



**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN
FUNCIONAL DE NUEVOS GENES Y
MUTACIONES ASOCIADAS A LA
ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA
OVÁRICA PRIMARIA (IOP): IMPLICACIÓN
DE LOS GENES *BMP15*, *BMPR2*, *MSH4*, *ATG7*,
ATG9A y *NOTCH2***

Liliana Catherine Patiño Molano

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Universidad del Rosario
2018



Centro de Investigación
en Genética y Genómica



Tesis de Doctorado
Doctorado en Ciencias Biomédicas

**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS GENES Y
MUTACIONES ASOCIADAS A LA ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA
OVÁRICA PRIMARIA (IOP): IMPLICACIÓN DE LOS GENES *BMP15*, *BMPR2*,
MSH4, *ATG7*, *ATG9A* y *NOTCH2***

Estudiante
Liliana Catherine Patiño Molano MSc

Director de tesis
Paul Laissue MD, MSc, PhD, HDR
Director del Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario
(CIGGUR)
Profesor titular de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario

Universidad del Rosario
Doctorado en Ciencias Biomédicas

2018

Aprobado por el comité evaluador en cumplimiento de los
requisitos exigidos para otorgar al título de Doctor en Ciencias
Biomédicas de la Universidad del Rosario

Dra. Luisa Marina Matheus, MSc, PhD
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad del Rosario

Dr. Claudio Alberto Mastronardi, PhD
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad del Rosario

Dr. Hernando Curtidor Castellanos, PhD
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad del Rosario
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

A mi cielo y mi pedacito de cielo

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me ha puesto en el lugar y tiempo correctos en este camino.

A mis padres quienes siempre me inculcaron el valor de la educación, la disciplina y la pasión por hacer lo que a uno más le gusta.

A manito por su apoyo y su cariño

A Santi porque su apoyo, comprensión y amor incondicional hacen que mí caminar sea más fácil y feliz

Al Profe, por su confianza en mí y en mi trabajo, por brindarme su ayuda y darme la oportunidad de aprender con él y de dejarme pertenecer al CIGGUR.

A Paula y Oscar por su amistad incondicional, creo que se crearon lazos fuertes que espero perduren por siempre

A Oscar de nuevo, por toda su ayuda en el trabajo bioinformático, sin ti, no sé qué hubiese hecho.

A Craig, Kelly y las personas del Instituto Hudson y la Universidad de Monash, por una de las mejores experiencias de mi vida, por hacerme sentir parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, su paciencia, su ayuda en todo momento y su amistad.

A mis compañeros del CIGGUR, en especial a Dorita y a los estudiantes de maestría Karen, Caro y Dani, de quienes aprendí mucho.

A Colciencias, por la financiación durante estos cuatro años de Doctorado.

CONTENIDO

Considerando el reglamento del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Rosario para los casos especiales (contar con un mínimo de cuatro artículos publicados en revistas indexadas internacionales). Se presentará a continuación el formato de tesis corta:

RESUMEN	1
SUMMARY	4
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE PUBLICACIONES	8
LISTADO LÍNEAS CELULARES	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. CAPÍTULO I.	
Identificación de mutaciones en <i>BMP15</i> en pacientes IOP y ensayos funcionales <i>in vitro</i>	13
3. CAPÍTULO II.	
Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional <i>in vitro</i>	17
3.1. Diseño de un <i>subset</i> de genes candidatos para la secuenciación específica de regiones codificantes	18
3.1.1. Estudio de la localización subcelular de <i>BMPR2</i>	18
3.2. Secuenciación de exoma en una familia afectada por IOP	19
3.3. Secuenciación de exoma en pacientes con IOP (casos no familiares)	19
3.3.1. Búsqueda de mutaciones potencialmente asociadas al fenotipo IOP.....	19
3.3.2. Identificación de una nueva mutación en el gen <i>KHDRBS1</i> (Sam68) en pacientes IOP.....	20
3.3.3. Validación funcional de las mutaciones <i>ATG7-p.Phe403Leu</i> y <i>ATG9A-p.Arg758Cys</i>	20
3.3.4. Validación funcional de las mutaciones en <i>NOTCH2</i>	22
4. CONCLUSIONES	24
5. PERSPECTIVAS	26
6. BIBLIOGRAFÍA	28
Anexos	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.

