

**MUTACIONES BIALÉLICAS EN *HERC1* EN UNA FORMA SINDRÓMICA DE
SOBRECRECIMIENTO Y RETARDO MENTAL**

MARIA ALEJANDRA PALMA MONTERO

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C. DICIEMBRE DEL 2017**

**MUTACIONES BIALÉLICAS EN *HERC1* EN UNA FORMA SINDRÓMICA DE
SOBRECRECIMIENTO Y RETARDO MENTAL**

MARIA ALEJANDRA PALMA MONTERO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

CO-DIRECTOR

CARLOS MARTIN RESTREPO MD, MSc, PhD

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C. DICIEMBRE DEL 2017**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá D. C. Diciembre del 2017

Agradecimientos

A Dios por hacer de mi camino de vida el indicado.

A mis padres, por ser la base de mi formación como ser humano y por su ayuda constante ante cualquier circunstancia.

A mis hermanas, por ser mi compañía en la vida y llenarme de cariño.

A mi esposo por su amor incondicional.

Al Dr. Paul Laissue y la Dr. Carlos Restrepo por entregarme su experiencia y conocimiento para crecer intelectualmente durante la elaboración de esta tesis

A mis compañeros de maestría, por ayudarme en la búsqueda de la excelencia.

A la Universidad del Rosario por la oportunidad de desarrollar el trabajo de investigación.

1. CONTENIDO

2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. MARCO TERORICO.....	10
4.1 CLASIFICACIÓN CLINICA, DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES DE SOBRECRECIMIENTO	10
4.1.1 SÍNDROME BECKWITH-WIEDEMANN (SBW).....	11
4.1.2 SÍNDROME DE SOTOS.....	15
4.1.3 SÍNDROME DE WEAVER	17
4.1.4 ESPECTRO PROS	20
4.1.5. SINDROME DEL X FRAGIL	24
4.2 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN.....	30
4.2.1 Preparación de la librería	30
4.2.1.2 Secuenciación.....	32
4.3 FAMILIA DE LAS PROTEINAS HERC	35
4.3.1 Dominios estructurales	35
4.3.2 HERC1	37
4.3.2 HERC2	39
4.3.3 HERC3	40
4.3.4 HERC4	41
4.3.5 HERC5	42
4.3.6 HERC6	43
5. PREGUNTA CIENTIFICA.....	44
6.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	44
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	44
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	44
7.MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
7.1 Pacientes estudiados.....	45
7.1.1 Extracción de ADN.....	48
7.1.2 Secuenciación de exoma.....	48
7.1.3 Algoritmo de selección de variantes candidatas.....	49
7.1.4 Secuenciación de Sanger.....	50

7.1.5 Diseño de primers	51
7.1.6 Amplificación del ADN.....	52
7.1.7 Análisis in silico.....	55
8.RESULTADOS	56
8.1 NGS.....	56
8.2 Fenotipo de los pacientes	61
9. DISCUSIÓN.....	63
11.PERSPECTIVAS	67
12.ANEXOS	68
12.1 Anexo 1.....	68
12.2 Anexo 2.....	68
12.3 Anexo 3.....	69
13.BIBLIOGRAFÍA.....	70

2. RESUMEN

Los síndromes de sobrecrecimiento comprenden un grupo diverso de condiciones con características genéticas únicas, clínicas, conductuales y moleculares. Existe una superposición considerable en la presentación clínica de estos casos, lo que hace difícil identificarlos.

Estudiamos clínica y molecularmente dos hermanos colombianos afectados por sobrecrecimiento, discapacidad intelectual y dismorfia facial. Se empleó la secuenciación de siguiente generación (NGS) y secuenciación de Sanger para la búsqueda de mutaciones potencialmente causales. Se identificaron dos variantes heterocigotas compuestas en el gen *HERC1*: c.2625G>A (p.Trp875Ter) y c.13559G>A (p.Gly4520Glu). Estas mutaciones sugieren una relación etiológica con la enfermedad. Estos resultados proporcionan datos útiles para futuras correlaciones genotipo-fenotipo y estudios moleculares de pacientes con sobrecrecimiento.

3. INTRODUCCIÓN

Los síndromes de sobrecrecimiento comprenden un grupo heterogéneo de trastornos que conllevan a la proliferación de tejido caracterizándose por un fenotipo de crecimiento somático y visceral excesivos. Las características clínicas principales son el peso, la talla y el perímetro cefálico mayor de 2-3 desviaciones estándar (DE) por encima de la media para el género y la edad. Además, se observa déficit cognitivo y un incremento en el riesgo de presentar neoplasias. El sobrecrecimiento puede presentarse de manera localizada o difusa y se observa en el periodo prenatal o postnatal. El progreso en la identificación de las causas genéticas del sobrecrecimiento ha permitido conocer las manifestaciones clínicas, proponer algunas correlaciones genotipo-fenotipo y conocer algunos de los mecanismos fisiopatológicos.

El sobrecrecimiento puede ser el resultado de los siguientes procesos principales: Incremento del número de células o hiperplasia, hipertrofia, incremento del intersticio, fundamentalmente el líquido intersticial, combinación de los factores anteriores (Visser et al.,2009)

4. MARCO TERÓRICO

4.1 CLASIFICACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES DE SOBRECRECIMIENTO

Varias clasificaciones se han propuesto en un intento de facilitar el diagnóstico de estas patologías; sin embargo, manifestaciones clínicas superpuestas han dificultado este ejercicio. Neylon et al., propusieron una clasificación de estas patologías ordenándolas según el momento de la presentación clínica en: (a) síndromes de sobrecrecimiento en el período neonatal, (como los síndromes Beckwith-Wiedemann (SBW), Sotos, Weaver y Perlman) y (b) los síndromes de sobrecrecimiento postnatales como los síndromes Klinefelter o Proteus. Otra clasificación propuesta por Rimoin et al., divide el sobrecrecimiento en formas no patológicas y patológicas, siendo la no patológica una variante familiar normal. La forma patológica se divide, a su vez en prenatal y posnatal (cada una puede ser además primaria y secundaria) (Graham et al., 2013).

En el tipo prenatal primario se han descrito patologías como el SBW, el síndrome Sotos, el síndrome Weaver, el síndrome Bannayan-Riley-Ruvacaba, el síndrome Simpson-Golabi-Behmel, el síndrome Elejalde, el síndrome Nevo Basal Celular, el síndrome Marshall-Smith y el síndrome Proteus, entre otros. Las formas patológicas secundarias son debidas a macrosómia diabética y a nesidioblastosis, las cuales son patologías propias del embarazo y de la madre.

Por otra parte, el tipo postnatal de sobrecrecimiento se clasifica en primario y secundario, siendo las causas primarias las aneuploidías como los síndromes 47,XYY y 47,XXY, además, el síndrome X Frágil y el síndrome Marfan. Las formas secundarias incluyen patologías endocrinológicas como la pubertad precoz, la acromegalia, el gigantismo y el hipertiroidismo (Graham et al., 2013)(Cohen, 1998).

Dentro de las causas moleculares de los síndromes de sobrecrecimiento se han asociado los siguientes mecanismos moleculares: A) Modificaciones epigenéticas que desregulan los genes relacionados con el crecimiento celular. B) Metilación e hipo-metilación de histonas que con llevan a la expresión o el silenciamiento de genes relacionados con el crecimiento tisular y C) Modificaciones de la vía de señalización de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), crucial en numerosos aspectos celulares involucrados con el crecimiento y la supervivencia celular (Wit et al ., 2015).

El diagnóstico clínico de los síndromes de sobrecrecimiento es complejo, debido a que algunos signos clínicos se sobrelapan entre las diferentes enfermedades de sobrecrecimiento, por lo cual, se deben tener en cuenta los criterios clínicos, los hallazgos en imágenes diagnósticas y los estudios moleculares que pueden contribuir a diferenciar las entidades clínicas y establecer el diagnóstico definitivo.

4.1.1 SÍNDROME BECKWITH-WIEDEMANN (SBW)

El SBW es una patología autosómica dominante, con una incidencia estimada de 1:13.700 nacimientos (Gardiner et al., 2012). Se caracteriza por sobrecrecimiento prenatal y postnatal: *in útero* ecográficamente se evidencian polihidramnios y aumento del tamaño de la corteza adrenal fetal; al nacer los afectados presentan hipoglicemia, macrosomía con macroglosia y hemihipertrofia corporal, defectos de la pared abdominal como el onfalocele y las visceromegalias (de uno o más órganos intra-abdominales como el hígado, el bazo, el riñón, la glándula adrenal y el páncreas), tumores embrionarios (Tumor de Wilms, hepatoblastoma, neuroblastoma, rabdomyosarcoma), anomalías renales (incluyendo anormalidades estructurales), nefromegalia y nefrocalcinosis. A nivel cardiovascular se presentan cardiomegalia y

miocardiopatía y pueden tener antecedentes familiares de uno o más miembros de la familia con diagnóstico de SBW o con una historia sugestiva de SBW (Gardiner et al., 2012).

En el SBW, mutaciones localizadas en la región 11p15.5, intervienen con la impronta genómica, que se define como un proceso epigenético mediante el cual un alelo es heredado diferencialmente de un progenitor. Algunos genes son transcritos por sólo uno de los alelos parentales, es decir, tienen expresión mono-alélica en ciertos tejidos y/o etapas del desarrollo. El SBW está asociado con la regulación anormal de la transcripción de un dominio improntado en el cromosoma 11p15.5 (también conocida como la región crítica SBW). La región crítica de SBW incluye dos dominios: el dominio 1, donde se encuentra el centro 1 de impronta (IC1) que regula la expresión de los genes *IGF2* y *H19*; y el dominio 2, donde se encuentra el centro de impronta 2 (IC2) que regula la expresión de los genes *CDKN1C*, *KCNQ10T1* y *KCNQ1* (Hark et al., 2000).

Dentro de las funciones de estos genes, el gen *IGF2*, codifica para el factor de crecimiento tipo insulina que actúa como un factor de crecimiento fetal. El gen *H19* codifica para un ARN improntado de expresión exclusiva materna. Normalmente el ARNm del gen *H19* es únicamente transcrito por el alelo materno y actúa inhibiendo a un potenciador de la transcripción (*enhancer*) del gen *IGF2*. Al estar activo el gen *H19* se inhibe la expresión del gen *IGF2* en el alelo materno de forma indirecta, pero queda activo el alelo paterno (Sparago et al., 2004).

El gen *CDKN1C* también sufre regulaciones a través de los genes *KCNQ10T1* y *KCNQ1*. El dominio IC2 contiene varios genes improntados incluyendo *CDKN1C*, *KCNQ1*, y *KCNQ10T1*. El centro de impronta contiene el promotor para *KCNQ10T1*, un transcrito

no codificante que regula en *cis* la expresión de genes improntados. IC2 está usualmente metilado en el cromosoma materno y no metilado en el cromosoma paterno. Así, *CDKN1C* y *KCNQ1* están expresados desde el alelo materno y *KCNQ1OT1* desde el alelo paterno (Pandey et al., 2008).

En más del 80% de los individuos con SBW, las pruebas genéticas permiten detectar una de cinco alteraciones que confirman el diagnóstico (Sparago et al., 2004): 1. Pérdida de la metilación de IC2 en el cromosoma materno en un 50% 2. Disomía uniparental paterna de 11p15.5 en el 20% 3. Ganancia de metilación de IC1 en el cromosoma materno en un 5%, 4. Mutación en el alelo materno del gen *CDKN1C* en el 5% y 5. Duplicación, inversión o translocación, que involucran la banda p15.5 del cromosoma 11 en menos del 1%. La metilación diferencial de IC1 y IC2 se asocia con la expresión de genes específicos de alelos maternos y paternos en individuos no afectados (Weksberg et al., 2001).

En el SBW los criterios diagnósticos se dividen en mayores y menores.

Criterios mayores:

- Antecedentes familiares positivos (uno o más miembros de la familia con un diagnóstico clínico de SBW o antecedentes o características que sugieran SBW).
- Macrosomía (tradicionalmente definida como la altura y el peso mayor al percentil 97 o > al percentil 97).
- Pliegues lineales en el lóbulo de la oreja.
- Macroglosia.
- Onfalocele.

- Visceromegalia que afecta a uno o más órganos intra-abdominales incluyendo el hígado, el bazo, los riñones, las glándulas suprarrenales y el páncreas.
- Tumor embrionario en la infancia (por ejemplo, tumor de Wilms, hepatoblastoma, neuroblastoma o rabdomiosarcoma).
- Hemihiperplasia (crecimiento excesivo asimétrico de una o más regiones del cuerpo).
- Citomegalia de la corteza suprarrenal fetal (que se considera patognomónica).
- Anomalías renales incluyendo anomalías estructurales, nefromegalia, nefrocalcinosis.
- Paladar hendido.
- Displasia mesenquimal placentaria (Wilson et al., 2008).
- Cardiomegalia y cardiomiopatía.

Criterios menores:

- Hallazgos relacionados con el embarazo, incluyendo polihidramnios y la prematuridad.
- Hipoglucemia neonatal.
- *Nevus flammeus* facial, otras malformaciones vasculares.
- Facies característica, incluyendo hipoplasia del tercio medio facial y arrugas infraorbitarias.
- Anomalías cardíacas estructurales.
- Edad ósea avanzada (común en los trastornos del crecimiento excesivo/endocrinos).

Estudio Molecular SBW

El test de metilación en el centro de impronta IC2 – IC1 es la primera opción. El IC2 se encuentra afectado en el 50% de los pacientes con criterios clínicos de SWB. Si los resultados de esta prueba son negativos, se puede considerar el análisis de disomía uniparental con MS-MLPA en la región 11p15.5 la cual se encuentra en el 20% de los pacientes con criterios clínicos de SWB (Weksberg et al., 2005).

4.1.2 SÍNDROME SOTOS

El síndrome Sotos, es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, conocida también como gigantismo cerebral (prevalencia de 1-9:100.000) (Tatton-Brown et al., 2005). Se caracteriza por un crecimiento excesivo prenatal y postnatal. Los afectados presentan macrocefalia, dolicocefalia, calvicie fronto-parietal, estrabismo, cara redonda que se alarga con la edad, mentón puntiagudo, frente prominente, mejillas sonrojadas, erupción prematura de los dientes, maduración ósea acelerada, escoliosis y talla alta. Al nacer, se evidencia hipotonía axial, episodios de hipoglicemia neonatal, alteraciones en la deglución y reflujo gastroesofágico. Presentan retraso motor y cognitivo, convulsiones. Las imágenes del sistema nervioso central evidencian ventriculomegalia e hipoplasia del cuerpo calloso. Además, presentan a nivel cardiovascular persistencia del ducto arterioso, en su sistema urinario doble sistema colector (Rayasam et al., 2003).

Características cardinales (presentes en $\geq 90\%$ de las personas con síndrome Sotos):

- Apariencia facial característica: dolicocefálico, frente amplia y prominente. A menudo, el cabello en la región fronto-temporal es escasa. Las fisuras palpebrales hacia abajo, enrojecimiento malar y mentón puntiagudo.

- Discapacidad de aprendizaje.
- Crecimiento excesivo (Balasubramanian et al., 2014).

