaactctcattcaggact tctggactga	tggtcggaaaacagggcccagctgtgctc attfccagag
22	22587337	23052933	<i>CABIN1</i>	22775577	22775626	cittggagaaggattgccggttacagca	aagggctggctcctcaaggagaag
22	22587337	23052933	<i>DDT</i>	22643750	22643821	ctcctgaaggatactatccgctttttccc ctfg	gagtcctggcagattggcaagatagggga cggctatgac
22	23696801	24480646	<i>CRYBB3</i>	23928605	23928683	agcagagggtgggatgttaggactctgc tctctag	gtgatcttgttacgaactagagaacttccaa ggcaaacgctgcg

22	25228499	25359896	<i>TFIP11</i>	25237640	25237695	gattcttgtcttgcctgaaagcggcctta	aggcacacgggagttcactacttccacag
22	36174256	36324767	*MFNG	36205433	36205480	ggttctgccatgtggacgatgacaac	tatgtgaacccaaggcgctgc

Locus start and end corresponds to the CNV genome coordinates from the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) or

*from the CGH-array experiments performed by our group.

Table S2. MLPA probes from genes within 22q11.22-23 region (sorted by genome coordinates, human genome assembly 18, Build 36) used for gene copy number case-control analysis.

Gene	Chromosomal location	Upstream hybridising sequence	Downstream hybridising sequence	Start	End
PRAME	22q11.22	gatttacggaagaactctcaccaggactctg gactgta	tggtctggaacacagggccagctctgtactcatt tccagag	21222657	21222734
RTDR1	22q11.22	cactttccgtgccatggagggtgga	gacttacgaaaaagcccaagtgccgaag c	21731692	21731745
RGR	22q11.23	ctctgggactttactactgtgccca	cactttttggaactactcgtgtagaaggtag	22363084	22363139
MIF	22q11.23	gtccttctgccatcatgccgatgt	tcatcgtaaacacccaacgtagcccc	22566648	22566695
LOC653689	22q11.23	cgctcaaggatggtgatttcattctgact	gaaagggtcccttccctccac	22632462	22632514
DDT	22q11.23	ctcctgaaggatactatccgcttttccccttg	gagtcctggcagattggcaagatagggac ggtcatgac	22643750	22643821
GSTT2	22q11.23	ctctctgtgcacacccatgaggcagacag aaacactgagga	ctggagaaagcccagaactttgccagaatc atagagcaagc	22655264	22655345
GSTT1	22q11.23	ctgaaagccacaatgagaatgatgcacac	tgaggcctgtgtcctttaactactgcatttc	22706190	22706250
CABIN1 (exon 7)	22q11.23	ctttggagaaggattgccgtacagca	aagggctggtcctcaaggaga ag	22775577	22775626

CABIN1 (<i>exon 37</i>)	22q11.23	gtgaaggtaggtggtgcaccatctgc	acgccaggcgccatccttttctatgaagtg	22904385	22904440
SPECC1L	22q11.23	gacatggcattggccaaacgttcccgcagt c	gaactgctacagaatggaogttcgtatg	23047387	23047446
ADORA2A	22q11.23	gtggctcaacagcaaccigcagaacgtca	ccaactactttgtggtcactggcg	23159465	23159519
UPB1	22q11.23	gtcttgccttcatagacgataaaggcta	tcgtagagggtggctgcaatgtgtggagtc	23228094	23228153
PIWIL3	22q11.23	gctgggttcatacagcgcccttgcaggag agaag	gattggtagtitttcaagaccctggtgg	23483920	23483983

Table S3. Microsatellite primer sequences used for segregation analysis of markers in the 22q11.23 region.

Locus	Forward	Reverse	Start	End	T (°C)/Dye
<i>D22S0232i</i>	tggaagcagtaaccactgtg	ctcggcaacctgagatattag	21261707	21261856	56/FAM
<i>D22S0055i</i>	tccaagatccaacaatttatctat	gtcaaggcctaagcattgt	21878997	21879366	55/HEX
<i>D22S0163i</i>	tactctagcttcataggctcatag	tctgttcgttagaaggttcac	22562953	22563211	54/FAM
<i>D22S0184i</i>	cactgcctctctatggagtag	tagctcaattcacctatttctaac	22930381	22930811	54/HEX
<i>D22S0153i</i>	aagtgattctcatgcctaagtc	accataattagccaggag	23337671	23338080	54/FAM
<i>D22S0142i</i>	ctgtgtactggcattaacctagac	tttcattctcgaagaatggagag	23577235	23577489	56/HEX

(Coordinates from Human Genome Build 36)

Table S4. Summary of copy number changes in the 140 gene containing CNVs studied in 654 schizophrenic patients and 605 controls.