Acción de los homo/heterodímeros de BMP15 y GDF9 en diferentes especies de mamíferos... 15

Figura 2.

Diseño de *minigenes* para *MSH4* 19

Figura 3.

Etapas de la macroautofagia 21

Figura 4.

Señalización de las proteínas NOTCH 23

RESUMEN

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una patología frecuente que afecta del 1% al 3% de las mujeres de la población general menores de 40 años. No existen datos específicos en la población colombiana, lo cual sería un punto importante a determinar teniendo en cuenta que se ha reportado que esta prevalencia puede variar según el origen étnico de las pacientes. La IOP se caracteriza clínicamente por la ausencia (amenorrea primaria) o el cese de la ovulación durante al menos cuatro meses (amenorrea secundaria), con un aumento de los valores plasmáticos de FSH (hormona folículo estimulante). Aunque se han relacionado causas autoinmunes, metabólicas, infecciosas e iatrogénicas, en la mayoría de los casos su etiología es desconocida, lo que sugiere posibles causas genéticas. A pesar de numerosos intentos por determinar estas causas, solo algunos genes han sido relacionados funcionalmente con la etiología de esta enfermedad. En esta tesis de Doctorado se realizó la identificación y la validación de nuevas variantes y/o nuevos genes asociados a la etiología de la IOP.

Este trabajo de tesis se divide en dos capítulos, en el primero se describe la identificación de variantes en el gen *BMP15* y la evaluación de cómo las mutaciones en este gen contribuyen a la disfunción ovárica. Para esto se evaluó el efecto de 10 mutaciones en *BMP15* respecto a la producción del péptido maduro, la activación de la señalización de la vía SMAD y la sinergia con GDF9. La genotipificación de *BMP15* en 35 pacientes Colombianas permitió la identificación de una variante nueva (c.986C>G-p.Arg329His) y una variante previamente reportada (c.581T>C, p.Phe194Ser). La evaluación funcional de estas variantes, junto con otras 8 identificadas previamente, indicó que las mutaciones p.Leu148Phe, p.Phe194Ser y p.Tyr235Cys, están relacionadas con la reducción en la producción del péptido maduro. Las mutaciones p.Arg138His, p.Ala180Thr y p.Arg329His redujeron la actividad de BMP15 aproximadamente cuatro veces en relación con la proteína WT (*wild type*) y las variantes

p.Arg68Trp, p.Phe194Ser y p.Asn196Lys redujeron la sinergia de BMP15 con GDF9. Estos resultados sugieren que las mutaciones en *BMP15* alteran la función ovárica por diferentes mecanismos.

El segundo capítulo se focaliza en la identificación de mutaciones con un efecto moderado/severo que puedan estar potencialmente relacionadas con la etiología de la IOP mediante NGS (secuenciación de siguiente generación). Se tuvieron en cuenta tres aproximaciones: la primera consistió en el diseño de un *subset* de genes candidatos para la secuenciación específica de la región codificante de 70 genes, la segunda se centró en la secuenciación de exoma en una familia afectada por IOP y la tercera se enfocó en la secuenciación de exoma en pacientes no relacionados (casos no familiares). Estas aproximaciones permitieron la identificación de aproximadamente 60 variantes posiblemente relacionadas con la etiología de la IOP. Adicionalmente, se encontró que algunas pacientes eran portadoras de al menos dos variantes en diferentes genes, este hallazgo refuerza la hipótesis sobre la etiología poligénica de esta enfermedad.