Principales características (presentes en el 15% -89% de las personas con síndrome Sotos):

- Problemas de comportamiento.
- Edad ósea avanzada.
- Anomalías cardíacas: persistencia del *ductus* arterioso, defectos del *septum atrial* o ventricular.
- Anormalidades craneales: dilatación ventricular, anormalidades de la línea media (hipoplasia o agenesia del cuerpo calloso, megacisterna magna, atrofia cerebral, vermis cerebeloso pequeño).
- Hiperlaxitud articular / pie plano.
- Pre-eclampsia materna.
- Complicaciones neonatales: ictericia, hipotonía, succión pobre.
- Anomalías renales: reflujo vesico-ureteral.
- Escoliosis.
- Convulsiones.

En el síndrome Sotos, se encuentran microdeleciones en el gen *NSD1* como mutaciones causales. Este gen codifica para una proteína del tipo histona llamada lisina N-metiltransferasa, donde su mutación lleva a la hipometilación de islas CpG que normalmente se hallan metiladas, activando la transcripción de genes que pueden

generar crecimiento en diferentes tejidos donde este se expresa. Las histonas metiladas son capaces de unirse con mayor afinidad al ADN, impidiendo así el acceso de la maquinaria transcripcional y por tanto de la transcripción de los genes situados en la región regulada. La proteína que codifica el gen *NSD1* tiene 12 dominios funcionales, incluyendo dos dominios receptores de interacción nuclear, dos dominios prolina-triptófano-triptófano-prolina (PWWP), cinco dominios *plant homeo* (PHD), y un dominio SET. El dominio SET de NSD1 es el único dominio histona específico que metila el residuo lisina 36 en la histona H3 y el residuo lisina 20 en la histona H4. Los dominios PHD se encuentran en proteínas que actúan como reguladoras de la cromatina. Los dominios del tipo PWWP están implicados en la interacción proteína-proteína y frecuentemente se encuentran en las proteínas del tipo metiltransferasa. La presencia de estas regiones sugieren que NSD1 actúa como una histona metiltransferasa, además de ser un intermediario transcripcional capaz de regular la transcripción en distintos tejidos (Balasubramanian et al., 2014).

Estudio Molecular de Síndrome Sotos:

El diagnóstico molecular del síndrome Sotos se realiza con la secuenciación y/o el análisis de delección/duplicación del gen *NSD1*. Las más frecuentes son las delecciones que se encuentran en el 45% de los pacientes afectados con esta enfermedad (Tatton et al., 2004).

4.1.3 SÍNDROME WEAVER

El síndrome de Weaver (SW) es una patología de sobrecrecimiento de prevalencia desconocida y herencia autosómica dominante. Clínicamente se han reportado pacientes con macrocefalia, diámetro bifrontal grande, occipucio aplanado, cara

redonda en la infancia, *filtrum* largo, migrognatia, mentón puntiagudo, orejas grandes, estrabismo, hipertelorismo, pliegue epicántico, fisuras palpebrales hacia abajo, edad ósea avanzada, talla alta, diastasis de los músculos rectos abdominales, hernias inguinales, hidrocele, criptorquidia, escoliosis, camptodactilia, clinodactilia, pie cavo, retraso en el desarrollo psicomotor, hipotonía, convulsiones, ventrículos dilatados y ausencia de *septum pelucidum* (Gibson et al., 2012).

El SW es causado por mutaciones del tipo *missense* y *nonsense* en el gen *EZH2*, el cual codifica para una histona-lisina N-metiltransferasa, que actúa como represora de la transcripción, mediante la metilación del residuo lisina 27 de la histona H3. Las alteraciones en la proteína que causan sobrecrecimiento en el SW no son claras; sin embargo, las variantes heterocigotas con mutaciones *missense* que se encuentran frecuentemente en estos pacientes son: c.458A>G (p.Tyr153Cys), c.2044G>A (p.Ala682Thr), c.2233G>A (p.Glu745Lys) (Tatton et al., 2013).

Para el diagnóstico del SW no se han establecido criterios mayores y menores, sin embargo, se tienen en cuenta de manera global características fenotípicas, radiológicas y moleculares.

Dentro de las características clínicas más frecuentes se encuentran:

- Talla alta ($\geq + 2$ SD).
- Macrocefalia (circunferencia de la cabeza $\geq + 2$ SD).
- Discapacidad intelectual.
- Apariencia facial característica: gran diámetro bifrontal, *filtrum* largo, occipucio aplanado. En los niños menores de tres años de edad se encuentra retrognatia,

orejas grandes, mentón con pliegue de la piel horizontal y hoyuelo, estrabismo, hipertelorismo, fisuras palpebrales hacia abajo y puente nasal deprimido.

En los individuos afectados de todas las edades, se incluyen características adicionales:

- Frente ancha.
- Hipertelorismo.
- Piel suave y pastosa.
- Camptodactilia de los dedos y / o de los pies.
- Hernia umbilical.
- Tono anormal (hipotonía central y / o periférico hipertonía) (Tatton et al., 2011).

Hallazgos radiológicos:

- Edad ósea avanzada.
- Resonancia magnética del cerebro: trastorno de la migración neuronal.

Estudio Molecular de Síndrome de Weaver

La secuenciación y el análisis de delección/duplicación del gen *EZH2* permiten identificar variantes patogénicas como delecciones, inserciones y variantes *missense*, *nonsense* y del sitio de *splicing* que pueden relacionarse con la enfermedad. Las más frecuentes reportadas en este síndrome son las mutaciones *missense*, que fueron descritas anteriormente (Tatton et al ., 2013).

4.1.4 ESPECTRO PROS

Dentro de las patologías de sobrecrecimiento prenatales, se encuentran los síndromes de sobrecrecimiento segmentario. Los pacientes con esta enfermedad presentan mutaciones somáticas en un mismo gen. Se clasifican en diferentes entidades que se sobreponen clínicamente, por lo cual se han agrupado en lo que se denomina el espectro PROS (*PIK3CA-related overgrowth spectrum*). En este grupo se encuentran (ver descripción más adelante) A) La hiperplasia fibroadiposa, que se caracteriza por sobrecrecimiento de los tejidos esquelético, adiposo, fibroso y muscular. B) La hemihiperplasia lipomatosa múltiple en la cual los pacientes presentan *nevus* de tejido conectivo, *nevus* epidérmicos verrugosos, lipomatosis y malformaciones vasculares de tipo capilar. C) El síndrome CLOVES que se caracteriza por malformaciones vasculares (afectando típicamente al tronco), *nevus* epidérmicos, lipomas, crecimiento tisular en forma globulosa y escoliosis. D) El síndrome de malformación capilar y megalocéfalo, donde la polimicrogiria y la macrocefalia son frecuentes, se observan, lesiones vasculares en las extremidades, palmas, plantas del pie y tronco; *nevo flameus* en la nariz, el surco nasolabial y el labio superior; hipotonía neonatal, sobrecrecimiento prenatal, asimetría en las extremidades, laxitud articular, tejido cutáneo grueso y sindáctila de los dedos del pie (Keppler et al., 2015).

En los síndromes de sobrecrecimiento segmentario, las causas moleculares evidencian interrupciones en el receptor tirosina quinasa (RTK)/PI3K/AKT, que promueven específicamente la expresión del receptor de insulina. La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales auto-fosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS). Este último, fosforila la subunidad p85 de la enzima PI3K. La fosforilación de la

subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de la proteína. La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína AKT. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica. La disfunción en el (RTK)/PI3K/AKT ha sido descrita en algunas condiciones, tales como Síndrome de Proteus y el espectro PROS en los que mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA* generan sobrecrecimiento que comprometen los tejidos adiposo, óseo y muscular descritos anteriormente (Keppler-Noreuil et al., 2014). La caracterización clínica de los pacientes se sobrelapan en el espectro PROS. La prevalencia del sobrecrecimiento segmentario es difícil de estimar debido a la variación clínica y amplio espectro fenotípico. Muchas personas tienen fenotipos atípicos o leves que conducen a errores de identificación (Martinez-Glez et al., 2010). A continuación, se describirán las características clínicas de estos síndromes:

Hiperplasia fibroadiposa:

Se caracteriza por el crecimiento excesivo segmentario de los tejidos fibroadiposo, subcutáneo, muscular, esquelético y visceral de forma asimétrica. El grado de sobrecrecimiento varía entre cada individuo. Tienen edad ósea normal, sin hipoglicemia. Otras anomalías incluyen malformaciones vasculares de capilares cutáneos, anomalías testiculares o del epidídimo, nevos epidérmicos, polidactilia, inteligencia normal (Lindhurst et al., 2012).

Hemihiperplasia lipomatosa múltiple:

Es un grupo heterogéneo de hallazgos de sobrecrecimiento, donde los pacientes presentan hemi-hiperplasia y como hallazgo predominante *nevus* epidérmico

verrugoso, lipomatosis severa, hiperlaxitud de la piel, macrodáctila, sindáctila y malformaciones vasculares no progresivas (venosas y linfáticas o combinadas) (Lindhurst et al., 2012).

Síndrome CLOVES

El síndrome CLOVES se caracteriza por sobrecrecimiento lipomatoso congénito, malformaciones vasculares combinadas complejas y progresivas del tronco y *nevi* epidérmicos (Lindhurst et al., 2012). Los pacientes presentan también una repartición anormal y desproporcionada del tejido adiposo que puede estar asociada a una escoliosis de gravedad variable y a estructuras óseas agrandadas sin sobrecrecimiento óseo progresivo. La presencia de manifestaciones esqueléticas/escolióticas ha llevado a sugerir la ampliación del acrónimo de la enfermedad a CLOVES. Se han descrito ocasionalmente manifestaciones del sistema nervioso central (convulsiones generalizadas, hemimegalencefalia, disgenesia del cuerpo calloso y defectos de migración neuronal) y asimetría craneal.

Síndrome de malformación capilar - megalencefalia polimicrogiria (MCAP)

El síndrome de malformación capilar-megalencefalia polimicrogiria (MCAP) es un síndrome polimalformativo que se caracteriza por malformaciones capilares cutáneas, megalencefalia, malformaciones cerebrales corticales (polimicrogiria), anomalías del crecimiento somático con asimetría en cuerpo y cerebro, retraso en el desarrollo, y dismorfismo facial característico.

La macrocefalia es su principal rasgo clínico y es consecuencia de la megalencefalia, que a veces progresa a hidrocefalia. Las lesiones vasculares están a menudo diseminadas

en las extremidades, palmas, plantas del pie y tronco. Se observa dismorfismo facial con mejillas llenas, prominencia frontal y *nevo* flamígero de nariz y/o surco nasolabial y labio superior. Hay retraso en el habla y en las habilidades motoras. Los pacientes pueden presentar síntomas neurológicos, principalmente hipotonía neonatal, y, con menos frecuencia, convulsiones. Las manifestaciones clínicas adicionales incluyen sobrecrecimiento prenatal, asimetría en las extremidades, laxitud articular, y tejido cutáneo grueso, y/o sindáctila de los dedos del pie. Algunos pacientes desarrollan neoplasias (el riesgo de desarrollar tumores se estima en 5-6%). También hay un riesgo incrementado de defectos cardíacos congénitos, como la tetralogía de Fallot (Keppler et al., 2015).

Criterios diagnósticos del Espectro PROS (Rasmussen et al ., 2014).

- Presencia de mutación somática *PIK3CA*.
- Sobrecrecimiento congénito o temprano en la infancia.
- Sobrecrecimiento esporádico y en mosaico.

Categoría A. Espectro (2 o más características)

- Sobrecrecimiento: adiposo, muscular, nervioso y esquelético.
- Malformación Vascolar: capilar, venosa, malformación arteriovenosa, linfática.
- *Nevus* epidérmico.

Categoría B. Características Aisladas

- Gran malformación linfática.

- Macroductila Aislada o sobrecrecimiento en pies/manos. Sobrecrecimiento en extremidades.
- Sobrecrecimiento adiposo truncal.
- Hemimegalencefalia/megalencefalia displásica, displasia cortical focal.
- *Nevus* epidérmico.
- Queratosis seborreica.
- Queratosis liquenoide benigna (Keppler et al., 2015).

Estudio Molecular del Espectro PROS

Mutación en mosaico del gen *PIK3CA*. El análisis de secuencias de ADN derivado de la piel o de la región tisular afectada (sea visiblemente afectada o no mediante biopsia) y comparada con el ADN de una muestra de saliva, tiene una tasa de detección superior a la del ADN derivado de la sangre periférica (Rasmussen et al., 2014).

4.1.5. SINDROME DEL X FRAGIL

El síndrome del cromosoma X frágil (SXF) es una enfermedad genética frecuente que cursa con discapacidad intelectual de severidad variable que puede ir asociada a trastornos conductuales y rasgos físicos característicos. Su prevalencia se estima entre 1:4.000-5.000 varones nacidos vivos (Gallagher et al., 2012). El SXF presenta un fenotipo clínico variable. En varones, la enfermedad debuta durante la niñez, con hitos del desarrollo retrasados. La gravedad del déficit intelectual es variable y puede incluir problemas con la memoria de trabajo y la memoria a corto plazo, la función ejecutiva, el lenguaje, las habilidades visuo-espaciales o las numéricas. Las anomalías de la

conducta pueden ser leves (como ansiedad o humor inestable) o graves (como comportamiento agresivo o autismo). El comportamiento similar al autismo puede incluir aleteo de manos, escaso contacto visual, morderse las manos, evitación de la mirada, fobia social y defensa táctil. En mujeres los trastornos intelectuales y de comportamiento suelen ser leves y normalmente consisten en timidez, ansiedad social y problemas de aprendizaje leves con un CI normal, si bien un 25 % de ellas presentan un CI inferior a 70. El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) está presente en cerca del 90% en varones y del 30% en mujeres y es habitual la desinhibición conductual. También se pueden observar otitis recurrentes (60%) y convulsiones (20%). Los rasgos físicos son sutiles y pueden incluir rostro estrecho y alargado, frente y orejas grandes y de baja implantación, la frente amplia y las mejillas prominentes, hiperlaxitud articular en los dedos, pies planos, y macro-orquidismo en varones pospuberales (Rodríguez-Revenge et al., 2009).

El SXF está causado por el silenciamiento transcripcional del gen *FMR1* (Xq27.3), a causa de la expansión progresiva y la subsecuente metilación de repeticiones del trinucleótido (CGG), presentes en más de 200 copias repetidas en la región 5' no traducida del gen. Estas mutaciones completas son originadas por alelos inestables llamados premutaciones (con repeticiones que oscilan entre 55 a 200 CGG) que pueden estar asociadas a otros fenotipos, como el riesgo insuficiencia ovárica primaria y el síndrome de ataxia/temblor asociado a X frágil o FXTAS. En algunos casos raros, se ha observado que el SXF es causado por mutaciones puntuales o deleciones intragénicas en el gen *FMR1*. El gen *FMR1* codifica la FMRP, una proteína de unión al RNA que regula la síntesis proteica y otras rutas de señalización en las dendritas neuronales. Se piensa que el

silenciamiento de *FMR1* reduce la plasticidad sináptica y la modulación en todo el cerebro, incluido el hipocampo (Galloway et al., 2009).

Las características clínicas de los pacientes con el síndrome de X frágil (Gallagher et al., 2012).

Hitos del desarrollo retardado (edad habitual de los logros en los niños):

- Sentarse solo (10 meses).
- A pie (20,6 meses).
- Las primeras palabras claras (20 meses).

Características pre-púberes: retraso en el desarrollo del lenguaje, rabietas, hiperactividad, autismo.