	Targeted Gene	CNV type	Frequency	
			Controls n=604	Patients n=654
Not detected	Table S1			
Controls and Patients	<i>PPYR1</i>	multiallelic	*	*
	<i>DDT</i>	multiallelic	*	**
	<i>GSTM1</i>	multiallelic	*	*
	<i>PCDHA9</i>	multiallelic	*	*
	<i>CYFIP1</i>	multiallelic	*	*
	<i>CYP2E1</i>	multiallelic	*	*
	<i>PARK2</i>	loss	2	1
	<i>PRAME</i>	loss	3	1
	<i>EEF2K</i>	loss	1	1
	<i>CYSLTR2</i>	loss	6	4
	<i>ZNF26</i>	gain	1	1
	<i>CSMD1</i>	gain	1	1
	<i>CXCL12</i>	loss	10	16
	<i>GLO1</i>	loss	2	1
	<i>SSTR5</i>	loss	1	1
Only in Controls	<i>EEF2K</i>	gain	1	
	<i>DOCK8</i>	gain	1	
		loss	1	
	<i>MCEE</i>	gain	1	
		loss	1	
	<i>CNTN6</i>	gain	1	
	<i>HCRTR1</i>	loss	1	
	<i>GRM7</i>	gain	1	

Only in Patients	<i>CABIN1</i>	gain	2
	<i>SNAP29</i>	gain	1
	<i>SSTR5</i>	gain	3
	<i>NDNL2</i>	gain	1
	<i>WWOX</i>	gain	1
	<i>TRIP3</i>	gain	1
	<i>PRKRIP1</i>	gain	1
	<i>MYOM2</i>	gain	1

*See Table 1 for frequency details of specific genotypes in multiallelic CNVs. **Two of the *DDT* gains were found together with gain of *CABIN1* in two patients.

Table S5. Symbol and predicted function of genes contained in the genomic duplications detected in schizophrenic patients.

Chr	Start	End	Gene	Gene Product
7	101,823,809	101,854,134	<i>PRKRIP1</i>	PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)
8	1,980,565	2,080,787	<i>MYOM2</i>	Myomesin (M-protein) 2
15	27,199,747	27,650,219	<i>KIAA0574</i>	KIAA0574 protein
15	27,347,651	27,349,309	<i>NDNL2</i>	Necdin-like 2
16	1,068,870	1,069,963	<i>SSTR5</i>	Somatostatin receptor 5
16	76,691,052	77,804,064	<i>WWOX</i>	WW domain containing oxidoreductase
17	31,925,713	31,964,837	<i>MYOHD1</i>	Myosin XIX
17	31,916,586	31,925,775	<i>ZNHIT3</i>	Zinc finger, HIT type 3
22	19,391,979	19,543,070	<i>PI4KA</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
22	19,458,383	19,472,008	<i>SERPIND1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade D
22	19,543,292	19,574,108	<i>SNAP29</i>	Synaptosomal-associated protein
22	19,601,714	19,637,889	<i>CRKL</i>	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
22	19,649,434	19,665,649	<i>AIFM3</i>	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3
22	19,666,558	19,683,326	<i>LZTR1</i>	Leucine-zipper-like transcription regulator 1
22	19,684,061	19,686,404	<i>THAP7</i>	THAP domain containing 7

22	19,699,464	19,712,302	<i>P2RXL1</i>	Purinergic receptor P2X
22	19,713,008	19,716,847	<i>SLC7A4</i>	Solute carrier family 7
22	21,731,594	21,814,241	<i>RTDR1</i>	Rhabdoid tumor deletion region gene 1
22	21,742,669	21,797,221	<i>GNAZ</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
22	21,817,513	21,836,531	<i>RAB36</i>	RAB36, member RAS oncogene family
22	21,852,552	21,990,223	<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region
22	22,245,314	22,252,495	<i>IGLL1</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
22	22,280,640	22,304,487	<i>LOC51233</i>	Hypothetical protein LOC51233
22	22,363,048	22,371,358	<i>RGL4</i>	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 4
22	22,413,773	22,423,279	<i>ZNF70</i>	Zinc finger protein
22	22,424,933	22,426,592	<i>VPREB3</i>	Pre-B lymphocyte gene 3
22	22,435,208	22,438,047	<i>C22orf15</i>	Chromosome 22 open reading frame 15
22	22,438,022	22,440,141	<i>C22orf16</i>	Chromosome 22 open reading frame 16
22	22,445,036	22,456,502	<i>MMP11</i>	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
22	22,459,150	22,506,704	<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
22	22,506,692	22,511,201	<i>DERL3</i>	Der1-like domain family, member 3
22	22,529,059	22,557,387	<i>SLC2A11</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11

22	22,566,565	22,567,409	<i>MIF</i>	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
22	22,629,601	22,633,393	<i>GSTT2</i>	Glutathione S-transferase theta 2
22	22,629,601	22,633,368	<i>GSTT2B</i>	Glutathione S-transferase theta 2B (gene/pseudogene)
22	22,639,026	22,644,748	<i>DDTL</i>	D-dopachrome tautomerase-like
22	22,643,554	22,652,019	<i>DDT</i>	D-dopachrome tautomerase
22	22,706,139	22,714,284	<i>GSTT1</i>	Glutathione S-transferase theta 1
22	22,737,765	22,904,596	<i>CABIN1</i>	Calcineurin binding protein 1
22	22,907,444	22,915,074	<i>SUSD2</i>	Sushi domain containing 2
22	22,945,622	22,971,110	<i>GGTLA1</i>	Gamma-glutamyltransferase 5
22	22,996,866	23,143,216	<i>SPECC1L</i>	SPECC1-like
22	23,153,530	23,168,325	<i>ADORA2A</i>	Adenosine A2a receptor
22	23,221,251	23,252,552	<i>UPB1</i>	Ureidopropionase, beta
22	23,266,410	23,281,275	<i>C22orf13</i>	Chromosome 22 open reading frame 13
22	23,281,618	23,298,509	<i>SNRPD3</i>	Small nuclear ribonucleoprotein D3
22	23,309,718	23,354,972	<i>GGT1</i>	Gamma-glutamyltransferase 1
22	23,311,591	23,319,035	<i>C22orf36</i>	Chromosome 22 open reading frame 36

Table S6. Duplications at 22q11 are slightly larger considering the flanking segmental duplications that likely mediated the rearrangements by NAHR.