Finalmente, se describe la validación funcional de algunas de las mutaciones identificadas. Estos ensayos experimentales *in vitro* permitieron confirmar que las mutaciones en los genes: *BMP2* (c.2960C>T-p.Ser987Phe), *MSH4* (c.2355+1G>A-p.Ile743_Arg785del), *ATG7* (c.1209T>A-p.Phe403Leu), *ATG9A* (c.2272C>T-p.Arg758Cys) y *NOTCH2* (c.5411C>T-p.Ser1804L, c.6947>T-p.Ala2316Val y c.7075C>G-p.Pro2359A) modifican la función cada una de las proteínas WT (*wild type*). sugiriendo una contribución a la etiología de la IOP.

La identificación de nuevos genes y de variantes potencialmente deletéreas, así como su validación a través de estudios funcionales, permitió aportar nuevo conocimiento en la

etiología molecular de la IOP. Estos hallazgos pueden ser utilizados para propósitos diagnósticos y/o pronósticos de la enfermedad.

SUMMARY

Primary ovarian insufficiency (POI) is a frequent pathology affecting 1% - 3% of women from the general population under 40 years old. There are not specific data related Colombian population, however, this could be an interesting point to be determinate taking account the variation of POI prevalence according ethnical origin. POI is characterized by the absence (primary amenorrhea) or the cessation of ovulation (secondary amenorrhea) for at least four months, as well as high plasmatic levels of FSH (Follicle Stimulating Hormone). Autoimmune, metabolic, infectious and iatrogenic causes have been related to the disease pathogenesis. However, in the majority of cases, the aetiology remains undiscovered. Despite numerous attempts to identify these genetic causes, only a few genes have been functionally related to POI's etiology. This Ph.D. thesis focuses on the identification and functional validation of new variants and/or new genes related to POI's etiology.

This manuscript is divided in two chapters. The first one describes the identification of new *BMP15* variants and the evaluation of how these variants may contribute to ovarian dysfunction. The effect of ten *BMP15* mutations in mature peptide production, activation of SMAD signaling and GDF9 synergy were assessed. The *BMP15* screening on 35 Colombian patients led to the identification of a new variant (c.986C>G-p.Arg329His) and a previously reported one (c.581T>C, p.Phe194Ser) associated with POI. Assessing the expression/activity of these and other 8 *BMP15* mutants allowed to describe that: (1) multiple variants, including p.Leu148Phe, p.Phe194Ser and p.Tyr235Cys reduced mature protein production; (2) other variants (p.Arg138His, p.Ala180Thr and p.Arg329His) displayed lower the activity than wild-type BMP15; and (3) some variants (p.Arg68Trp, p.Phe194Ser and p.Asn196Lys) reduced GDF9 synergy. These results showed that BMP15 mutations can disrupt ovarian function through different mechanisms.

The second chapter focuses on the identification of rare variants with a moderate/severe effect potentially related to POI's etiology. For this purpose, we used NGS (Next Generation Sequencing). We used account three approaches: the first one was performed on a gene subset (n=70). The second one was based on whole exome sequencing (WES) assays in a family affected by POI. The third one was performed using WES in non-related patients (non-familial cases). These approaches led to the identification of approximately 60 variants possibly related to POI's etiology. Furthermore, the identification of patients with at least two mutations in different genes argued in favor of a polygenic nature of POI.