La discapacidad intelectual: 30-50 IQ.

Características craneofaciales: macrocefalia, cara larga, frente prominente, orejas grandes, prognatismo.

Características pos-púberes: macro-orquidismo.

Oftalmológica: estrabismo.

Ortopédica: hiperlaxitud, pie plano, *pectum excavatum*, escoliosis.

Otras características

Cardiaco: prolapso de la válvula mitral, dilatación de la raíz aórtica.

Sistema Nervioso Central: retraso mental (moderado a severo), hipotonía, convulsiones, movimientos anormales de cabeza y heterotopia nodular periventricular.

Estudio Molecular de X Frágil (Maes et al.,2000)

El síndrome de X frágil se diagnostica con la realización de una PCR larga específica para la repetición CGG en el gen *FMR1*, con alta sensibilidad para las repeticiones *FMR1* en el rango normal e inferior a premutación (típicamente ≤ 100 a 120 repeticiones). El análisis de *Southern blot* detecta los *FMR1* alelos normales, incluyendo premutaciones de mayor tamaño, y mutaciones completas y, además, determina el estado de metilación de la región promotora del gen *FMR1* (Sherman et al., 2005). La secuenciación del gen es útil en algunos pocos individuos con síndrome X frágil en quienes se ha descartado una expansión CGG del gen *FMR1* pero que presentan un fenotipo compatible; en ellos se han identificado con una mutación intragénica en *FMR1*. El análisis de delección/duplicación no se realiza como un análisis molecular de inicio ya que menos del 1% de los individuos con síndrome de X frágil tienen una delección parcial o total de *FMR1*.

Tabla 1. SINDROMES DE SOBRECRECIMIENTO

Síndrome Sotos	Síndrome Weaver	Síndrome Beckwith Wiedemann
<p>Criterios cardinales 90% (Tatton-Brown et al., 2005) Facies característica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dolicocefalia • Frente abombada • Fisuras palpebrales hacia abajo • Mejillas sonrojadas • Mentón puntiagudo <p>Retraso cognitivo Sobrecrecimiento</p> <p>Características Mayores 15-89% (Balasubramanian et al., 2014)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad ósea avanzada (75-80%) • Problemas adaptativos: Fobias, Autismo • Cardiopatía (20%): <i>Ductus</i> arterioso persistente, comunicación interauricular e interventricular • Anormalidades cerebrales: dilatación ventricular, agenesia del cuerpo calloso, atrofia cerebral, mega cisterna magna. • Hiperlaxitud articular/pies planos (20%) • Preeclampsia Materna (15%) • Complicaciones neonatales: Hipotonía (75%), pobre succión (70%), Ictericia (65%) • Anomalías Renales (15%): reflujo vesicoureteral • Escoliosis (30%) • Convulsiones (25%) • Tumores 3%: LLA, teratoma, neuroblastoma 	<p>Características Clínicas más frecuentes</p> <p>Facies características</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retrognatia • Orejas grandes • Frente amplia • Hipertelorismo • Cara redonda • Ojos almendrados <p>Talla Alta Macrocefalia Retraso cognitivo</p> <p>Otras características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pobre Coordinación • Piel suave • Camptodactilia de los dedos de la mano y / o de los pies • Hernia umbilical • Escoliosis • Tono anormal (hipotonía central y / o hipertonia periférica) • Grito ronco, de tono bajo (a veces descrito como silencioso) • Edad ósea avanzada • Anomalías cerebrales: alteración en la migración neuronal, ventriculomegalia, leucomalacia • Tumores: LLA, neuroblastoma (Tatton-Brown et al., 2013) 	<p>Criterios mayores</p> <ul style="list-style-type: none"> • Macrosomia • Macroglosia • Hemihipertrofia • Onfalocele • Tumores embriológicos: Tumor de Wilms, Hepatoblastoma, Neuroblastoma, Rbdomiosarcoma • Visceromegalia • Citomegalia de la corteza adrenal fetal • Anomalías Renales: nefromegalia, nefrocalcinosis • Displasia mesénquimal placentaria • Paladar Hendido • Cardiomiopatía • Antecedentes familiares positivos para SBW <p>Criterios menores</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polihidramnios • Prematurez • Hipoglicemia neonatal • Hemangiomas • Cardiomegalia • Diastasis de los rectos • Edad ósea avanzada (Baujat et al., 2004)
<p>Diagnóstico Molecular Secuenciación del gen <i>NSD1</i></p>	<p>Diagnóstico Molecular Secuenciación del gen <i>EZH2</i></p>	<p>Diagnóstico Molecular Análisis de metilación (IC1- IC2) Microarray: Disomía uniparental Secuenciación del gen <i>CDKN1C</i></p>
<p>Diagnóstico diferencial: Síndrome Weaver Síndrome Beckwith Wiedemann (Wilson et al., 2008) Síndrome Simpson-Golabi-Behmel Síndrome X frágil</p>	<p>Diagnóstico diferencial: Síndrome Sotos Síndrome de sobrecrecimiento <i>DMNT3</i> Síndrome Beckwith Wiedemann Síndrome Simpson-Golabi-Behmel Síndrome de Marfan</p>	<p>Diagnóstico diferencial: Síndrome Simpson-Golabi-Behmel Síndrome Costello Mucopolisacaridosis tipo VI</p>

Tabla1. SINDROMES DE SOBRECRECIMIENTO

ESPECTRO PROS	X FRAGIL
<p>Criterios diagnósticos del Espectro PROS (Rasmussen et al., 2014)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presencia de mutación somática <i>PIK3CA</i> • Sobrecrecimiento congénito o temprano en la infancia • Sobrecrecimiento esporádico y en mosaico <p>Categoría A. Espectro (2 o más características)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sobrecrecimiento: adiposo, muscular, nervioso y esquelético • Malformación Vascular: capilar, venosa, malformación arteriovenosa, linfática <p>Categoría B. Características Aisladas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gran malformación linfática • Macrodáctila Aislada o sobrecrecimiento en pies/manos. Sobrecrecimiento en extremidades. • Sobrecrecimiento adiposo truncal • Hemimegalencefalia/megalencefalia displásica, displasia cortical focal • <i>Nevus</i> epidérmico • Queratosis seborreica • Queratosis liquenoide benigna (Keppler-Noreuil et al., 2014) 	<p>Las características clínicas presentes el síndrome de X frágil (Gallagher & Hallahan, 2012)</p> <p>Hitos del desarrollo retardado (edad habitual de los logros en los niños):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sentarse solo (10 meses) • A pie (20,6 meses) • Las primeras palabras claras (20 meses) <p>Características pre-púberes:</p> <p>Retraso en el desarrollo del lenguaje, rabieta, hiperactividad, autismo.</p> <p>Discapacidad intelectual: 30-50 IQ</p> <p>Características craneofaciales: macrocefalia, cara larga, frente prominente, orejas grandes, prognatismo</p> <p>Características pos-púberes: macro-orquidismo</p> <p>Oftalmológica: estrabismo</p> <p>Ortopédica: hiperlaxitud, pie plano, <i>pectum excavatum</i>, escoliosis</p> <p>Otras características</p> <p>Cardiaco: prolapso de la válvula mitral, dilatación de la raíz aórtica</p> <p>Sistema Nervioso Central: retraso mental (moderado a severo), hipotonía, convulsiones, movimientos anormales de cabeza y heterotopia nodular periventricular.</p>
<p>Diagnóstico molecular</p> <p>Secuenciación del gen <i>PIK3CA</i> de la piel o de la región tisular afectada</p>	<p>Diagnóstico molecular</p> <p>PCR larga para expansión de tripletes de la repetición CGG en el gen <i>FMR1</i></p>
<p>Diagnostico diferencial</p> <p>Síndrome de Klippel-Trenaunay</p> <p>Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba</p> <p>Síndrome de Proteus</p> <p>Síndrome de Solamen</p>	<p>Diagnostico diferencial</p> <p>Síndrome de Sotos</p> <p>Síndrome de Prader Willi</p> <p>Autismo</p>

4.2 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN

La técnica de secuenciación de siguiente generación (NGS) es un método descrito por primera vez en el año 2007 (Metzker, 2010). Esta tecnología utiliza nuevas formas de preparación de las muestras, distintas técnicas de secuenciación y nuevos algoritmos de análisis de los datos. La mayor ventaja que ofrece la NGS es la posibilidad de secuenciar grandes regiones del genoma de manera simultánea (Metzker, 2010). La variedad de nuevas técnicas para la realización de NGS ha permitido que diversas técnicas puedan coexistir.

4.2.1 Preparación de la librería

Las técnicas de NGS requieren primero la preparación de las muestras a secuenciar mediante la fragmentación del ADN, lo que permite miles de reacciones de secuenciación simultánea. Existen dos métodos principales de preparación de las muestras:

Amplificación clonal

La mayoría de sistemas de NGS no pueden detectar señales bajas de fluorescencia por lo cual se requiere la amplificación de los fragmentos a través de técnicas de amplificación clonal. Se dispone de dos tipos de PCR que incluyen la PCR en emulsión (emPCR) y la PCR en fase sólida (Dressman et al., 2003)(Fedurco et al., 2006). La emPCR utiliza un sistema libre de células y una librería de fragmentos cuyos extremos se ligan a adaptadores. El ADN se separa en cadenas sencillas y es capturado sobre la superficie de microperlas para que en cada una de ellas se localice una molécula de ADN. Lo anterior, permite el proceso de amplificación y la inmovilización de las perlas por medio de uno de los siguientes mecanismos: 1. Emulsión acuosa de aceite para encapsular

complejos perla-ADN en lámina de vidrio 2. La inmovilización sobre un gel de poliacrilamida, 3. El depósito en pocillos individuales de una placa (Leamon et al., 2003)(Bentley et al., 2009)

En la amplificación en fase sólida o PCR en puente, se unen covalentemente a un soporte de vidrio primers *forward* y *reverse* y se obtienen entre 100 y 200 millones de fragmentos del producto. Estos productos cuentan con extremos libres a los que se hibrida un *primer* universal para iniciar la secuenciación. Se usan polimerasas y nucleótidos fluorescentes de terminador reversible para la secuenciación de una única molécula de ADN. La tecnología *Single-molecules templates* requiere una menor cantidad de producto (<1µg) en comparación con la amplificación clonal (20 a 30 µg). Además, no precisa de una PCR previa que induzca mutaciones en el fragmento a secuenciar (Metzker, 2010). Se utilizan tres aproximaciones para inmovilizar plantillas de molécula única en fase sólida: 1. Se utilizan *primers* que se unen covalentemente a un soporte sólido. Las muestras se preparan mediante fragmentación al azar en secuencias de 200 pb a 250 pb y se les añaden adaptadores universales en sus dos extremos. Posteriormente, El ADN fragmentado se hibrida con los *primers* inmovilizados y la enzima ADN polimerasa se une al complejo *primer*-muestra para iniciar la reacción de secuenciación. 2. Se fundamenta en la unión de la muestra junto con los adaptadores universales a la superficie sólida. La enzima ADN polimerasa se une al complejo *primer*-muestra para iniciar la reacción de secuenciación. 3. La enzima ADN polimerasa fijada sobre la superficie sólida, se une a la muestra con el *primer*. Con esta técnica se pueden secuenciar moléculas de ADN de mayor tamaño. (Metzker, 2010)

4.2.1.2 Secuenciación

Las muestras fijadas en el método de amplificación clonal dan como resultado múltiples fragmentos. Cada uno de estos es sometido posteriormente a una reacción de secuenciación y el resultado final será un consenso de las diferentes reacciones. La lectura de las muestras fijadas en el método de molécula única se realiza en una única reacción. Diferentes estrategias han sido usadas para este paso de la NGS y serán brevemente expuestas a continuación.

Adición de nucleótido único o pirosecuenciación

Es un método no electroforético basado en bioluminiscencia. Mide la liberación de fosfatos inorgánicos al convertirse en luz visible usando una serie de reacciones enzimáticas. Cuando el dNTP (deoxiribonucleósido trifosfato) añadido corresponde con el complementario de la cadena molde se activa la ADN polimerasa, une el dNTP a la cadena y se libera un pirofosfato por cada uno de los nucleótidos añadidos. Este pirofosfato se convierte en luz visible gracias a sulfurilasas y luciferasas. Esta luz, de intensidad variable según el número de nucleótidos incorporados, es recogida y cuantificada, revelando tras ser analizada la secuencia original de ADN (Ronaghi et al., 1996). Comercialmente se ha distribuido el pirosecuenciador Roche/454. El secuenciador consta de un sistema óptico que recoge el patrón de destellos luminosos que se emiten. Mediante programas informáticos se interpretan estos patrones de luz y se generan gráficas que indican si se incorporaron o no los nucleótidos. El exceso de nucleótidos y reactivos se lava y se repite el proceso con otro tipo de nucleótido de forma cíclica hasta que finalice la síntesis de la cadena complementaria.

Terminación reversible cíclica (CRT). Es una técnica que utiliza terminadores reversibles para la incorporación de cada uno de los nucleótidos (Bentley et al., 2009)(Metzker, 2005). Inicialmente la enzima ADN polimerasa unida al fragmento de la muestra incorporara un solo nucleótido complementario fluorescente con un grupo terminador en su extremo 3'. El proceso de síntesis de ADN termina y los nucleótidos sobrantes son lavados. La lectura se efectúa mediante láser para identificar el nucleótido que se ha unido al fragmento de la muestra. Este paso es seguido por un clivaje del grupo terminador del nucleótido fluorescente y un lavado adicional antes de iniciar un nuevo paso de incorporación de nucleótidos. La detección puede realizarse mediante un solo color (todos los nucleótidos marcados con el mismo fluoróforo) (Helicos BioSciences) o mediante 4 colores (cada nucleótido marcado con un fluoróforo diferente) (Illumina/Solexa)(Bentley et al., 2008).

Secuenciación por ligación (SBL) Este tipo de secuenciación utiliza una ADN ligasa en lugar de una ADN polimerasa para crear la cadena complementaria. Se basa en la utilización de sondas de ADN de 1 o 2 nucleótidos, marcadas con fluorescencia, que hibridan con el fragmento a secuenciar. Las sondas no hibridadas se lavan y posteriormente, se lee la fluorescencia para determinar la identidad de la sonda ligada. Este proceso se realiza en repetidas ocasiones para identificar la secuencia completa. La plataforma llamada SOLiD (*Support oligonucleotide ligation detection*) utiliza el método de SBL (Harismendy et al., 2009).

Secuenciación en tiempo real Es un método en el que se incorporan dNTPs marcados con fluoróforos y de manera paralela se realiza una lectura de la fluorescencia del ADN

recién sintetizado (Metzker, 2010). Este proceso es efectuado por una enzima ADN polimerasa unida a la superficie de detectores ZMW (*Zero Mode Waveguide*) cuya función es identificar la secuencia de la nueva cadena. El detector está compuesto por pocillos de unos 10nm de diámetro y están fabricados en una película de metal de 100nm de profundidad. Dentro de cada ZMW se incorporan nucleótidos fosfato marcados con fluoroforos de cuatro colores (uno por cada base) a la cadena a tiempo real. Los pulsos de fluorescencia emitidos con cada incorporación de un nucleótido a la cadena se van leyendo, mientras este proceso tiene lugar en miles de detectores ZMW de forma simultánea (Eid et al., 2009).