	Proximal DC	Distal DC	Size
Patient 1	DC1837	DC1868	2,058,915
	21,287,633-21,322,135	23,346,548-23,380,066	
Patient 2	DC1846	DC1868	1,390,287
	21,973,628-21,987,782	23,363,915-23,376,892	

DC: Duplication clusters at the breakpoints (Human Genome Segmental Duplication Database, <http://projects.tcag.ca/humandup>).

Annex II

En aquest annex es recullen els principals protocols de laboratori utilitzats en aquesta tesi.

CULTIU DE SANG PERIFÈRICA I OBTENCIÓ D'EXTENSIONS CROMOSÒMIQUE

- PER L'ANÀLISI DEL CARIOTIP AMB BANDES G O PER L'ESTUDI DE FISH

Cultiu de sang perifèrica

1. Afegiu en un flascó de 25 ml
 - 8 ml de medi de cultiu RPMI
 - 2 ml de sèrum boví fetal
 - 0,5 ml de Fitohematoglutinina
 - 0,1 ml de L-Glutamina
 - 0,1 ml d'antibiòtic (Penicil·lina/Estreptomina)
 - 1 ml de sang perifèrica
2. Cultiveu 72h a 37 °C.
3. Afegiu 0,1 ml de Colcemid i incubeu durant 1 hora a 37°C abans d'extreure el cultiu.
4. Passeu tota la solució a un tub estèril de 10 ml i centrifugueu a 1600 rpm.
5. Traieu el sobrenedant i afegiu la solució hipotònica (KCl 0,075M) fins a 10ml, dispensant gota a gota els primers 3 ml.
6. Incubeu 35 min al bany Maria a 37°C.
7. Centrifugueu a 1600 rpm durant 10 min i descarteu el sobrenedant.
8. Afegiu Carnoy (3 metanol: 1 acètic) fins a 10 ml i es barreja amb el vòrtex.
9. Centrifugueu a 1600 rpm durant 10 min i es descarta el sobrenedant.
10. Repetiu dues vegades més els punts 8 i 9.
11. Afegiu Carnoy fins que la solució tingui un aspecte translúcid.
12. Realitzeu les extensions sobre els portaobjectes.

Es congelen 2 portes a -20 °C que s'utilitzaran per la tècnica de FISH.

La resta dels portaobjectes els poseu a envellir a l'estufa de 65°C durant 24h abans d'aplicar-hi la tinció amb bandes G per realitzar l'estudi del cariotip.

TÈCNICA DE FISH AMB HYBRITE

1. Descongeleu o feu les extensions cromosòmiques obtingudes a partir del cultiu de sang perifèrica.
2. Seleccioneu la regió del portaobjectes més rica en metafases en un microscopi invertit i es marca amb un llapis de diamant.
3. Tractament dels portes previ a la hibridació. Aquest pas NO es necessari quan treballem amb sondes comercials, però SI quan les sondes fetes per nosaltres (BACs).

Tractament portes per FISH

Portes

- Envelliu els cromosomes, deixant les extensions durant 1h a 80°C
- Dispenseu 100µl de RNAsa (100µg/ml) i cobriu amb un vidre, deixar a 37°C en cambra humida durant 15'.
- 2 banys de 5' en 2xSSC en agitació (T^a ambient)
- 5' pepsina (5µl de pepsina a 100mg/ml en 50ml HCL 10mM) a 37°C bany agitació

Nota: en els tractaments enzimàtics es molt important respectar els temps

- Renteu 5' en PBS 1X (ph=7) a T^a Ambient i en agitació
- Renteu 5' en la solució 2 a T^a Ambient i en agitació
- Renteu 10' en la solució 3 a T^a Ambient i en agitació
- Renteu 5' en PBS 1X (ph=7) a T^a Ambient i en agitació
- Deshidratació: 3' 70% etanol
3' 85% etanol
3' 100% etanol

Deixeu assecar els portaobjectes, abans d'aplicar la sonda.

Preparació de les solucions

HCL

Prepareu la solució mare a 50mM (500ml)

2,15 ml de ClH 37%
498 ml H₂O destil·lada

- Feu una dilució a 10mM (500ml)

PEPSINA

100mg/ml

Prepareu 1ml i feu alíquotes de 20µl ja que no es pot congelar i descongelar moltes vegades.

SOLUCIÓ 2

PBS/50mM MgCl₂ (50ml)

2,5 ml MgCl₂ 1M
PBS fins a 50ml

SOLUCIÓ 3

Formaldehid 1% en PBS/50mM MgCl₂ (50mM)

2,5 ml 1M MgCl₂
1,75 ml Formaldehid
PBS fins a 50ml

4. Hibridació

- Poseu en marxa el Hybrite i seleccioneu el programa que ens manté la placa a 42 °C.
- Humitegeu el paper dels costats del Hybrite, per tal de mantenir la zona humida durant la hibridació.
- Poseu els portaobjectes i la barreja amb la sonda al Hybrite.
- Tanqueu la tapa del Hybrite i el poseu en marxa :
 - programa per les sondes comercials (2' a 73°C i 16-24h a 37°C)
 - programa per les sondes fetes a partir de BACs (1' a 64°C i 16-24h a 37°C)
- Deixeu hibridant un mínim de 14-16h.