Finally, we performed the functional validation of some mutations. These *in vitro* assays confirmed that mutations in *BMP2* (c.2960C>T-p.Ser987Phe), *MSH4* (c.2355+1G>A-p.Ile743_Arg785del), *ATG7* (c.1209T>A-p.Phe403Leu), *ATG9A* (c.2272C>T-p.Arg758Cys) and *NOTCH2* (c.5411C>T-p.Ser1804L, c.6947>T-p.Ala2316Val and c.7075C>G-p.Pro2359A) genes could modify the WT protein function and suggesting contribute to POI etiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMTS19	<i>ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 19</i>
ARE	Elemento de respuesta a activina/TGF- β
ARN	Ácido ribonucleico
ATG	<i>Autophagy related genes</i>
BECN1	<i>Beclin 1</i>
BMP15	<i>Bone morphogenetic protein 15</i>
BMPR2	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2</i>
BRE	<i>BRE-luciferase reporter construct</i>
CoA	Coactivadores
CoR	Corepresores
CQ	Cloroquina
FSH	Hormona folículo estimulante
GDF9	<i>Growth Differentiation Factor 9</i>
GDF9r	GDF9 recombinante
Glicosil-T	Glicosiltransferasa
HES	<i>Hes Family BHLH Transcription Factor</i>
HEY	<i>Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif</i>
IOP	Insuficiencia ovárica primaria (<i>Primary Ovarian Insufficiency</i>)
KDa	Kilodaltons
KHDRBS1	<i>KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 1</i>
KL	Kit ligando
KO	<i>Knockout</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LH	Hormona luteinizante
LHCGR	Receptor de la hormona luteinizante y la hormona gonadotropina coriónica
MAML1	<i>Mastermind-like proteins</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSH4	<i>MutS Homolog 4</i>
MSH5	<i>MutS Homolog 5</i>
MTORC	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (secuenciación de siguiente generación)
NID	Dominio intracelular de NOTCH
NOTCH2	<i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 2</i>
PIK3C3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>
PIK3R4	<i>Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4</i>
PITX1	<i>Pituitary homeobox 1 protein</i>
RB1CC1	<i>RB1 inducible coiled-coil 1</i>
RBPj κ	<i>Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>

StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
TACE	<i>Tumor necrosis factor α-converting enzyme</i>
TGF- β	Super familia de factores de crecimiento transformantes beta
ULK	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wild type</i>

LISTA DE PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis se fundamenta en las siguientes 8 publicaciones, las cuales hacen parte de los capítulos I y II del presente manuscrito. Estos artículos serán nombrados con su respectivo número de anexo.

Capítulo I. Identificación de mutaciones en *BMP15* en pacientes IOP y ensayos funcionales *in vitro*.

Anexo 1.

Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, Agapiou D, Gilchrist RB, Laissue P, Harrison CA. 2017. *BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 102(3):1009–1019.

Capítulo II. Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional *in vitro*.

Anexo 2.

Fonseca DJ*, **Patiño LC***, Suárez YC, Jesús Rodríguez A de, Mateus HE, Jiménez KM, Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, 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

*D.J.F. and L.C.P. should be considered similar in author order.

Anexo 3.

Patiño LC, 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.

Anexo 4.

Carlosama C, Elzaiat M, **Patiño LC**, Mateus HE, Veitia RA, 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.

Anexo 5.

Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. 2017. *New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing*. Human Reproduction. 32(7):1512–1520.

Anexo 6.

Carolina C*, **Patiño LC***, Beau I, Morel A, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. 2018. *A novel mutation in KHDRBS1 in a patient affected by primary ovarian insufficiency*. Clinical Endocrinology. 89(2):245-246.

*C.C. and L.C.P. should be considered similar in author order.

Anexo 7.

Delcour C, Amazit L, **Patiño LC**, Magnin F, Fagart J, Delemer B, Young J, Laissue P, Binart N, Beau I. *ATG7 and ATG9A loss-of-function mutations trigger autophagy impairment and ovarian failure*. Genetics in Medicine. *Submitted, under review*.

Anexo 8.

Patiño LC, Beau I, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. *NOTCH2 missense mutations are related to primary ovarian insufficiency molecular aetiology*. Human Mutation. *Submitted, under review*.

LISTADO LÍNEAS CELULARES

En este trabajo Doctoral se utilizaron diferentes líneas celulares en los ensayos *in vitro* de la validación funcional de algunas de las mutaciones identificadas. A continuación, se hace una relación de cada una de ellas con el número de anexo correspondiente.