4.3 FAMILIA DE LAS PROTEINAS HERC

La familia de genes *HERC* codifica para proteínas con dos dominios característicos: el HECT dominio y el RCC1-Like dominio (RDL). En los seres humanos la familia HERC se compone de seis miembros que se dividen en dos grupos según su masa molecular. Los de mayor masa molecular de 500kDa (HERC1 Y HERC2) tienen un dominio HECT, y más de un dominio RDL y los de masa molecular menor (120 kDa HERC3-6) que poseen dominios HECT y RDL únicos (Sánchez et al., 2016). Las proteínas de la familia HERC tienen una amplia gama de funciones celulares como la reparación de ADN, el crecimiento celular y la respuesta inmunitaria (García et al., 2005)(Figura 1).

4.3.1 Dominios estructurales

Dominio HECT

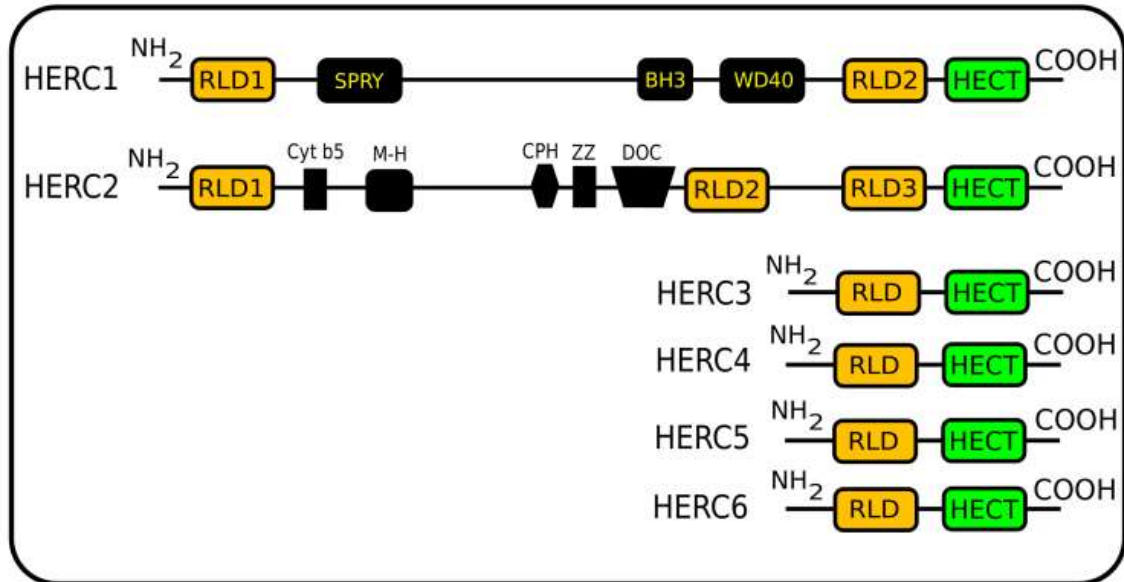
El dominio HECT es un homólogo del carboxilo terminal de la proteína E6AP. Esta característica estructural proporciona la capacidad de actuar como ubiquitina / ubiquitina proteína ligasa (UBL) y de este modo regular el funcionamiento de aquellas proteínas a las que ubiquitinan (Huibregtse et al., 1995). El proceso mediante el cual se efectúa la ubiquitinación de proteínas es complejo y requiere de la acción de, al menos, tres tipos de enzimas: la enzima activadora de la ubiquitina (también llamada E1), las enzimas conjugadoras de ubiquitina o (E2) y finalmente las ubiquitinas ligasas o (E3). Las proteínas E3 de tipo HECT se caracterizan por unirse covalentemente a la ubiquitina antes de transferirla definitivamente a sus sustratos. Esta unión tiene lugar entre una cisteína conservada del centro activo del dominio HECT y el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina. En esta última reacción, la ubiquitina es transferida desde la cisteína conservada del E3 a una lisina del sustrato, lo cual da lugar a la formación de un enlace

isopeptídico, de tipo amida (Gao et al., 2005). La función característica de la vía ubiquitina/UBL, va dirigida a proteínas disfuncionales o reguladas para el reconocimiento y la degradación a través del proteasoma. Sin embargo, las nuevas proteínas UBL han emergido como reguladores críticos de varias funciones celulares, incluyendo la transcripción, la reparación del ADN, la apoptosis, y la respuesta inmune (Enserink, 2015) (Morales et al., 2013).

Dominio RLD

Se conocen como dominios RLD (*RCC1-like domain*) aquellos que presentan un elevado grado de similitud con la proteína RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation-1*) (Ohtsubo et al., 1987). La secuencia de este dominio se caracteriza por presentar siete repeticiones de 51-68 residuos aminoácidos cada una, dando lugar a dominios entre 350 y 450 aminoácidos, que corresponden en realidad a cada uno de los siete lados de un dominio con simetría heptagonal formado por cadenas beta. El dominio RLD tiene dos funciones: primero, actúa como factor intercambiador de nucleótidos de guanina sobre el RanGTP y segundo interactúa como cromatina a través de las histonas H2A y H2AB. Mediante esas interacciones RCC1 participa principalmente en el ciclo celular, el transporte núcleo- citoplasma, la nucleación de microtúbulos y la formación del huso mitótico (Hadjebi et al., 2008).

Figura 1. Estructura de la familia de proteínas HERC. Tomada y modificada de Sánchez-Cubillos 2016.



4.3.2 HERC1

La proteína HERC1 fue identificada durante la búsqueda de secuencias humanas oncogénicas en ensayos de tumorigenicidad en ratones atómicos (Rosa et al., 1997). El cDNA de *HERC1* posee un marco abierto de lectura de 14,586 pares de bases que codifican una proteína de 4861 aminoácidos con una masa molecular de 532 kDa. La comparación de la secuencia aminoacídica de HERC1 con las de otras proteínas presentes en las bases de datos pone en manifiesto la presencia en HERC de varias regiones conservadas evolutivamente (Rosa et al., 1997). HERC1 posee dos dominios RLD altamente conservados entre ellos (48% de identidad), un dominio HECT bien conservado en su extremo C-terminal, un dominio BH3, un dominio WD40 y un dominio SPRY. Otras regiones identificadas son: tres regiones ricas en prolina que podrían unir dominios SH3, siete regiones ricas en aminoácidos polares-acídicos y una secuencia similar a una cremallera de leucinas (Francesc R et al., 2005) (Figura 1).

El gen *HERC1* se encuentra ubicado en 15q22, tiene 78 exones. Se expresa principalmente en los testículos, en el cerebro y en el hígado. Su localización subcelular se restringe al citoplasma, el aparato de Golgi y los compartimentos de membrana de tipo vesicular.

El dominio RLD1 de *HERC1* tiene actividad GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*) y GRF (*Guanine nucleotide reléase factor*) sobre ARF1 y otras GTPasas implicadas en el tráfico vesicular como son Rab3a y Rab5 (Sanchez et al., 2016). El dominio RLD2 de *HERC1* posee afinidad por ARF1, una proteína G monomérica de la superfamilia de Ras involucrada en el tráfico intracelular, y por la cadena pesada de la clatrina (CHC), otra proteína clave en el transporte vesicular. Esta interacción tiene lugar sólo cuando *HERC1* se localiza en la fracción citosólica, mientras que la fracción de *HERC1* que se halla asociada a las membranas intracelulares no interacciona con CHC. De acuerdo con esto, *HERC1* no parece ser un componente constitutivo de las vesículas de clatrina. Lo más probable es que *HERC1* actúe como regulador del desensamblaje de las cubiertas de clatrina sobre las vesículas (Francesc R et al., 2004).

El dominio HECT de *HERC1* se conjuga con la ubiquitina a través de un sitio activo de cisteína, una reacción mediada por la E2 UbcH5. Sin embargo, aún no está claro el sustrato de *HERC1* en la ubiquitinización. *HERC1* ha sido identificada como una proteína que interacciona con el complejo de esclerosis tuberosa (TSC1/TSC2) (Huang et al., 2008). Las proteínas TSC1 y TSC2, también llamadas hamartina y tuberina, respectivamente, regulan el crecimiento celular a través de la inhibición de la vía mTOR. El dominio C-Ter de *HERC1* fue descrito como desestabilizador de TSC2, lo que sugiere una función de *HERC1* en la regulación de la vía mTOR (Jewell et al., 2014).

HERC1 junto con mTOR, proteína quinasa (PKC) y fosfatidilinositol -4,5 bifosfanato-3 quinasa (PI3K), se describen como reguladores de la degradación de MutS Homólogo 2 (MSH2), una enzima involucrada en el mecanismo de reparación del ADN *mismatch*. Mutaciones somáticas en uno o más de los reguladores mencionados disminuyen los niveles de MSH2, causando deficiencia de este mecanismo de reparación de ADN y resistencia de medicamentos en leucemias (Diouf et al., 2011) . Sin embargo, autores aseguran que deleciones somáticas en *HERC1* conducen efectivamente a la estabilización de TSC2, lo que produce la activación de la fosfatasa 2A(PP2A) produciendo la desestabilización e inactivación de MSH2 (Diouf et al., 2012).

4.3.2 HERC2

HERC2 fue identificado en 1990, asociado a un síndrome en ratones caracterizado por tamaño reducido, movimientos anormales y esterilidad (Walkowicz et al., 1999). El gen *HERC2* se localiza en el cromosoma humano 15q11.13, una región cercana al locus de Prader-Willi / Angelman.

Mutaciones missense heterocigotas en *HERC2* se han encontrado en pacientes con retardo en el desarrollo neurológico muy similares a los observados en el síndrome de Angelman y trastornos del espectro autista (Harlalka et al., 2013).

HERC2 está compuesta por 4834 aminoácidos y tiene un peso molecular de 528 kDa. Se encuentra en altos niveles en el cerebro y los testículos. A nivel intracelular se encuentra en el citoplasma y el núcleo. Tiene múltiples regiones conservadas evolutivamente, incluidas el C- terminal HECT, tres dominios RCC1-like, una región citocromo b5- like, un dominio M-H, un dominio CPH, un domino ZZ tipo dedos de zinc, y un dominio DOC. El

dominio DOC, es un homólogo de la subunidad 10 del complejo promotor de la anafase (APC), mientras que el dominio M-H está relacionado con la actividad ubiquitin ligasa (Sanchez et al., 2016). Las funciones más ampliamente descritas de HERC2 incluyen la participación en la reparación y replicación del ADN.

Se han descrito numerosas proteínas de interacción de HERC2 como la quinasa 2 rica en leucina (LRRK2), una molécula clave en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson familiar idiopática (Li et al., 2007). Además, se ha descrito que HERC2 se une y ubiquitina a XPA uno de los factores de reparación del ADN tipo NER (reparación por escisión de nucleótidos) (Kang et al., 2010). HERC2 regula la E3 ubiquitin ligasa de BRCA1, la cual tiene una función clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica, la participación en la reparación del daño del ADN, el control del ciclo celular, y la actividad y la remodelación de la cromatina (Wu et al., 2010). HERC2 regula la replicación del ADN, mediante su unión a claspina, una proteína esencial en la replisoma, que mantiene la estabilidad de la horquilla durante la replicación. Además, se ha descrito a HERC2 como un regulador del crecimiento celular (Izawa et al., 2011). Análisis bioinformáticos han identificado aproximadamente 300 potenciales interacciones de HERC2, que la involucran en procesos celulares adicionales, incluyendo la traducción de proteínas (Galligan et al., 2015).

4.3.3 HERC3

El ADN codificante de la proteína HERC3 humana, fue identificado por primera vez en una búsqueda aleatoria de cDNAs mayores de 2 kb (Ishikawa, 1997). En humanos, el gen *HERC3* se encuentra en el cromosoma 4q21 y codifica para una proteína de 117-kDa. Se

expresa en numerosos tejidos, con altos niveles en el cerebro. Se encuentra particularmente en la corteza piriforme, el hipocampo y la amígdala (Karin Hochrainer et al., 2015). Respecto a su localización subcelular, la proteína se ha identificado en el citosol, en estructuras vesiculares, y en compartimentos endosomales. HERC3 posee un dominio HECT que se une a la ubiquitina. Se desconoce si su dominio RDL tiene acción GRF o GEF. Es una ubiquitina ligasa que a su vez es regulada por la ubiquitinación y probablemente interviene en el control del tráfico intracelular. El rol de HERC3 en el cáncer no es claro. Mutaciones *frameshift* en *HERC3* se han descrito en carcinomas gástricos y colorectales con inestabilidad en microsatélites. Algunos estudios muestran a HERC3 como un nuevo regulador negativo de la vía NF- κ B (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*), un complejo proteico que controla la transcripción del ADN (Hochrainer et al., 2015).

4.3.4 HERC4

El gen *HERC4* humano se localiza en el cromosoma 10q22 y codifica para una proteína de 118 kDa. Se encuentra expresado de manera ubicua en todos los tejidos, pero con niveles más altos en los testículos (Hochrainer et al., 2008). Intracelularmente, HERC4 se encuentra en el citosol y en estructuras citoplasmáticas vesiculares. Su función está relacionada con la espermatogénesis y la fertilidad masculina. La disrupción en modelos murinos del gen *HERC4* no afecta la reproducción femenina, pero reduce la fertilidad masculina. Esta reducción conduce a que el 50% de los espermatozoides disminuyan su movilidad (Rodríguez et al., 2007).

Estudios reportaron la regulación de *HERC4* en líneas celulares de cáncer de mama (Zhou et al., 2013). La expresión *HERC4* en el cáncer invasivo ductal se correlacionó positivamente con el estado clínico y el grado histológico, y se ha propuesto como biomarcador molecular. *HERC4* activa el crecimiento celular mediante la ubiquitinación de la proteína Salvador (SAV). SAV es una proteína que actúa como un regulador positivo de HIPPO (HPO), una vía supresora de tumores (Aerne et al., 2015).

4.3.5 HERC5

HERC5 es una proteína de 117 kDa. Se expresa principalmente en los testículos y el cerebro fetal, y en niveles mucho más bajos en otros órganos como los ovarios, el páncreas, el corazón, la placenta y el músculo esquelético. Al igual que otros miembros de la familia, *HERC5* se encuentra en el citoplasma, el aparato de Golgi y las estructuras vesiculares. *HERC5* está altamente expresada cuando la función de p53 está comprometida. La función de *HERC5* ha sido definida como una ubiquitina ligasa, ya que actúa como E3 ligasa para ISG15, una proteína UBL que es expresada tras la estimulación celular con el Interferón alfa (IFN α) (Wong et al., 2006). Mutaciones en *HERC5* evidencian un dramático descenso en la estimulación celular por IFN α y la ISGilación de proteínas (Dastur et al., 2006).

La ISGilación por *HERC5*, regula de manera positiva la respuesta antiviral innata. Se ha demostrado que interactúa directamente con el virus de la influenza (NS1A), inhibiendo su replicación viral. Adicionalmente, *HERC5* ha sido recientemente descrito como un gen supresor de metástasis. Estudios han sugerido a *HERC5* como biomarcador pronóstico en el cáncer hepatocelular (Wrage et al., 2015).