5. Rentats post-hibridació

- 2 minuts amb 0,4xSSC/0,3% NP-40 a 73°C en agitació. Prèviament s'ha col·locat la cubeta amb la solució al bany a 73°C 30 minuts, perquè estigui ben temperada, abans de posar les nostres preparacions.
- 1 minut amb 2xSSC/0.1% NP-40 a T^a ambient en agitació.
- 2 minuts amb cadascun dels etanols, 70%, 85%, 100% per deshidratar.
- Deixeu assecar a les fosques.
- Poseu 40µl de Dapi.

Preparació de solucions de rentat

0,4xSSC /0,3% NP-40 (1l)

20ml 20XSSC

3ml NP-40

Ajusteu el volum fins a 1l amb H₂O destil·lada

Ajusteu el PH a 7

2xSSC / 0,1% NP-40 (1l)

100ml 20xSSC

1ml NP-40

Ajusteu fins a 1l. amb H₂O destil·lada

Ajusteu el PH a 7

criteris d'anàlisi dels resultats

Mitjançant la sonda "*DiGeorge Region Probe - LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/TelVysion 22q SpectrumGreen*" comercialitzada per Abbott Molecular.

En l'anàlisi de FISH en metafases es considerarà deleció quan s'observin els senyals verds terminals corresponents als dos cromosomes 22 i en un d'ells no hi hagi el senyal vermell de la regió 22q11.2. Es considerarà no valorable aquella metafase on els cromosomes 22 es trobin cavalcats, les que siguin incompletes i aquelles cèl·lules on no s'observin els senyals verds de la regió terminal dels dos cromosomes 22, o cap senyal vermell.

En l'anàlisi dels nuclis el nombre de senyals observades serà anotat en un full de treball a partir de la qual es farà després la següent valoració:

- Nuclis amb dos senyals: Es considerarà un nucli normal quan s'hi observin 2 o 4 senyals d'hibridació per cada sonda.
- Nuclis amb un senyal: Per considerar un cas amb la deleció s'hi han d'observar els dos o quatre senyals verds dels dos cromosomes 22 i un sol senyal vermell o dos molt propers corresponents que correspondrien al mateix cromosoma.

- Nuclis amb tres senyals: Es considerarà un cas amb duplicació quan hi hagi tres senyals vermells de la mateixa intensitat i dos senyals verds.

Nuclis no valorables: Es considerarà a un nucli no valorable quan no es vegi cap senyal verd o cap vermell, i també quan presenti un sol senyal de cada fluorocrom. Els nuclis on s'hi observin múltiples senyals (+ de 4) també seran considerats com a no valorables.

Per últim hi ha aquells nuclis que mostren dos o quatre senyals vermells, però que en canvi només s'hi veu un senyal verd de la sonda control. Tot i que es considerarà aquests nuclis com a no valorables, cal tenir present que podrien estar reflectint una deleció terminal en el cromosoma 22 (regió 22q13).

OBTENCIÓ DE SONDES PER FISH A PARTIR DE BACs

Sembra de les colònies bacterianes en medi líquid

- Trèieu el tub amb el glicerol del BAC del -80°C i el poseu en una caixa amb neu carbònica que us emporteu a sota la campana.
- Poseu 5 ml de medi LB o 2x TY en un tub de vidre o en un tub de plàstic estèril i 5 µl de cloranfenicol i afegiu 5 µl. d'antibiòtic (estan a concentració 1000x), esterilitzeu el coll i el tap del tub amb la flama.
- Agafeu una mica de material congelat (glicerol del BAC) amb una punta de plàstic i la llenceu sencera dins el tub.
- Deixeu créixer o/n (unes 16h) al shaker a 225-300 rpm i a 37°C

Aïllament de DNA a partir de BACs (Bacterial Artificial Chromosome)

Aquest es un mètode miniprep, alcalí, ràpid per aïllar molt DNA a partir de clons PAC o BACs. És una modificació del mètode estàndard de Qiagen que utilitza extraccions no orgàniques o columnes.

El mètode és molt bo per fer digestions de restricció de clons PAC i pot ser augmentat si es necessari. Amb lleugeres alteracions, aquests protocol pot també ser utilitzat per anàlisis rutinaris de M13 RF, DNA plasmidi i cosmidi.

Solucions que utilitzarem

P1 (Reactiu comercial Qiagen, 4°C)

15mM Tris, pH8
10mM EDTA
100µg/ml Rnase A

P2 (esterilitzat per filtració, temperatura ambient)

0.2N NaOH per 30ml : -1.2ml NaOH 5N
1% SDS - 2.14ml SDS 14%
 - 26.7ml H₂O

P3 (Reactiu comercial Qiagen, temperatura ambient)

3M KOAc, pH5.5

Mètode

1. Quan trèieu els tubs del *shaker* heu de veure el medi tèrbol, si és així voldrà dir que ha crescut la colònia que hem inoculat. Poseu el contingut del tub en dos tubs eppendorf i centrifugueu a 13000 rpm durant 5 minuts.