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología	No. Anexo
HEK293T	Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Células embrionarias de riñón	Epitelial	Anexo 1
COV434	Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Células de la granulosa	Esférica	Anexo 1
CHO	Hamster chino (<i>Cricetulus griseus</i>)	Células de ovario	Epitelial	Anexo 3
HeLa	Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Cérvix	Epitelial	Anexo 4
COS-7	Mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	Riñón	Fibroblastos	Anexo 7
KGN	Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Células de la granulosa	fusiforme	Anexos 7 y 8

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor de 7 millones de folículos primordiales están presentes en el ovario en desarrollo durante la embriogénesis. La mayoría se pierden mediante el proceso de atresia y únicamente entre 400 y 500 son ovulados antes de la menopausia. Sin embargo, existen alteraciones tales como la disminución en el número inicial de folículos primordiales, la atresia folicular acelerada o la alteración en la maduración folicular, por las cuales una mujer puede experimentar menopausia temprana (1). Clínicamente, la insuficiencia ovárica primaria (IOP) se define como la ausencia (amenorrea primaria) o el cese de la ovulación durante al menos cuatro meses (amenorrea secundaria) en mujeres menores de 40 años, con un aumento de los valores plasmáticos de FSH (>25 UI/L) (2).

La IOP es una patología frecuente, pues afecta del 1% al 3% de las mujeres de la población general (3). No existen datos específicos en la población colombiana, lo cual sería un punto importante a determinar teniendo en cuenta que se ha reportado que esta prevalencia puede variar según el origen étnico de las pacientes. Por ejemplo, las mujeres caucásicas, afroamericanas e hispanas tienen una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad que las mujeres japonesas (4). Factores ambientales y culturales también pueden estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, el uso de hormonas, la osteoporosis y el consumo de cigarrillo se asocian al desarrollo de IOP en mujeres caucásicas. En las mujeres afroamericanas los factores asociados son el índice de masa corporal elevado y el uso de hormonas (4). Un estudio realizado en población coreana demostró que factores relacionados con la ovulación, como la menarquia tardía, la menstruación irregular y la lactancia materna prolongada, reducían significativamente el riesgo de sufrir la enfermedad (5).

La etiología de la IOP es heterogénea, pues se han descrito causas autoinmunes, metabólicas, infecciosas e iatrogénicas. Sin embargo, en más del 50% de los casos sus causas son desconocidas, lo que sugiere un posible origen genético (6). Alteraciones en los cromosomas sexuales y autosómicos se han relacionado con IOP, las cuales pueden estar o no asociadas a presentaciones sindrómicas de la enfermedad. En cuanto a la IOP no sindrómica, se han validado aproximadamente 50 mutaciones puntuales en tan solo nueve genes involucrados en los procesos de meiosis, determinación sexual, foliculogénesis y ovulación (7). La mayoría de estos genes y mutaciones se han identificado mediante la técnica de secuenciación de Sanger. Sin embargo, por la gran cantidad de genes potencialmente asociados a la etiología de la IOP, en los últimos años, la secuenciación de siguiente generación (NGS)

ha permitido identificar eficientemente nuevos genes y mutaciones causales del fenotipo (8). Este abordaje experimental hace parte de este trabajo de tesis (ver más adelante).

El objetivo principal de esta tesis consistió en identificar y validar mediante ensayos funcionales nuevas variantes y/o nuevos genes asociados a la etiología de la IOP. La identificación de nuevos marcadores moleculares ofrecerá a la comunidad médica y científica nuevos elementos para la comprensión de los mecanismos genéticos responsables de esta patología y ayudará a mejorar las herramientas diagnósticas actuales. De esta manera, permitirá que las mujeres IOP y sus familias se beneficien de tratamientos tempranos como la criopreservación de óvulos o la planeación de un embarazo con anticipación.

El presente trabajo de tesis se desarrolló en dos capítulos. En el primero se describe la identificación de nuevas mutaciones en *BPM15*, un gen que cumple numerosas funciones en el ovario (ver más adelante). Se evaluaron 10 mutaciones, una nueva y 9 previamente reportadas.

El segundo capítulo consistió en la identificación de nuevos genes mediante la herramienta de NGS y la validación funcional de algunos de ellos por experimentos *in vitro*. Los resultados presentados permiten aportar nuevo conocimiento en la etiología molecular de la IOP. El producto final de este trabajo se materializó en ocho artículos científicos, 6 aceptados y 2 sometidos.

A continuación se realizará la introducción de los dos capítulos de esta tesis.