4.3.6 HERC6

HERC6 presenta múltiples transcritos alternativos. *HERC6* se localiza en 4q22 en la especie humana, y se encuentra con mayor frecuencia en el cerebro y los testículos. Se localiza en el citoplasma y en las estructuras de la membrana. Se desconoce la función de *HERC6*, aunque recientes estudios en ratones *knockout* lo asociaron a hipertrofia vesicular seminal severa lo que permitió sugerir que regula la morfología del saco espermático (Arimoto et al., 2015).

Por último, en esta sección, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el marco teórico presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017; Castro et al., 2013; Diggle et al., 2012; Ducat et al., 2016; Fonseca, et al., 2012a, 2012b, 2012c, 2013, 2014, 2015; L'Hôte et al., 2010; Laissue et al., 2009a, 2009b, 2016; Laissue 2015, 2017; Lakhali et al., 2008, 2009, 2010; Mitropoulos et al., 2015; Niño et al., 2013; Ojeda et al., 2011; O. Ortega-Recalde et al. 2013a, 2013b, 2015a, 2015b, 2016; Patiño et al., 2014, 2017a, 2017b, 2017c; Prada et al., 2014; Vatin et al., 2012, 2014).

5. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Cuál es la etiología molecular de una forma sindrómica de sobrecrecimiento, megalencefalia y retraso en el desarrollo psicomotor en dos pacientes colombianos?

6.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la etiología molecular en un caso sindrómico familiar de sobrecrecimiento.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar variantes de secuencia que puedan estar potencialmente relacionadas con sobrecrecimiento, megalencefalia, retraso en el desarrollo psicomotor.
- Determinar si la técnica de NGS es útil para la identificación de la etiología molecular de esta forma de sobrecrecimiento.

7.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Pacientes estudiados

Se estudiaron dos hermanos colombianos con sobrecrecimiento, megalocéfalia, hipoglicemia y retraso cognitivo. Son hijos de una pareja colombiana no consanguínea, con coeficiente intelectual normal (C1: padre y C2: madre). Talla del padre 1.73 cm y de la madre 1.63 cm, perímetro cefálico del padre 56 cm (+ 2DE) y perímetro cefálico de la madre 52 cm (-1 DE) (Figura 2). El primer paciente (P1), es de género masculino, producto del primer embarazo con preeclampsia, sin diabetes gestacional, macrosómico con peso al nacer de 4 kg (>2DE), talla al nacer de 54 cm (2 DE). Presentó hipoglicemia neonatal sin complicaciones. Durante su infancia, adolescencia y vida adulta no ha presentado más episodios de hipoglicemia. El desarrollo motor mostró un retraso marcado por hipotonía axil severa (sostén cefálico a los 18 meses, caminata a los 5 años). Cursa desde el nacimiento con convulsiones y múltiples crisis de hemiparesia. Presentó cifoescoliosis severa que requirió corrección quirúrgica (Figura 3). El segundo paciente (P2), es de género femenino, producto del tercer embarazo, sin diabetes gestacional, con peso al nacer de 4.5 kg (>2DE) y talla al nacer de 55 cm(2DE). Su desarrollo motor mostró retraso marcado, pero no tan severo como la de su hermano. Desde el nacimiento cursa con convulsiones e hipoglicemia, las cuales son manejadas con medicación anticonvulsiva y dieta respectivamente (Figura 4). Clínicamente al examen físico de los pacientes P1 y P2, de 29 y 24 años de edad respectivamente, se encuentran perímetro cefálico y talla por encima de 2D. Presenta hábito asténico, hipotonía, dolicoostenomelia, cara larga y triangular, frente prominente y ancha, cejas escasas, hipertelorismo ocular, fisuras palpebrales hacia abajo, hipoplasia malar, puente nasal prominente, paladar alto, prognatismo de moderado a severo, macrotia, cuello largo,

tórax asimétrico, cifosis severa, hiperlordosis lumbar, aracnodactilia y genitales normales. La evaluación neurológica destacó un retardo del lenguaje expresivo y marcha atáxica. Las imágenes de resonancia magnética cerebral en los pacientes evidenciaron hidrocefalia comunicante, megaloencefalia y ventriculomegalia sin anomalías cerebelares. La edad ósea fue normal. Los pacientes afectados, tienen un hermano sano de 27 años (C3) producto del segundo embarazo, con historia clínica de hipoglicemias, con talla de 1.70 cm y perímetro cefálico de 55 cm, dentro de la media para la edad y género.

La presentación de hermanos afectados hijos de padres sanos sugieren un patrón de herencia autosómico recesivo.

Figura 2. Genealogía de los pacientes afectados

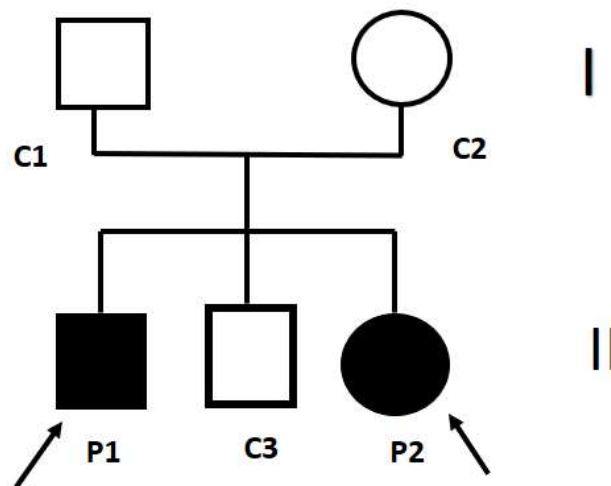


Figura 3. Paciente (P1). Género masculino, con talla > 2DE. Cara triangular, frente amplia, hipertelorismo, orejas grandes y prognatismo.



Figura 4. Paciente (P2). Género femenino, con talla > 2DE. Cara triangular, fisuras palpebrales hacia abajo y prognatismo.



7.1.1 Extracción de ADN

Se tomaron 10 ml de sangre periférica en tubos con EDTA de cada individuo participante (P1, P2, C1, C2, C3). El ADN genómico fue extraído de los leucocitos utilizando la técnica Probe/ Proteinasa K. Mediante centrifugación fueron obtenidos los leucocitos de los que se aisló el ADN. La capa de leucocitos obtenida fue sometida a lisis por adición de 500 μ l Tris-Cl, 10 mM- EDTA, 5mM pH: 8.0 frío. La lisis celular fue completada agregando 4 ml de buffer de lisis (LSN). A lo anterior se le adicionó 10 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml). Se adicionó 800 μ l de solución precipitante de proteínas y se procedió a centrifugar a 4500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcón con 3 ml de isopropanol frío 99%. Se mezcló hasta obtener la mota de ADN. La mota de ADN se transfirió a un tubo de Eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se procedió a adicionar 200 μ l de buffer TE 1X y se incubó a 4°C por 12 horas. La concentración de ADN se cuantificó en un espectofotómetro *NanoDrop 2000c* de *ThermoScientific*.

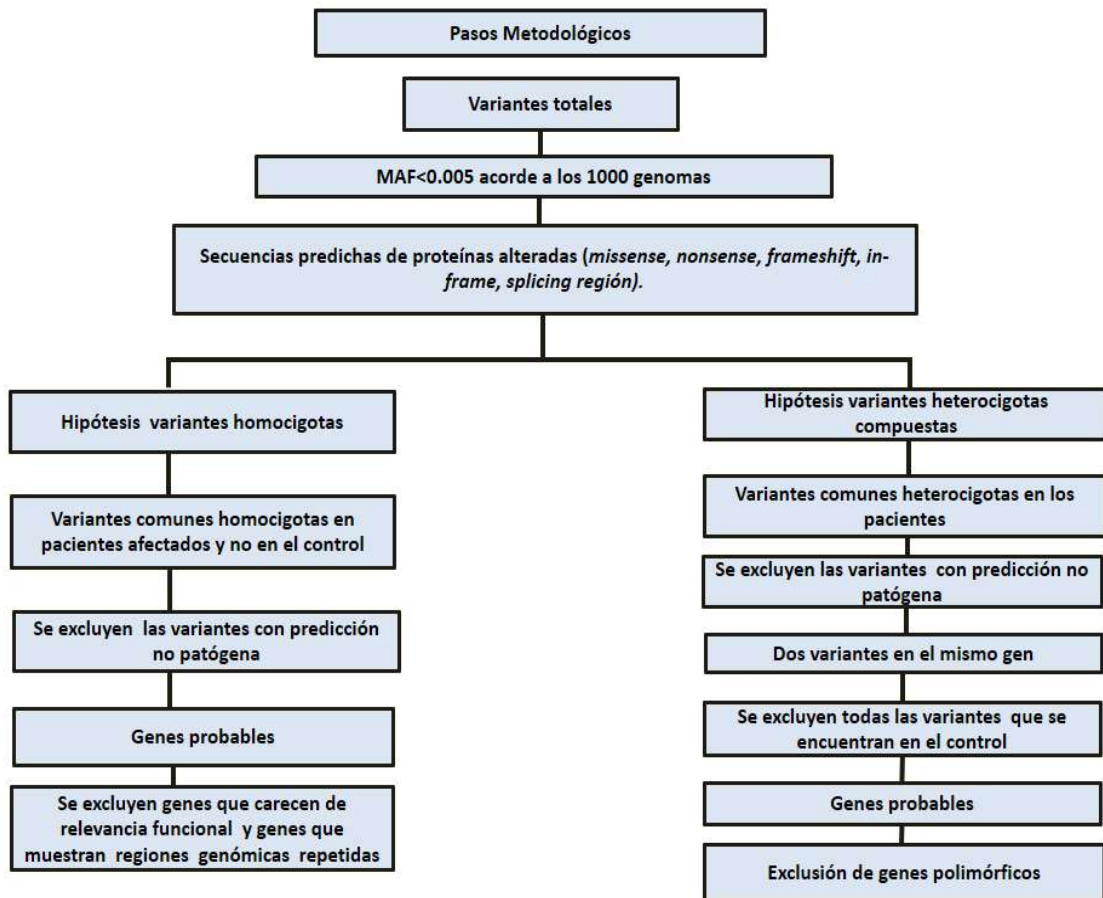
7.1.2 Secuenciación de exoma

Se utilizó un equipo *Illumina NextSeq500* para la secuenciación NGS. Los filtros de calidad fueron realizados con un Software *Casava* (*Illumina, San Diego, CA*). Las lecturas de alta calidad se alinearon con el genoma humano de referencia (*HG19 Versión GRCh37*) utilizando el algoritmo *BWA MEM* y las variantes fueron identificadas usando *samtools-0.18*. Las variantes identificadas fueron tamizadas en la base de datos dbSNP (NCBI version 137 db). Los potenciales efectos funcionales a nivel proteico inducidas por mutaciones missense fueron estudiados mediante *SIFT* y *PolyPhen2*.

7.1.3 Algoritmo de selección de variantes candidatas

El hermano y la hermana afectados, hijos de padres sanos nos sugieren un patrón de herencia recesivo. Los resultados se filtraron en este caso, considerando variantes potencialmente homocigotas o heterocigotas compuestas como causales del fenotipo. Se estudiaron las variantes que estaban ausentes en las bases de datos SNP (nuevas) o con MAF <0,005. Se seleccionaron las secuencias de proteínas predichas como alteradas (*missense, frameshift, indels*, inserciones en el marco y variantes sin sentido). En la hipótesis de variantes homocigotas se filtraron las variantes en estado homocigoto que se encontraban presentes en los pacientes afectados, y en estado heterocigota en el paciente control (C3). Se excluyeron además variantes que no eran compatibles con efectos deletéreos en la proteína (*SIFT* y *PolyPhen2* software bioinformático) y / o implicaban la sustitución de aminoácidos no conservados durante la evolución. Las variantes restantes fueron excluidas si carecían de asociación funcional con el fenotipo de nuestros pacientes, excluyendo también variantes con alta repetición genómica, las cuales llevan a falsos positivos. En la hipótesis de variantes heterocigotas compuestas se tuvieron en cuenta los mismos pasos que en la hipótesis de variantes homocigotas, se filtraron al menos dos variantes en cada gen compartidas por P1 y P2 en estado heterocigoto, ausentes en el paciente control (C3). Se excluyeron también variantes con alta repetición genómica. Herramientas bioinformáticas como *SIFT* y *PolyPhen2* se utilizaron para la selección de variantes que pudieran generar efectos patógenos en la proteína (Figura 5).

Figura 5. Algoritmo de selección de variantes candidatas.



7.1.4 Secuenciación de Sanger.

Al analizar las hipótesis de variantes homocigotas o heterocigotas compuestas que se obtuvieron al realizar el algoritmo de selección de variantes; se obtuvo un gen que se correlacionaba funcionalmente con el fenotipo descrito en los pacientes afectados. Por lo cual se procedió a realizar secuenciación Sanger en los pacientes (C1, C2, C3, P1, P2) de las siguientes variantes en el gen *HERC1*: en el exón 13 c.2625G>A (p. Trp875Ter) y exón 73 c.13559G>A (p. Gly4520Glu).

7.1.5 Diseño de primers

La secuencia de oligonucleótidos, para amplificar en el gen *HERC1* en el exón 13 c.2625G>A (p.Trp875Ter) y exón 73 c.13559G>A (p.Gly4520Glu), se diseñó empleando el programa Primer3. Este programa considera entre otros, los parámetros de temperatura de *melting*, la longitud del primer, el porcentaje de GCs, la formación de dímeros y la formación de estructuras secundarias. Los primers de PCR se diseñaron fuera de la región codificante para secuenciar todo el marco abierto de lectura correspondiente. Los primers se verificaron por medio de *BLAST*.

Tabla 2. Primers para la amplificación de *HERC1* exón 13.

Gen	Nombre	Secuencia del primer
<i>HERC1</i>	Forward HERC1-ex13-1F	5'AAAGACATCTGAAGGACTTGC 3'
	Reverse HERC1-ex13-1R	5'TGGGAATTCTTCCAGCACAACA3'
EXON 13	Forward HERC1-ex13-s1F	5'ATCCTAGTAGTCAGTGAGTTCGC3'
	Reverse HERC1-ex13-s1R	5'TATGCTCCAAGAACACATGGCA3'

Tabla3. Primers para la amplificación de *HERC1* exón 73.

Gen	Nombre	Secuencia del primer
HERC1	Forward	5'CATTGTACAGGGACAACCTTCGGC 3'
	HERC1-ex73-1F	
HERC1	Reverse	5'ATGGTGAGTCATTGGTAGATGCC 3'
	HERC1-ex73-1R	
EXON 73	Forward	5'GTTACAGTGGGCCTAGCACAG 3'
	HERC1-ex73-s1F	
EXON 73	Reverse	5' AAACATGCCTGGCACAGTGAT3'
	HERC1-ex73-s1R	

7.1.6 Amplificación del ADN

La amplificación de las regiones codificantes del exón 13 y 73 del gen *HERC1* fue efectuada en los pacientes (P1, P2, C1, C2, C3). El fragmento amplificado del exón 13 tiene una longitud de 424 pb y el exón 73 tiene una longitud de 810 pb. La reacción de PCR se realizó según las siguientes especificaciones:

Tabla 4. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del exón 13 del gen *HERC1*.

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95º	10 minutos
Numero de ciclos	35	
Desnaturalización	95º	40 segundos
Anillamiento	61º	30 segundos
Extensión	72º	30 segundos
Extensión final	72º	10 minutos

Tabla 5. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del exón 73 del gen *HERC1*.