La temperatura de la centrifugació no es important en aquest pas.

2. Descarteu el sobrenedant, deixar una mica de sobrenadant per tal de poder resuspendre el *pellet* (vòrtex).

Poseu 0.3 ml de solució **P1** i fer vòrtex. Un cop ben barrejat afegir 0.3 ml de solució **P2** i agitar suaument per barrejar el contingut. Deixeu a temperatura ambient 5´o més. La suspensió pot canviar de molt tèrbola a quasi transparent.

3. Poc a poc afegiu 0.3ml de solució **P3** i agiteu suaument mentre ho poseu. Es formarà un precipitat blanquinós de proteïna i DNA de E. Coli. Després d'afegir la solució P3 poseu els tubs en gel al menys 5'.
4. Centrifugueu 3´ a 13000 rpm i elimineu el pellet o grumolls blancs amb un escuradents (això es opcional), també es pot centrifugar uns 7´ a les mateixes revolucions i treure el sobrenadant (si es fa l'últim, ho farem dues vegades i procurarem no agafar pellet blanc).
5. 1:1 en fenol /cloroform, agitar suaument i 5´ a temp. Ambient.
6. Centrifugueu 2´ a 13000 rpm i trèieu la fase aquosa o sigui la de damunt de tot.
7. Hi poseu 2.5 volums de EtOH absolut fred i 20´ en gel (en aquest pas, podeu deixar la mostra al congelador, i continuar més tard amb el protocol).
8. Centrifugar uns 15´ a 13000rpm i 4°C.
9. Traieu el sobrenadant i afegiu 500µl de EtOH 70%. Invertiu els tub varies vegades per rentar el pellet de DNA.
10. Centrifugar 5´ a 13000 rpms i 4°C.
11. Trèieu el sobrenadant tant com sigui possible, anant en compte de no perdre el pellet.
12. Assequeu el pellet a 37°C uns 10´ ó més (fins que no quedi gens d'etanol).
13. Un cop sec resuspeneu el pellet en 40 µl o menys de TE (si els pellet és molt petit) i deixar-ho reconstituir unes hores a TA.

Medi 2xYT

Preparació	1000ml
Tryptona	16g
Yeast extract	10g
NaCl	5g

Ajusteu al volum final amb aigua MilliQ autoclavada.

Afegiu, posteriorment, l'antibiòtic desitjat.

*Cloranfenicol (20mg/ml) afegir a un litre de medi 1 ml d'antibiòtic.

Per la congelació de BACs

Preparar :

Glycerol solution

- 65% glycerol (vol/vol)
- 0,1M MgSO₄
- 0,025M Tris-Cl, pH 8

- Poseu en un tub NUNC de 1,8 ml. 1 ml. de Glycerol solution i 1 ml. del cultiu de bacteris (ho tindrem a un 32% de Glycerol)

Nosaltres normalment utilitzem Glycerol 87% i llavors posem 200 µl. de Glycerol + 800 µl. de bacteris (ho tindrem a un 17%) i ho guardem a -80°C

Marcatge directe de BACs per FISH

Vysis, Inc. (protocol per CGH)

El kit del marcatge conté:

Reactiu	Volum	Composició	conservació
Nick translation enzim	525 µl.	DNA polymerase I, DNase I in 50% glycerol, 50 mM Tris-HCL pH7,2, 10 mM MgSO ₄ , 0,1 mM DTT, 0,5 mg/ml nuclease-free BSA	-20°C
10x NT buffer	300 µl.	500 mM Tris-HCL pH7,2, 100 mM MgSO ₄ , 1 mM DTT	-20°C
dTTP	200 µl.	0,3 mM dTTP	-20°C
dCTP	200 µl.	0,3 mM dCTP	-20°C
dATP	200 µl.	0,3 mM dATP	-20°C
dGTP	200 µl.	0,3 mM dGTP	-20°C
Nuclease-free water	1,5 ml.		-20°C
Control DNA (MPE 600) unlabeled	15 µl.	0,2 µg/µl DNA, isolated from tumor cell line MPE 600	-20°C
SpectrumGreen Control DNA (MPE 600)	5 µl.	0,3 µg/µl DNA, isolated from tumor cell line MPE 600, direct-labeled with SpectrumGreen	-20°C

Nota: Els reactius (no el DNA) es poden guardar a -70°C si s'utilitzen sols 1 ó 2 vegades al mes

Altres reactius que es necessiten i no estan inclosos en el Kit:

SpectrumOrange dUTP 50nmol

SpectrumGreen dUTP 50nmol

Venen liofilitzats i s'han de reconstituir amb 50 µl de H₂O per tenir una concentració 1 mM (la preparació reconstituïda és estable durant 3 mesos, a -20°C. S'ha d'evitar congelar i descongelar repetidament).

Els fluorocroms son fotosensibles. Per evitar la seva degradació protegir de la llum.