2. CAPÍTULO I

Identificación de mutaciones en *BMP15* en pacientes IOP y ensayos funcionales *in vitro*

El gen *BMP15* (*Bone morphogenetic protein 15*) codifica para una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes β (TGF- β), los cuales cumplen numerosas funciones en el desarrollo y en la homeostasis de prácticamente todos los tejidos. Está ubicado en el cromosoma X (Xp11.22) y se expresa en el ovario, en testículos y en la hipófisis (9–11). Específicamente en el ovario, *BMP15* se expresa en los oocitos desde los estadios tempranos de la foliculogénesis hasta los más avanzados de la maduración folicular (9). Inicialmente, la proteína BMP15 estimula la proliferación de células de la granulosa de una manera independiente de FSH (12). En estadios tardíos es capaz de modular el efecto de la FSH mediante la supresión de la expresión del receptor de la FSH (FSHR) en las células de la granulosa. Adicionalmente, BMP15 inhibe la expresión de las proteínas StAR (proteína reguladora aguda esteroideogénica), Cyp11a1, 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa, receptor de la LH y las subunidades de inhibina/activina (13), proteínas involucradas en procesos de esteroideogénesis. Adicionalmente, en el proceso post-ovulatorio actúa sobre la expansión y el metabolismo de las células del cúmulo (14,15). De manera interesante, la expresión de BMP15 estimula la producción de KL (Kit-ligando) en las células de la granulosa, KL vía c-kit inhibe la expresión de BMP15, produciéndose un *feedback* negativo. El incremento de la expresión de KL y la subsecuente reducción en la acción de la FSH permite la inducción de la proliferación de las células de la granulosa (12).

En cuanto a procesamiento de esta proteína, BMP15 es sintetizada como un pro-péptido, en el cual la región N-terminal corresponde a un péptido señal y un prodominio, y la región C-terminal al péptido maduro. Una vez el péptido señal se ha removido, la pre-proteína se dimeriza. Pre-BMP15 tiene la capacidad de formar homodímeros (BMP15:BMP15) o heterodímeros cuando se une con GDF9, otro miembro de la familia TGF- β (BMP15:GDF9) (16). De esta manera, BMP15 es secretada desde el oocito como dímeros de pro-péptido y péptido maduro unidos de manera no-covalente. En la región extracelular y posterior a la dimerización, proteasas como la furina clivan las pre-proteínas en la región conservada RXXR (17,18), para luego unirse el péptido maduro a sus receptores tipo serina treonina quinasa localizados en la superficie de las células de la granulosa. Esta interacción activa las