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95º	10 minutos
Numero de ciclos	35	
Desnaturalización	95º	40 segundos
Anillamiento	61º	30 segundos
Extensión	72º	50 segundos
Extensión final	72º	10 minutos

La amplificación se comprobó analizando 5µl del producto de cada reacción de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TBE 1X. Se utilizó un patrón de peso molecular (*1kb Plus DNA Ladder*) para identificar las tallas de los fragmentos. El producto de PCR fue purificado mediante fosfatasa alcalina y exonucleasa I antes de la secuenciación. La secuenciación directa fue efectuada con el primer interno usando un secuenciador de capilares (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias fue realizado a través de alineamientos múltiples usando el programa clustalW. Se comparó

la secuencia de los pacientes frente a la secuencia *Wild Type* de los exones 13 y 73 de *HERC1* obtenida de la base de datos *Ensembl* (ID ENST00000443617.6)

7.1.7 Análisis *in silico*

Las herramientas bioinformáticas *PolyPhen2* y (*SIFT*) fueron usadas para establecer los potenciales efectos deletéreos de las variantes *missense* encontradas a nivel de la proteína. Los valores de predicción de *PolyPhen2* resultan de un algoritmo que utiliza el análisis comparativo de secuencias de proteínas de diferentes especies, las características fisicoquímicas de los aminoácidos intercambiados y el mapeo de la sustitución de residuos con respecto a las estructuras tridimensionales disponibles de las proteínas. Los resultados son evaluados como “benigna”, “posiblemente deletéreos” o “probablemente deletéreos” (Adzhubei et al., 2013). El programa *SIFT* utiliza un algoritmo que predice el impacto potencial de las sustituciones de aminoácidos en la función de la proteína. Utiliza las características de hidrofobicidad de los aminoácidos y la conservación entre especies (similitud de la secuencia de proteínas) para establecer la probabilidad de efectos deletéreos causados por mutaciones *missense* (Sim et al., 2012).

8.RESULTADOS

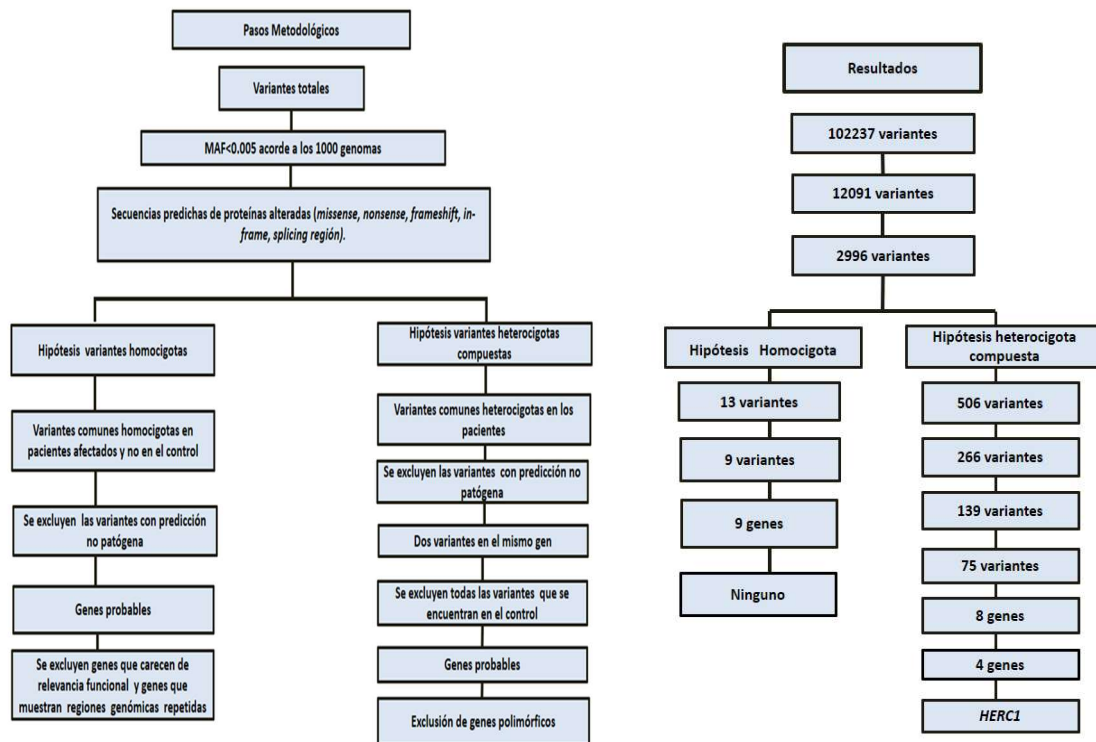
8.1 NGS

La secuenciación de siguiente generación permitió la lectura de 5.622.389.025 de bases. El promedio de cobertura y profundidad fue de 86,49% a 20 X y 43,39% a 100 X, respectivamente. Cerca del 90% de la secuencia de bases de interés fue cubierta superando el umbral establecido para la lectura adecuada de los polimorfismos de nucleótido único y los *indels* (deleciones e inserciones). La verificación de los resultados del NGS fue realizada mediante secuenciación de Sanger.

Los resultados se filtraron en este caso, considerando el algoritmo de selección de variantes (Figura 5). Sólo estudiamos variantes que estaban ausentes de las bases de datos o con MAF <0,005. Se tuvieron en cuenta las secuencias de proteínas predichas como alteradas (*missense, nonsense, frameshift, in-frame, splicing región*). Genes relacionados con trastornos de sobrecrecimiento como *NSD1, EZH2, DIS3L2, GPC3OFD1, NFIX, PTCH1* y *DNMT3A, SETD2* y *EED* se analizaron manualmente y no mostraron mutaciones homocigotas o heterocigotas. Los primeros resultados (R1), evidenciaron 13 variantes homocigotas compartidas por P1 y P2, estando de manera heterocigota en C3 (Anexo 2). Cuatro variantes missense se excluyeron ya que los análisis bioinformáticos sugirieron no tener efectos deletéreos potenciales en la proteína (*SIFT* y *PolyPhen2 Software*) y / o los aminoácidos sustituidos no estaban conservados evolutivamente. Las variantes restantes no se tuvieron en cuenta porque carecían de asociación funcional con el fenotipo de nuestros pacientes. La mayoría de estas variantes se encontraron en regiones de alta repetición genómica que con frecuencia se asocian a falsos positivos.

En la hipótesis de variantes heterocigotas compuestas se tuvieron en cuenta al menos dos variantes en cada gen compartidas por P1 y P2 en estado heterocigoto y ausentes en el paciente (C3). Dentro del grupo de genes seleccionados se encontraron ocho genes: *ANKRD36C*, *HERC1*, *KCNJ12*, *CTBP2*, *MUC16*, *MUC3A*, *PARP4* y *SLC35G4*. Las variantes c.2625G>A (p.Trp875Ter) y c.13559G>A (p.Gly4520Glu) en el gen *HERC1* eran las únicas de este grupo que sugerían un potencial efecto deletéreo en la proteína según los predictores bioinformáticos (Figura 6).

Figura 6. Resultados del algoritmo de selección de variantes de acuerdo a la metodología.

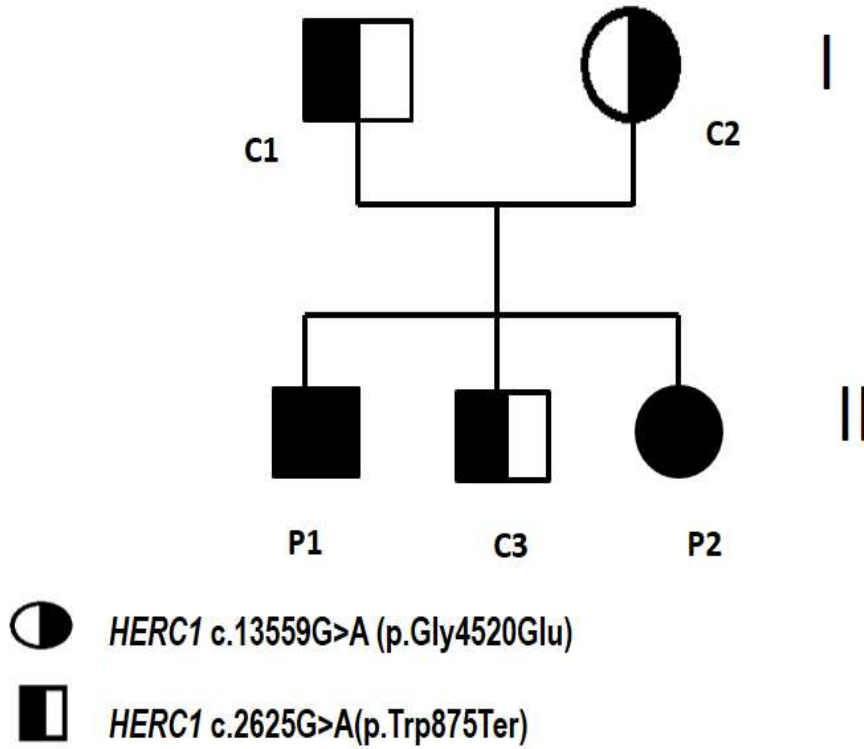


La verificación de los resultados del NGS fue realizada mediante secuenciación de Sanger confirmándose la presencia de dos variantes en el gen *HERC1*. La primera variante se encontró en el exón 13: c.2625G>A (p.Trp875Ter) y la segunda en el exón 73: c.13559G>A (p.Gly4520Glu). Se identificaron estas dos variantes en los pacientes P1 y P2. En los pacientes C1 y C3 se identificó la variante heterocigota c.2625G>A (p.Trp875Ter) y en el paciente C2 se identificó la variante heterocigota c.13559G>A (p.Gly4520Glu) (Figura 7) (Tabla 6).

Tabla 6. Variantes encontradas en la NGS

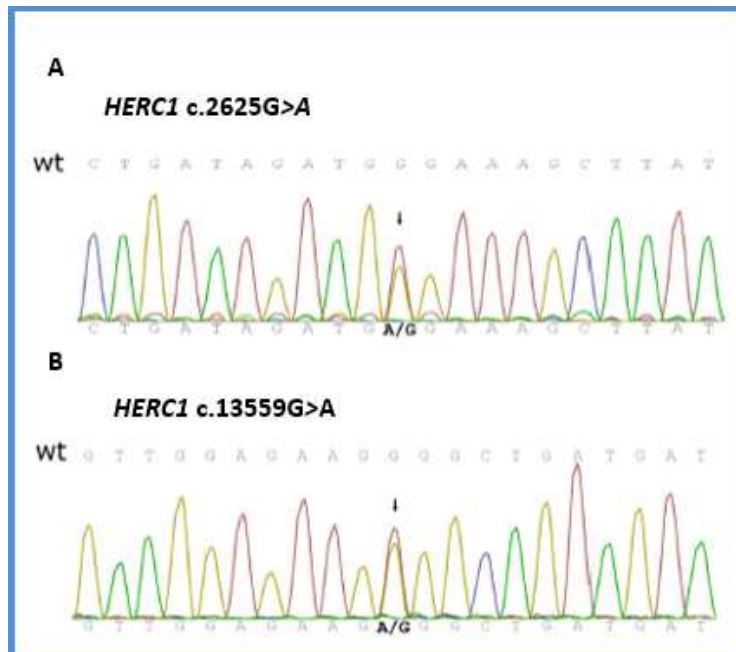
Paciente	Variante	Proteína
P1	c.2625G>A c.13559G> A	p.Trp875Ter p.Gly4520Glu
P2	c.2625G>A c.13559G> A	p.Trp875Ter p.Gly4520Glu
C1	c.2625G>A	p.Trp875Ter
C2	c.13559G>A	p.Gly4520Glu
C3	c.2625G>A	p.Trp875Ter

Figura 7. Segregación de las mutaciones c.2625G>A (p.Trp875Ter) y c.13559G> A (p. Gly4520Glu)



Estos resultados coincidieron con un trastorno recesivo con mutaciones heterocigotas compuestas transmitidas por padres no afectados.

Figura 8. Cromatograma de secuenciación de Sanger. A. *HERC1* c.2625 G>A (p.Trp875Ter) B. *HERC1* c.13559G>A (p.Gly4520Glu)



La variante c.2625G> A (p.Trp875Ter) sugiere un codón de parada prematuro en el residuo 875. La segunda variante c.13559G>A (p.Gly4520Glu) sustituyó un aminoácido neutro no polar (Glicina, Gly) por un aminoácido polar (ácido glutámico, Glu). Para *SIFT* el rango de puntuación oscila entre 0 a 1. La sustitución de aminoácidos se predice deletérea cuando la puntuación es < 0,05, y tolerada si la puntuación es > 0,05. En el caso de la variante c.13559G>A (p.Gly4520Glu) el valor fue de 0.00. El resultado para esta variante según *PolypPhen2* nos indicó una proteína “posiblemente deletérea”.

8.2 Fenotipo de los pacientes

Los síndromes de sobrecrecimiento frecuentemente se acompañan de distintas combinaciones de características clínicas. Los pacientes P1 y P2 tienen características similares a las encontradas en los síndromes de sobrecrecimiento (Tabla 7). Sin embargo, algunos hallazgos reportados en P1 y P2 como la atrofia cortical, la megaloencefalia, la edad ósea normal y el retraso del desarrollo motor y cognitivo, rara vez se encuentran juntos en el Síndrome de Sotos, el Síndrome de Weaver, y en otros síndromes de sobrecrecimiento.

Tabla 7. Características clínicas presentes en nuestros pacientes, en el síndrome de Sotos y en el síndrome de Weaver.

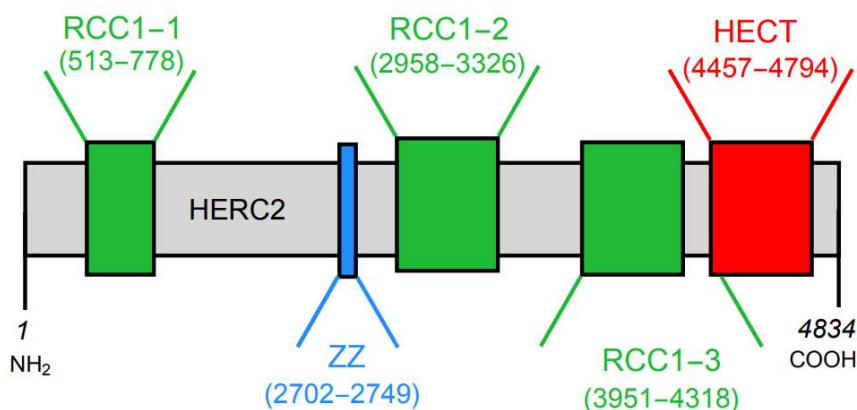
Hallazgos Clínicos		Sotos	Weaver	Nuestro estudio
Huesos	Edad ósea avanzada	Si	Si	No
Extremidades	Hiperlaxitud articular	Si	No	Si
	Genu valgo	Si	No	No
Manos	Camptodactilia	No	Si	No
Neurológico	Retraso cognitivo	Si	Si	Si
	Tono muscular	Hipotonía	Hipotonía/ Hipertonía	Hipotonía
	Convulsiones	Si	Si	Si
	Ventriculomegalia	Si	Dilatación de los ventrículos laterales	Si
	Atrofia muscular	No	No	Si
	Agnesia parcial o completa del cuerpo calloso	Si	Raro	No
	Reflejos osteotendinosos	Hiperreflexia	Normal	Normal
	Megaloencefalia	No	No	Si
Neoplasia	Tumor de Wilms / otros	Alto riesgo de tumor de Wilms	No	Aun no presente
Cabeza	Macrocráneo	Si	Si	Si
	Dolicocefalia	Si	No	No
	Occipucio aplanado	No	Si	Si
Talla		Alta	Alta	Alta
Peso		Levemente aumentado	Muy aumentado	Muy aumentado
Cara	Mentón	Prognatismo	Retrognatia	Prognatismo
	Forma del mentón	Puntiforme	Redondeado	Triangular
	Cara redonda	No	Si	No
Orejas	Gran tamaño	Si	Si	Si
Ojos	Fisuras palpebrales hacia abajo	Si	Si	Si
	Hipertelorismo	No	Si	Si
Abdomen	Hernia umbilical	No	Si	No
Corazón	Cardiopatía congénita	Si	Raro	No
Genitales	Criptorquidia	No	Si	No
Columna	Escoliosis	Si	Si	Si
	Cifosis	No	Si	Si
Nariz	Puente nasal deprimidos	No	Si	No
Cabello	Calvicie frontotemporal	Si	No	No

9. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo de tesis se fundamentó en la búsqueda de la etiología molecular en un caso sindrómico familiar de sobrecrecimiento mediante el uso de NGS. La NGS es una técnica que provee un análisis eficiente y a gran escala del genoma humano que permite la secuenciación en paralelo de millones de bases en una única reacción (Metzker, 2010). Este abordaje en nuestros pacientes con sobrecrecimiento, permitió identificar mutaciones que potencialmente contribuyen con su fenotipo.