Preparació dels reactius

0,2 mM SpectrumGreen o SpectrumRed dUTP

10 µl de 1 mM dUTP + 40 µl. de nuclease-free water

0,1 mM dTTP

10 µl de 0,3 mM dTTP + 20 µl. de nuclease-free water

0,1 mM dNTP mix

Barregeu posant-hi 10 µl de cadascun 0,3 mM dATP, dCTP, dGTP

Procediment

1. Poseu un tub en gel i el deixeu refredar uns minuts.
2. Afegiu per ordre:
 - x µl nuclease-free water
 - x µl per 1 µg de DNA, (últimament i posem uns 5 µl.)
 - 2,5 µl. 0,2 mM SpectrumGreen ó SpectrumOrange dUTP
 - 5 µl. 0,1 mM dTTP
 - 10 µl. dNTP mix
 - 5 µl. 10x Nick translation buffer
 - 15 µl. Nick translation enzyme
 Vf = 50 µl.
3. Feu un petit vòrtex.
4. Incubeu 2h a 15°C.
5. Pareu la reacció posant el tub a 70°C durant 10´
6. Poseu el tub a -20°C un mínim de 15 min.
7. En un gel al 2% d'agarosa carregueu 9 µl de la reacció. Perquè el blau no interfereixi amb els fragments de les sondes, deixeu que corri més de mig gel.
8. Els fragments han d'estar entre 200 – 600 bp.
9. Filtreu la sonda amb columnes de shefadex Autoseq G-50 Dye terminator Removal Kit, illustra™ i centrifugueu a 2000g 1 minut. Utilitzarem dues columnes per cada sonda (ja que el volum màxim que es pot filtrar a cada columna es 25 µl i nosaltres tenim el doble).
10. Precipitació:
 - H₂O fins a 100 µl.
 - Cot1-DNA 3 µl.
 - SS (esperma de salmó)-DNA 2 µl.
 - Sonda el volum que tinguem, uns 41 µl.
 - NaCl 1M 10 µl.
 - Afegiu 2 volums d'etanol absolut, 200 µl., barrejar molt bé i posar a -20°C un mínim de 20´ ó millor tota la nit.
 - Centrifugueu a 13000 rpms durant 20´ a 4°C.
 - Decanteu i afegiu 1 ml d'etanol 70%, barregeu bé.
 - Centrifugueu a 13000 rpms durant 10´ a 4°C.
 - Decanteu l'etanol i assequeu a 37°C uns 10´ ó més, per tal d'eliminar l'excés d'etanol.
 - Afegiu formamida desionitzada 10 µl., barregeu bé, centrifugueu i ho poseu al Thermomixer a 65°C 5´.
 - Torneu a centrifugar, afegiu dextrà-sulfat/12xSSC 10 µl., barregeu, centrifugueu i al Thermomixer 65°C 5´.

TÈCNICA DE MLPA "Multiplex ligation-dependent probe amplification"

1. Preparació dels reactius

- Prepareu la barreja (mix) de sondes
- Els oligonucleòtids (oligont) es resuspenen en TE (Tris-HCl 10 mM :1 mM EDTA) pH 8,2. Concentració stock: 50 o 100 μ M. Aquest stock es guarda a -20° C. (μ M= μ mol/ μ L).
- Feu alíquotes dels oligont a una concentració 1 μ M. Guardeu aquest stock a -20° C.

- Barreja d'oligont per un assaig de MLPA

- Volum final PROBEMIX: 200 μ L (utilitzar TE); es posa 0,8 μ L de cada oligont a 1 μ M.
- Quantitat de cada oligont/probemix
 $0,8 \mu\text{L} \times 1\mu\text{M} = 0,8 \text{ pmol}$
Concentració de cada oligont en la probemix:
 $0,8 \text{ pmol}/200\mu\text{L} = 0,004 \text{ pmol}/\mu\text{L} = 4 \text{ fmol}/\text{L} = 4 \text{ fM}$
(Per una reacció de MLPA s'afegirà 1,5 μ L d'aquesta PROBEMIX)

- Reactius kit "salsa MLPA reagents" de MRC-Holland

1. Ligase-65 1 x 500 μ L. (Tap marró)
2. SALSA MLPA buffer 3 x 225 μ L. (Tap groc)
3. Ligase-65 buffer A 2 x 1 ml. (Tap transparent)
4. Ligase-65 buffer B 2 x 1 ml. (Tap blanc)
4. 10x SALSA PCR buffer 4 x 750 μ L. (Tap vermell)

Es recomana fer alíquotes del buffer Ligase-65 A, ja que la descongelació-congelació repetida destrueix el cofactor NAD. El número màxim de cicles descongelació-congelació que resisteix es de 15.

- Stocks de reactius de PCR

Primers MLPA-F i MLPA-R a 10 μ M
dNTPs 100 mM
Tampó/buffer Taq PCR
Taq (5 u/ μ L)

- Prepareu en un tub "PCR primers-dNTP mix":
Barregeu: 1 μ L primer MLPA-F + 1 μ L primer MLPA-R + 0,5 μ L dNTPs
(10 pmoles de cada primer + 50 nmoles de dNTPs)

2. Hibridació i lligació

Notes: - Es essencial utilitzar un termociclador amb la tapa pre-calentada (105° C). Es recomana utilitzar tubs de PCR de 0,2 ml o plaques.

(UNA BARREJA INCOMPLETA DE LES SOLUCIONS D'ENZIMS AMB GLICEROL (50 % VISCOS) AMB ELS BUFFERS DE DILUCIÓ ÉS UNA DE LES MAJORS FONTS D'ERROR).

- Desnaturalització del DNA i hibridació de les sondes

- Diluïu la mostra de DNA (20-500 ng DNA) amb TE, volum final DNA+TE=5 µl.