Las variantes heterocigotas compuestas en el gen *HERC1* c.2625G>A (p.Trp875Ter) y c.13559G>A (p.Gly4520Glu) encontradas en nuestros pacientes, no han sido descritas anteriormente en las bases de datos de SNP. La variante c.2625G> A (p.Trp875Ter), es una mutación que sugiere un codón prematuro de parada en el codón 875 , lo que podría implicar la ausencia de los dominios HECT y RCC-like, ubicados en el C-Terminal de la proteína HERC1 (Figura 9).

Figura 9. Representación esquemática de HERC2, mostrando la localización de los dominios conservados, incluyendo un dominio HECT, un dedo de zinc de tipo ZZ y los dominios RCC1. Tomada y modificada de Bekker-Jensen et al. 2009.



La segunda variante encontrada (p.Gly4520Glu) implica la sustitución de un aminoácido neutro no polar (Glicina, Gly) por aminoácido polar (ácido glutámico, Glu). El aminoácido Glicina (Gly) esta conservado en los vertebrados. Este cambio podría alterar el reconocimiento y la unión a sustratos específicos de la proteína HERC1 (Figura 10).

Figura 10. Alineamientos múltiples de HERC1 entre especies de vertebrados. La posición 4520 está sombreada gris.

	4520
<i>H. sapiens</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
p.Gly4520Glu	RAWKVKLVGEGADDAGGVFDD
<i>P. troglodytes</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
<i>M. musculus</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
<i>G. gallus</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
<i>A. carolinensis</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
<i>X. tropicalis</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD
<i>D. rerio</i>	RAWKVKLVGEEADDAGGVFDD

El promedio de cobertura y profundidad de nuestro estudio fue de 86,49% a 20X respectivamente, profundidad que no es ideal para identificar nuevas variantes. El promedio de cobertura y profundidad sugerida para disminuir falsos positivos en la realización del exoma es alrededor de 50X (Buermans et al ., 2014). Siete de los ocho genes seleccionados en la hipótesis de variantes heterocigotas compuestas fueron descartados, ya que carecían de una asociación funcional con el fenotipo de nuestros pacientes, siendo las variantes encontradas en el gen *HERC1*, las que según estudios bioinformáticos sugerían efecto deletéreo en la proteína. Las herramientas bioinformáticas pueden ser útiles en la predicción de los cambios que puedan modificar la función de las proteínas. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados con

cautela y las variantes patogénicas deben ser reportados idealmente en el contexto de otras evidencias científicas que den soporte a los hallazgos (Flanagan et al., 2010).

Desde la publicación de nuestro artículo, diferentes reportes han publicado mutaciones en el gen *HERC1*, con fenotipos similares a los encontrados en nuestros pacientes. Se reportaron dos hermanos originarios del sur de la India, hijos de padres consanguíneos, con una variante homocigota c.4906-2A>C localizada en un sitio de splicing de *HERC1*. Los pacientes presentaron retraso psicomotor severo, frente prominente, hipertelorismo, cara alargada, hipotonía, edad ósea normal, y como antecedente, peso y talla altos al nacer. En este estudio se realizó RT-PCR en linfocitos de sangre periférica y se evidenciaron niveles bajos de mRNA de *HERC1* en los pacientes afectados (Aggarwal, 2016). En otro reporte de caso se describió a un paciente originario de Marruecos, hijo de padres consanguíneos, portador de una variante homocigota c.9748C>T (p.Arg3250*) en el gen *HERC1*. En el examen físico el paciente presentó retraso psicomotor severo, hipotonía, frente prominente, cara alargada, prognatismo, convulsiones. Las neuroimágenes evidenciaron megalocéfalia, cerebelo pequeño y cuerpo calloso hipoplásico. En este estudio se realizó RT-PCR en fibroblastos cultivados en células de piel, que evidenciaron niveles de mRNA de *HERC1* cincuenta veces menores que en los controles (Nguyen et al., 2015). En otro reporte de caso se describió a un paciente originario de Turquía, hijo de padres consanguíneos, con una variante homocigota c.8678dup (p.Ala2894Serfs*30) en el gen *HERC1*. Al examen físico el paciente presentó retraso psicomotor severo, hipotonía, cifoescoliosis, frente prominente, cara alargada, orejas grandes, mentón prominente, convulsiones, además peso y talla altos al nacer. Se realizó también RT-PCR en linfocitos de sangre periférica,

que no evidenció cambios en los niveles de mRNA de *HERC1* (Utine et al., 2017). Estos casos reportados permitieron asociar las variantes de *HERC1* con sobrecrecimiento y retraso psicomotor en humanos.

11.PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos funcionales mediante el cultivo de fibroblastos de la piel de nuestros pacientes, para evaluar los niveles de expresión del mRNA de *HERC1*.
- Analizar este gen en otros pacientes con sobrecrecimiento, retraso del desarrollo psicomotor correlacionando genotipo – fenotipo y postularlo con un nuevo síndrome de sobrecrecimiento.

12.ANEXOS

12.1 Anexo 1

Resultados de la filtración de variantes homocigotas

Type	Chr	Position	Gene	Ref>Variant	Type	Zygoty	Quality	Coverage	Num_Tran
K_SNP	17	39421781	KRTAP9-6	A>G/G	snv	hom	222	74	1
N_INDEL	6	161519350	MAP3K4	Cctgctgctg	deletion	hom	214	291	1
K_SNP	7	100550873	MUC3A	G>C/C	snv	hom	52	1906	1
N_INDEL	19	50881820	NR1H2	AAACA>A	insertion	hom	214	68	1
N_INDEL	1	247978541	OR14A16	AAGGAG>	deletion	hom	214	166	1
N_INDEL	11	48285981	OR4X1	CCTTCTT	deletion	hom	214	34	1
N_INDEL	16	71981414	PKD1L3	CTTTGTT	insertion	hom	214	59	1
K_SNP	1	12887549	PRAMEF1	T>C/C	snv	hom	222	804	1
K_SNP	2	130738163	RAB6C	G>A/A	snv	hom	196	377	2
N_INDEL	17	79219500	SLC38A10	AATGATG	deletion	hom	214	48	2
N_INDEL	16	18908104	SMG1	AATATAT	insertion	hom	214	215	1
N_SNP	12	11244096	TAS2R43	T>C/C	snv	hom	112	110	2
N_INDEL	5	180687428	TRIM52	CTCTTCT	deletion	hom	214	224	1

12.2 Anexo 2

Resultados de la filtración de variantes heterocigotas compuestas

Chr	Position	Gene	Ref>Variant	Type	Zygoty	Quality	Coverage	Num_Transcript	Transcripts ID	Gene_Regio	n	cDNA Position	CDS Position	Protein_Pos	Protein_Vari	Transcript_Vari	HGNC	SIFT Function Prediction	PolyPhen-2 Function Prediction
10	126678177	CTBP2	G>G/T	snv	het	100	123	2	NM_022802.2	missense_v	ariant	2993	2868	956	N/K	aaC/aaA	CTBP2, ZRANB1	deleterious(0.02)	possibly_damaging(0.547)
10	126678196	CTBP2	C>C/T	snv	het	116	99	2	NM_022802.2	missense_v	ariant	2974	2849	950	G/D	gGc/gAc	CTBP2, ZRANB1	deleterious(0)	probably_damaging(0.919)
15	63915976	HERC1	C>C/T	snv	het	116	210	1	NM_003922.3	missense_v	ariant	13707	13559	4520	G/E	gGg/gAg	HERC1	deleterious(0)	probably_damaging(0.995)
15	64026944	HERC1	C>C/T	snv	het	166	244	1	NM_003922.3	stop_gained		2773	2625	875	W/*	tgG/tgA	HERC1	--	--
19	8999514	MUC16	C>C/T	snv	het	126	413	1	NM_024690.2	missense_v	ariant	40865	40661	13554	R/H	cGc/cAc	MUC16	--	possibly_damaging(0.785)
19	9019320	MUC16	C>C/G	snv	het	110	81	1	NM_024690.2	missense_v	ariant	37771	37567	12523	D/H	Gac/Cac	MUC16	--	unknown(0)
7	100550924	MUC3A	G>G/C	snv	het	47	379	1	XM_001725354.4	missense_v	ariant	1505	1505	502	R/P	cGg/cCg	MUC3A	--	--
16	2160337	PKD1	C>C/T	snv	het	225	69	1	NM_001009944.2	missense_v	ariant, missense_v	5040	4831	1611	V/I	Gtc/Atc	PKD1	tolerated(0.06)	probably_damaging(0.999)
7	142457375	PRSS1	C>C/G	snv	het	102	247	1	NM_0027694.4	splice_regio	n_variant	57	40	14	L/V	Ctt/Gtt	PRSS1	tolerated(1)	benign(0.001)
12	11286797	TAS2R30	A>A/G	snv	het	153	176	2	NM_001097643.1	missense_v	ariant	47	47	16	I/T	aTa/aCa	PRH1-PRR4, TAS2R30	tolerated(0.46)	benign(0.074)

12.3 Anexo 3

Artículo: **Biallelic *HERC1* mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability**

Oscar Javier Ortega Recalde, MD, M.Sc., Orietta Beltrán, MD, M.Sc., Jubby Marcela Gálvez, MD, M.Sc., Alejandra Palma Montero, MD, M.Sc. , Carlos Martin Restrepo, MD, M.Sc. , PhD , Heidi Eliana. Mateus, MD, M.Sc. , and Paul Laissue M.D., Ph.D.

13.BIBLIOGRAFÍA

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, (SUPPL.76). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Aerne, B. L., Gailite, I., Sims, D., & Tapon, N. (2015). Hippo stabilises its adaptor Salvador by antagonising the HECT ubiquitin ligase Herc4. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131113>
- Aggarwal, S., Bhowmik, A. Das, Ramprasad, V. L., Murugan, S., & Dalal, A. (2016). A splice site mutation in HERC1 leads to syndromic intellectual disability with macrocephaly and facial dysmorphism: Further delineation of the phenotypic spectrum. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *170*(7), 1868–1873. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37654>
- Arimoto, K., Hishiki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Cheng, C., Yan, M., ... Shimotohno, K. (2015). Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *35*(5), 351–8. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0113>
- Balasubramanian, M., Shearing, E., Smith, K., Chavasse, R., Taylor, R., Tatton-Brown, K., ... Parker, M. J. (2014). Pneumothorax from subpleural blebs-A new association of sotos syndrome? *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *164*(5), 1222–1226. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36406>
- Baujat, G., Rio, M., Rossignol, S., Sanlaville, D., Lyonnet, S., Le Merrer, M., ... Colleaux, L. (2004). Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *74*(4), 715–20. <https://doi.org/10.1086/383093>
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... Konstantinos, D. (2009). Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>.Accurate
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>
- Buermans, H. P. J., & Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1842*(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., ... Fellous, M. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033412>
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patiño, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, *26*(16), 3161–3166. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx199>

- Castro, T., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Forero, D., Restrepo, C. M., Talero, C., ... Laissue, P. (2013). Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurological Sciences*, *34*(12), 2219–2222. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1569-4>
- Cohen, M. M. (1998). Perspectives on overgrowth syndromes. In *American Journal of Medical Genetics* (Vol. 79, pp. 234–237). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19981002\)79:4<234::AID-AJMG2>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19981002)79:4<234::AID-AJMG2>3.0.CO;2-M)
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M., & Huibregtse, J. M. (2006). Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4334–4338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512830200>
- Diggle, C. P., Parry, D. A., Logan, C. V., Laissue, P., Rivera, C., Restrepo, C. M., ... Bonthron, D. T. (2012). Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Human Mutation*, *33*(8), 1175–1181. <https://doi.org/10.1002/humu.22111>
- Diouf, B., Cheng, Q., Krynetskaia, N. F., Yang, W., Cheok, M., Pei, D., ... Evans, W. E. (2011). Somatic deletions of genes regulating MSH2 protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells. *Nature Medicine*, *17*(10), 1298–1303. <https://doi.org/10.1038/nm.2430>
- Diouf, B., Pei, D., Fan, Y., Cheng, C., Krynetskiy, E. Y., Geng, H., ... Evans, W. E. (2012). Somatic deletions of genes regulating MSH2 protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells. *Nature Medicine*, *17*(10), 1298–1303. <https://doi.org/10.1038/nm.2430>. Somatic
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8817–8822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133470100>
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., ... Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Scientific Reports*, *6*(1), 19196. <https://doi.org/10.1038/srep19196>
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ... Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, *323*(5910), 133–8. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
- Enserink, J. M. (2015). Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*, *10*, 4. <https://doi.org/10.1186/s13008-015-0010-1> [pii]
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*, *34*(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>
- Flanagan, S. E., Patch, A.-M., & Ellard, S. (2010). Using SIFT and PolyPhen to Predict Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *14*(4), 533–537. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2010.0036>
- Fonseca, D. J., Garzón, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., ... Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reproductive BioMedicine Online*, *24*(3), 339–341.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.017>