Es recomana utilitzar aproximadament 100 ng de DNA humà. El DNA s'ha de dissoldre en aigua o TE (10 mM Tris-HCL pH 8,2; 1 mM EDTA). La concentració d'EDTA en la mostra de DNA no ha de ser superior a 1 mM i el volum no ha d'excedir 5 µl. El volum de la reacció és important per la velocitat d'hibridació que és depenent de la sonda i la concentració de sal. A més a més, la T_m d'hibridació de la sonda amb la seva diana, també depèn de la concentració salina.

- Incubeu el DNA: 5' a 98°C; refredeu a 25°C abans d'obrir el termociclador.

- Amb la pausa a 25° C: Afegiu 1,5 µL de PROBEMIX + 1,5 µl de MLPA buffer (tapa groga). Barregeu amb la mateixa pipeta suaument amunt i avall.

El PROBEMIX i el tampó de MLPA poden ser prèviament barrejats a temperatura ambient amb la pipeta. El buffer de MLPA es viscos i no es barreja fàcilment. No centrifugar aquesta barreja perquè les sondes més llargues poden precipitar.

- Incubeu 1 minuto a 95°C, a continuació incubeu 16 hores a 60°C.

3. Reacció de lligació

- Reduïu la temperatura del termociclador a 54°C. Mantenint la temperatura a 54°C, afegiu 32 µL de MIX LIGASE-65 a cada mostra i barregeu.

MIX LIGASE-65

(realitzeu al moment d'utilitzar i manteniu en gel)

3 µL LIGASE-65 BUFFER A (tap transparent)

3 µL LIGASE-65 BUFFER B (tap blanc)

25 µL H₂O. Barregeu vòrtex

Afegiu 1 µL Ligase-65 (tap marró). Barregeu de nou.

Incubeu 15' a 54°C, a continuació incubeu 5 ' a 98°C per desactivar la ligasa.

Les mostres es poden emmagatzemar fins una setmana a 4°C. Per períodes més llargs, es recomana de conservar-les a -20°C.

4. Reacció de PCR

Notes: No utilitzeu en la tècnica de PCR, micro-pipetes que s'hagin utilitzat per manipular productes de PCR o lligació resultants de MLPA!! Després de la PCR, els tubs no s'han d'obrir en las proximitats del termociclador.

1. Barregeu:

2 µL 10XSALSA PCR buffer (tap vermell)

13 µL H₂O

Amb els tubs en gel afegiu 15 µL d'aquesta barreja a cada tub.

2. Amb els tubs en gel: Afegiu 5 µL de MIX POLYMERASE a cada tub i barregeu la reacció de PCR.

MIX POLYMERASE-FAM

1 µl PCR-primers-dNTP mix (tap púrpura)
1 µl Enzyme Dilution búffer (tap blau)
0,5 µl Taq Polymerase (2,5 U) (tap taronja)
2,5 µl H₂O

(Concentracions finals en el tub de reacció: 200 nM de cada primer, 1 mM de dNTPs)

MIX POLYMERASE (VIC o NED)

1 µl PCR-primers
0,25 µl dNTP mix
1 µl Enzyme Dilution búffer
0,4 µl Taq Polymerase (2,5 U)
2,35 µl H₂O

(Concentracions finals en el tub de reacció: 200 nM de cada primer, 1 mM de dNTPs)

3. Afegiu 5 µL de la lligació a la barreja del pas 1) + la Mix Polymerase. Tindreu un volum final de reacció de PCR de 25 µl.

- Programa de PCR: 30 segons 95°C; 30 segons 60°C; 60 segons 72°C i 31-35 CICLES. Acabar amb 20 minuts d'incubació a 72°C. Temperatura final de 4-15°C.

5. Separació/quantificació relativa dels productes de PCR en electroforèsi

La quantitat de volum de la reacció de PCR de MLPA requerida per l'anàlisi per electroforesi capil·lar depèn de l'aparell i el marcador fluorescent utilitzat.

ABI-3100 (16 capil·lars) i ABI 3100 Avant (4 capil·lars) → PCR realitzada amb FAM PCR primer-dNTP mix:

- Després de la reacció de PCR, barregeu:

1 µl de la reacció de PCR
0,5 µl de l'estàndard intern de llargada, marcador ROX (ROX-500 Genescan,
ref:ABI401734)

8.5 µl formamida desionitzada (ABI ref:4311320)

Condicions de l'electroforesi:

Capil·lars: 36 cm. Polímer: POP-4 o POP-6. Temperatura execució 60°C. Volum d'emplanament del capil·lar: 184 passos. Voltatge pre-execució: 15 kV. Temps pre-execució: 180 seg. Voltatge d'injecció: 3,0 kV. Temps d'injecció: 10-30 seg. Voltatge execució: 15 kV. Temps de demora: 1 seg. Temps execució: 1500 seg.

Hibridació amb *array* de BACs

Hibridació d'*array*-CGH amb sulfat de dextrà

1. Marcatge de DNA genòmic amb dCTP-Cy3 i Cy5 per random priming.

Procediment:

Protocol del kit Bioprime (Invitrogen) modificat per aCGH (Pinkel, Fiegler...).

1) Per cada mostra de DNA genòmic prepareu un tub de 0,2 ml per PCR on barregeu:

- 300 – 400 ng de DNA genòmic
- 20 µl de 2,5x Primer Mix del kit
- Ajustem el volum fins 42 µl amb aigua mQ autoclavada

2) Deixeu 10 min a 99°C al termociclador. Feu un spin i deixeu els tubs en gel.

3) Al tub afegiu:

	1 reacció (µL)
10x dCTPmix*	5
Cy5 o Cy3 dCTP (1.0mM)	2
Exo Klenow	1
Volumen final	8

* 10x dNTP mix (dATP, dTTP i dGTP a 2 mM, dCTP a 1,2 mM)

4) Deixeu tota la nit a 37° (~ 18 hores).

5) Al dia següent, netegeu les mostres de nucleòtids no incorporats amb el kit de neteja d'Invitrogen, cadascuna per separat.

6) Mesureu l'absorbància de les mostres a 532 i 650 amb el NanoDrop per determinar la quantitat de fluorocrom incorporat. Passeu el Control de Qualitat (CQ) Servei de Microarrays del CRG.

7) Si les mostres han passat el CQ es segueix el protocol d'hibridació del xip.

2. Hibridació de microarrays de CGH amb sulfat de dextrà.

Procediment: Es segueix el protocol de NJ Wang i cols. (2004). American Journal of Human Genetics, 75 (2), 267-281.

- Teniu preparades les sondes de DNA genòmic marcades amb dCTP-Cy3/5.

2.1 Precipitació de les sondes:

• Precipiteu les sondes amb 100 µg de Cot-1 en la següent barreja de reacció:

mostra marcada amb Cy3	50	100
mostra marcada amb Cy5	50	100
Cot-1 (100 µg)	100	100
NaAC 3M, pH 5.2	20	30
etanol 100 % fred	500	750

• Barregeu els tubs per inversió i deixeu 1 h (mínim) a -20°C.

• Centrifugueu les barreges de reacció: 30 min, 13200 rpm, a 4°C.

• Traieu el sobrenedant i assequeu el pellet a l'aire (sota la campana i tapats de la llum amb paper d'alumini).

2.2 Hibridacions:

Prepareu 5 o 10 ml de solució d'hibridació durant la precipitació de les sondes. Es prepara la barreja i s'afegeix el sulfat de dextrà al final. Deixeu la solució a 42°-45° fins que es dissolgui. Filtrem amb una membrana de 0.22 µm de por (millor en calent).

	[Final]	10 ml	5 ml
Formamida	50%	5 ml	2.5 ml
20xSSC	2x	1 ml	0.5 ml
Sulfat de dextrà	10%	1g	0.5 g
Denhard's solution 50x	1x	200 µl	100 µl
EDTA 0.5M pH 8.0	0.5 mM	10 µl	5 µl
NaPhosphate pH 7.0 0.1M	40 mM	3.79 ml	1.895 ml

- Ressuspeneu els pellets en 23 µl de solució d'hibridació (cubre 22x22) o **70 µl per cubres de 24x60** (80 µl per sandwich).
- Feu un spin.
- Deixem: - 20 min a 72°C
- 2 h a 45°C

2.3 Bloqueig dels portes (arrays):

Durant les 2 h d'incubació a 45°C bloquegeu els arrays (prèviament preescanejats).
Protocol del Grup del Dr. Lauro Sumoy (CRG).

Preparació de la solució de bloqueig:

- 1) Prepareu 250 ml de solució amb BSA al 1%, 6xSSC, 0.5% SDS en aigua mQ.

20xSSC	75 ml
10% SDS	12.5 ml
BSA (98% pols)	2.5 g
aigua mQ	162.5

- 2) Filtreu la solució per filtres de 0,22 µm de por.
 - 3) Poseu la solució en una cubeta de rentats i pre-escalfem a 42°.
 - 4) Afegiu 12 arrays com a màxim i deixem 1h a 42°, amb agitació.
 - 5) Realitzeu 4 rentats amb aigua mQ amb els cistells. Sucant unes 20 vegades dins la cubeta.
 - 6) Centrifugueu 5 min a 1500 rpm a RT per assecar-los.
- Opcionalment (ex: arrays 32K d'Holanda,...) es pot afegir un pas de desnaturalització dels spots.
- 7) Submergiu els arrays en aigua bullint i els deixeu durant 2 minuts. 1 litre d'aigua en un vas de precipitats de 2L que escalfeu entre 10-12 min al microones.
 - 8) Centrifugueu 5 min a 1500 rpm a RT per assecar-los.

2.3 Muntatge de les hibridacions:

- Feu un spin de les mostres que heu tret de la incubació de 45°C.
- Afegim els 23 µl sobre un cubre (Hybrislip 22x22mm o cubre de vidre 24x24mm) o els 70 µl sobre el cubre de 24x60 i poseu el xip a sobre en la zona on hi ha els spots.
- Poseu el xip dins d'una cambra de Corning i afegiu 20 µl d'aigua mQ a cada pouet.
- Tanqueu les cambres i les deixeu 40 h a 45°C en un forn d'hibridació.

2.3 Rentats:

- Feu els següents rentats:
 - 1x amb 50% formamida, 2xSSC i 0.1% SDS durant 20 min, a 45°C amb shaking
 - 2x amb 0.2x SSC, 10 min, RT i shaking
 - 1x amb H₂O milliQ, 10 min, RT, shaking
- Centrifugueu a 1500 rpm, 5 min, RT.
- Escanegeu i quantifiqueu el xip.