- Fonseca, D. J., Ojeda, D., Lakhali, B., Brahm, R., Eggers, S., Turbitt, E., ... Laissue, P. (2012). CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Translational Research*, 160(5), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.006>
- Fonseca, D. J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patiño, L. C., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 29(5), 627–33. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., De Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., Jiménez, K. M., ... Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility*, 104(1), 154–162.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.016>
- Fonseca, D. J., Prada, C. F., Siza, L. M., Angel, D., Gomez, Y. M., Restrepo, C. M., ... Laissue, P. (2012). A de novo 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35215>
- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Ríos, X., Uribe, C., Chávez, L., ... Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x>
- Gallagher, A., & Hallahan, B. (2012). Fragile X-associated disorders: A clinical overview. *Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6161-3>
- Galligan, J. T., Martinez-Noel, G., Arndt, V., Hayes, S., Chittenden, T. W., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2015). Proteomic analysis and identification of cellular interactors of the giant ubiquitin ligase HERC2. *Journal of Proteome Research*, 14(2), 953–966. <https://doi.org/10.1021/pr501005v>
- Galloway, J. N., & Nelson, D. L. (2009). Evidence for RNA-mediated toxicity in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Future Neurology*, 4(6), 785. <https://doi.org/10.2217/fnl.09.44>
- Gao, M., & Karin, M. (2005). Regulating the regulators: Control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.017>
- García-Gonzalo, F. R., Bartrons, R., Ventura, F., & Rosa, J. L. (2005). Requirement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate for HERC1-mediated guanine nucleotide release from ARF proteins. *FEBS Letters*, 579(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.095>
- García-Gonzalo, F. R., Muñoz, P., González, E., Casaroli-Marano, R. P., Vilaró, S., Bartrons, R., ... Rosa, J. L. (2004). The giant protein HERC1 is recruited to aluminum fluoride-induced actin-rich surface protrusions in HeLa cells. *FEBS Letters*, 559(1–3), 77–83. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00030-4)
- García-Gonzalo, F. R., & Rosa, J. L. (2005). The HERC proteins: Functional and evolutionary insights. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5119-y>

- Gardiner, K., Chitayat, D., Choufani, S., Shuman, C., Blaser, S., Terespolsky, D., ... Weksberg, R. (2012). Brain abnormalities in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158 A(6), 1388–1394. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35358>
- Gibson, W. T., Hood, R. L., Zhan, S. H., Bulman, D. E., Fejes, A. P., Moore, R., ... Jones, S. J. M. (2012). Mutations in EZH2 cause weaver syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.018>
- Graham, J. M., Burkardt, D. D. C., & Rimoin, D. L. (2013). Abnormal Body Size and Proportion. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* (pp. 1–25). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00046-X>
- Hadjebi, O., Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F. R., & Rosa, J. L. (2008). The RCC1 superfamily: From genes, to function, to disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.015>
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., ... Frazer, K. a. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biology*, 10(3), R32. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r32>
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., & Tilghman, S. M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, 405(6785), 486–489. <https://doi.org/10.1038/35013106>
- Harlalka, G. V., Baple, E. L., Cross, H., Kühnle, S., Cubillos-Rojas, M., Matentzoglou, K., ... Crosby, A. H. (2013). Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features. *Journal of Medical Genetics*, 50(2), 65–73. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101367>
- Hochrainer, K., Kroismayr, R., Baranyi, U., Binder, B. R., & Lipp, J. (2008). Highly homologous HERC proteins localize to endosomes and exhibit specific interactions with hPLIC and Nm23B. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(13), 2105–2117. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8148-5>
- Hochrainer, K., Pejanovic, N., Olaseun, V. A., Zhang, S., Iadecola, C., & Anrather, J. (2015). The ubiquitin ligase HERC3 attenuates NF- κ B-dependent transcription independently of its enzymatic activity by delivering the RelA subunit for degradation. *Nucleic Acids Research*, 43(20), 9889–9904. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1064>
- Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M., & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), 4104–15. <https://doi.org/10.1128/MCB.00289-08>
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1995 May 23;92(11):5249]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2563–2567.
- Ishikawa, K. -i. (1997). Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. VIII. 78 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. *DNA Research*, 4(5), 307–313. <https://doi.org/10.1093/dnares/4.5.307>
- Izawa, N., Wu, W., Sato, K., Nishikawa, H., Kato, A., Boku, N., ... Ohta, T. (2011). HERC2

- interacts with claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. *Cancer Research*, 71(17), 5621–5625. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0385>
- Jewell, J. L., & Guan, K. (2014). NIH Public Access, 38(5), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.004>. Nutrient
- Kang, T.-H., Lindsey-Boltz, L. A., Reardon, J. T., & Sancar, A. (2010). Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 4890–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915085107>
- Keppler-Noreuil, K. M., Rios, J. J., Parker, V. E. R., Semple, R. K., Lindhurst, M. J., Sapp, J. C., ... Biesecker, L. G. (2015). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 167(2), 287–295. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36836>
- Keppler-Noreuil, K. M., Sapp, J. C., Lindhurst, M. J., Parker, V. E. R., Blumhorst, C., Darling, T., ... Biesecker, L. G. (2014). Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 164(7), 1713–1733. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36552>
- L'Hôte, D., Laissue, P., Serres, C., Montagutelli, X., Veitia, R. A., & Vaiman, D. (2010). Interspecific resources: A major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.200900027>
- Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>
- Laissue, P. (2017). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.021>
- Laissue, P., Burgio, G., l'Hôte, D., Renault, G., Marchiol-Fournigault, C., Fradelizi, D., ... Vaiman, D. (2009). Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(4), 623–629. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082613pl>
- Laissue, P., L'hôte, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 3(1), 55–71. <https://doi.org/10.1017/S1751731108003315>
- Laissue, P., Lakhal, B., Benayoun, B. a, Dipietromaria, a, Braham, R., Elghezal, H., ... Veitia, R. a. (2009). Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *Journal of Medical Genetics*, 46(7), 455–7. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.065086>
- Laissue, P., Lakhal, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., ... Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biology*, 6(10), 160109. <https://doi.org/10.1098/rsob.160109>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03571.x>

- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: Causal mutations, variants, polymorphisms? *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03651.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghèzal, H., & Fellous, M. (2008). Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, *36*(9), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.002>
- Leamon, J. H., Lee, W. L., Tartaro, K. R., Lanza, J. R., Sarkis, G. J., deWinter, A. D., ... Lohman, K. L. (2003). A massively parallel PicoTiterPlate™ based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis*, *24*(21), 3769–3777. <https://doi.org/10.1002/elps.200305646>
- Li, X., Tan, Y. C., Poulouse, S., Olanow, C. W., Huang, X. Y., & Yue, Z. (2007). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *Journal of Neurochemistry*, *103*(1), 238–247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04743.x>
- Lindhurst, M. J., Parker, V. E. R., Payne, F., Sapp, J. C., Rudge, S., Harris, J., ... Semple, R. K. (2012). Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nature Genetics*, *44*(8), 928–33. <https://doi.org/10.1038/ng.2332>
- Maes, B., Fryns, J. P., Ghesquiere, P., & Borghgraef, M. (2000). Phenotypic checklist to screen for fragile X syndrome in people with mental retardation. *Ment Retard*, *38*(3), 207–215. [https://doi.org/10.1352/0047-6765\(2000\)038<0207:PCTSFF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1352/0047-6765(2000)038<0207:PCTSFF>2.0.CO;2)
- Martinez-Glez, V., Romanelli, V., Mori, M. A., Gracia, R., Segovia, M., Gonzalez-Meneses, A., ... Lapunzina, P. (2010). Macrocephaly-capillary malformation: Analysis of 13 patients and review of the diagnostic criteria. *Am.J.Med.Genet.A*, *152A*(1552–4833 (Electronic)), 3101–3106.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Metzker, M. L. M. L. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.*, *15*(12), 1767–76. <https://doi.org/10.1101/gr.3770505.with>
- Mitropoulos, K., Al Jaibaji, H., Forero, D. A., Laissue, P., Wonkam, A., Lopez-Correa, C., ... Patrinos, G. P. (2015). Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Human Genomics*, *9*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0033-3>
- Morales, D. J., & Lenschow, D. J. (2013). The antiviral activities of ISG15. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.041>
- Nguyen, L. S., Schneider, T., Rio, M., Moutton, S., Siquier-Pernet, K., Verny, F., ... Colleaux, L. (2015). A nonsense variant in HERC1 is associated with intellectual disability, megalencephaly, thick corpus callosum and cerebellar atrophy. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, (July 2015), 1–4. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.140>
- Niño, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejía, J. F., ... Laissue, P. (2013). Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. *JIMD Reports*, *7*, 39–48. https://doi.org/10.1007/8904_2012_138

- Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., ... Murotsu, T. (1987). Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes & Development*, *1*(6), 585–593. <https://doi.org/10.1101/gad.1.6.585>
- Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H. E., ... Laissue, P. (2011). Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertility and Sterility*, *95*(8). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.045>
- Ortega-Recalde, O., Beltrán, O. I., Gálvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., & Laissue, P. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clinical Genetics*, *88*(4), e1–e3. <https://doi.org/10.1111/cge.12634>
- Ortega-Recalde, O., Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Atuesta, J. J., Rivera-Nieto, C., Restrepo, C. M., ... Laissue, P. (2013). A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion*, *13*(6), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.03.010>
- Ortega-Recalde, O., Moreno, M. B., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Mosquera, H., ... Laissue, P. (2015). A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, *40*(7), 757–760. <https://doi.org/10.1111/ced.12627>
- Ortega-Recalde, O., Silgado, D., Fetiva, C., Fonseca, D. J., & Laissue, P. (2016). Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth–Macklin caused by a KRT1 mutation. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/bjd.14969>
- Ortega-Recalde, O., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., R??os, X., Mosquera, H., Berm??dez, O. M., ... Laissue, P. (2013). Whole-Exome Sequencing Enables Rapid Determination of Xeroderma Pigmentosum Molecular Etiology. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064692>
- Pandey, R. R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., ... Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation. *Molecular Cell*, *32*(2), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.022>
- Patino, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., ... Harrison, C. A. (2017). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency reduce expression, activity, or synergy with gdf9. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *102*(3), 1009–1019. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3503>
- Patiño, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *63*(3), 145–149. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Patiño, L. C., Battu, R., Ortega-Recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, V. R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109576>

- Patiño, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., González, R., Suárez, C. F., ... Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction*, *32*(7), 1512–1520. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex089>
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mammalian Genome*, *25*(11–12), 618–635. <https://doi.org/10.1007/s00335-014-9537-8>
- Rasmussen, M., Sunde, L., Weigert, K. P., Bogaard, P. W., & Lildballe, D. L. (2014). Segmental overgrowth syndrome due to an activating PIK3CA mutation identified in affected muscle tissue by exome sequencing. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *164*(5), 1318–1321. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36454>
- Rayasam, G. V., Wendling, O., Angrand, P., Mark, M., Niederreither, K., Song, L., ... Korsmeyer, S. (2003). NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *The EMBO Journal*, *22*(12), 3153–3163. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg288>
- Rodriguez-Revenga, L., Madrigal, I., Pagonabarraga, J., Xunclà, M., Badenas, C., Kulisevsky, J., ... Milà, M. (2009). Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *17*(10), 1359–62. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.51>
- Rodriguez, C. I., & Stewart, C. L. (2007). Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Developmental Biology*, *312*(2), 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.053>
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., & Nyrén, P. L. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry*, *242*, 84–89. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432>
- Rosa, J. L., & Barbacid, M. (1997). A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene*, *15*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201170>
- Sánchez-Tena, S., Cubillos-Rojas, M., Schneider, T., & Rosa, J. L. (2016). Functional and pathological relevance of HERC family proteins: A decade later. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(10), 1955–1968. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2139-8>
- Sherman, S., Pletcher, B. a, & Driscoll, D. a. (2005). Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *7*(8), 584–7. <https://doi.org/10.109701.GIM.0000182468.22666.dd>
- Sim, N.-L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, *40*(Web Server issue), W452–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Sparago, A., Cerrato, F., Vernucci, M., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., & Riccio, A. (2004). Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature Genetics*, *36*(9), 958–60. <https://doi.org/10.1038/ng1410>

- Tatton-Brown, K., Douglas, J., Coleman, K., Baujat, G., Cole, T. R. P., Das, S., ... Rahman, N. (2005). Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *American Journal of Human Genetics*, 77(2), 193–204. <https://doi.org/10.1086/432082>
- Tatton-Brown, K., Hanks, S., Ruark, E., Zachariou, A., Vecchio Duarte, S. Del, Ramsay, E., ... Rahman, N. (2011). Germline mutations in the oncogene EZH2 cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget*, 2(2), 1127–1133. <https://doi.org/385> [pii]
- Tatton-Brown, K., Murray, A., Hanks, S., Douglas, J., Armstrong, R., Banka, S., ... Rahman, N. (2013). Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 161(12), 2972–2980. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36229>
- Tatton-Brown, K., & Rahman, N. (2004). Clinical features of NSD1-positive Sotos syndrome. *Clinical Dysmorphology*. <https://doi.org/10.1097/00019605-200410000-00001>
- Tatton-Brown, K., & Rahman, N. (2013). The NSD1 and EZH2 overgrowth genes, similarities and differences. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 163(2), 86–91. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31359>
- Utine, G. E., Taşkıran, E. Z., Koşukcu, C., Karaosmanoğlu, B., Güleray, N., Doğan, Ö. A., ... Alikashişoğlu, M. (2017). HERC1 mutations in idiopathic intellectual disability. *European Journal of Medical Genetics*, 60(5), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.03.007>
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyat, A., ... Gris, J.-C. (2014). Polymorphisms of Human Placental Alkaline Phosphatase Are Associated with in Vitro Fertilization Success and Recurrent Pregnancy Loss. *The American Journal of Pathology*, 184(2), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.024>
- Vatin, M., Burgio, G., Renault, G., Laissue, P., Firlej, V., Mondon, F., ... Ziyat, A. (2012). Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043356>
- Visser, R., Kant, S. G., Wit, J. M., & Breuning, M. H. (2009). Overgrowth syndromes: from classical to new. *Pediatric Endocrinology Reviews : PER*, 6(3), 375–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396024>
- Walkowicz, M., Yonggang, J., Xiaojia, R., Horsthemke, B., Russell, L. B., Johnson, D., ... Stubbs, L. (1999). Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in jdf2 mice. *Mammalian Genome*, 10(9), 870–878. <https://doi.org/10.1007/s003359901106>
- Weksberg, R., Nishikawa, J., Caluseriu, O., Fei, Y. L., Shuman, C., Wei, C., ... Squire, J. (2001). Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Human Molecular Genetics*, 10(26), 2989–3000. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.26.2989>

- Weksberg, R., Shuman, C., & Smith, A. C. (2005). Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, *137C*(1), 12–23. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30058>
- Wilson, M., Peters, G., Bennetts, B., McGillivray, G., Wu, Z. H., Poon, C., & Algar, E. (2008). The clinical phenotype of mosaicism for genome-wide paternal uniparental disomy: Two new reports. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *146*(2), 137–148. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32172>
- Wit, J. M., & Schatz, D. (2015). Overgrowth syndromes : From classical to new, (April 2009).
- Wong, J. J. Y., Pung, Y. F., Sze, N. S.-K., & Chin, K.-C. (2006). HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(28), 10735–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600397103>
- Wrage, M., Hagmann, W., Kemming, D., Uzunoglu, F. G., Riethdorf, S., Effenberger, K., ... Wikman, H. (2015). Identification of HERC5 and its potential role in NSCLC progression. *International Journal of Cancer*, *136*(10), 2264–2272. <https://doi.org/10.1002/ijc.29298>
- Wu, W., Sato, K., Koike, A., Nishikawa, H., Koizumi, H., Venkitaraman, A. R., & Ohta, T. (2010). HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Research*, *70*(15), 6384–6392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1304>
- Zhou, H., Shi, R., Wei, M., Zheng, W.-L., Zhou, J.-Y., & Ma, W.-L. (2013). The expression and clinical significance of HERC4 in breast cancer. *Cancer Cell International*, *13*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-113>