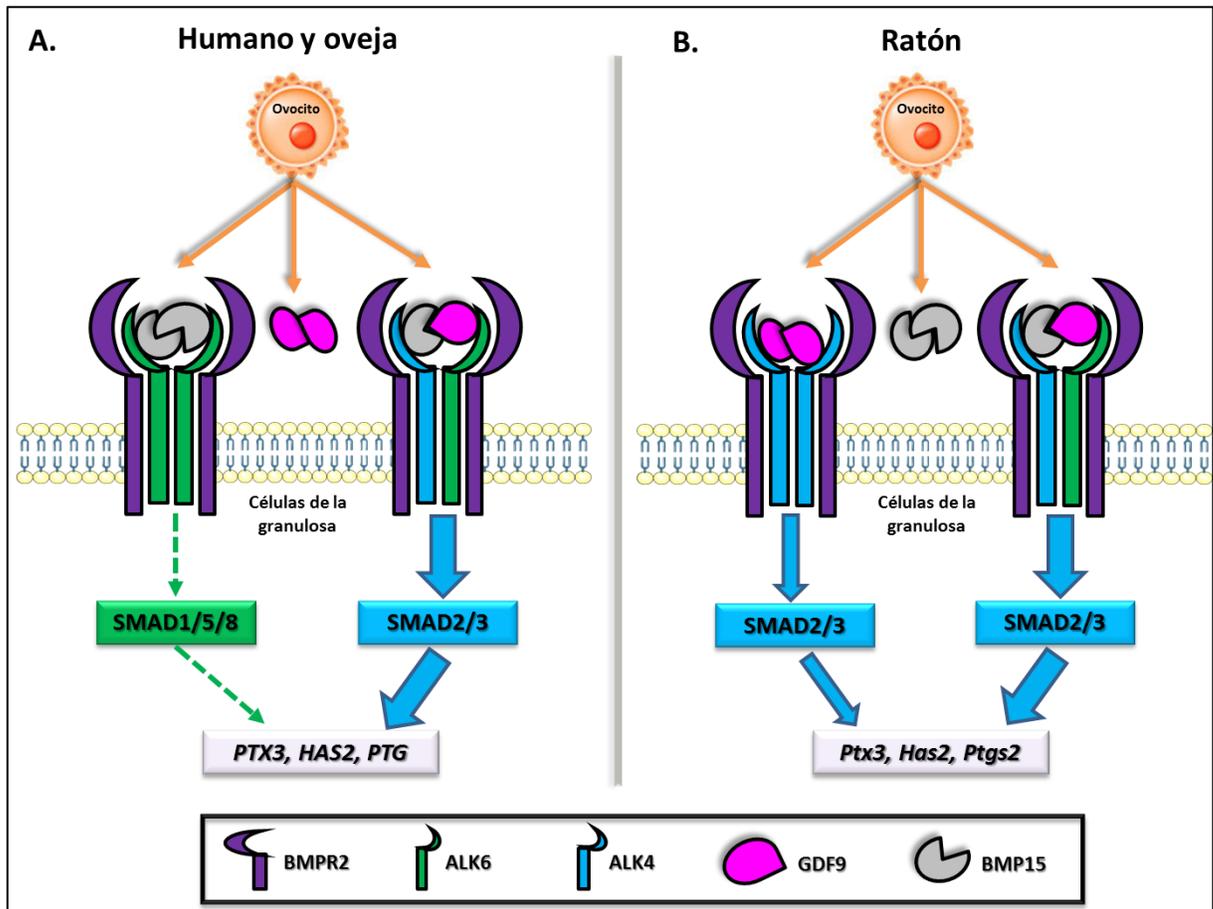
proteínas citoplasmáticas SMAD, las cuales se translocan al núcleo y transactivan a genes específicos involucrados en la expansión de las células del cúmulo (e.g. *PTX3*, *HAS2* y *PTGS2*) (19) (**Figura 1**).

La relación entre las mutaciones en *BMP15* y los fenotipos ováricos se inició con la identificación de dos mutaciones en ovejas (p.Val299Asp y p.Gln291Ter), las cuales, en estado heterocigoto mostraron un incremento en la tasa de ovulación y en el tamaño de las camadas, mientras que en estado homocigoto mostraron infertilidad debido al bloqueo de la foliculogénesis en el estadio primario (20). Posteriormente, ratones *knockout* (KO) para *Bmp15* (*Bmp15*^{-/-}) mostraron una ligera disminución en el número de las camadas, pero sus ovarios fueron similares a los de ratones heterocigotos (*Bmp15*^{+/-}) o a los de ratones control, debido a que estos ovarios contenían folículos en todos los estadios del desarrollo folicular (21). Estos resultados diferenciales entre especies pueden estar relacionados con la respectiva actividad de los homo/heterodímeros demostrado por Peng y colaboradores. Los homodímeros (BMP15:BMP15) son activos en humanos y ovejas (especies mono-ovulatorias), mientras que son inactivos en el ratón (especie poliovulatoria). No obstante, los heterodímeros (BMP15:GDF9) son activos en las tres especies, especialmente en ovejas y humanos (**Figura 1**) (19).

En humanos, Di Pasquale y colaboradores describieron en 2004 la primera mutación en *BMP15* causante de IOP (10). La mutación heterocigota (c.704A>G, p.Tyr235Cys) fue identificada en dos hermanas con amenorrea primaria y secundaria, la cual, según estudios funcionales mostró un efecto dominante negativo al disminuir la proliferación de las células de la granulosa (10). Actualmente, alrededor de 1000 pacientes IOP provenientes de diferentes regiones del mundo han sido genotipificadas para *BMP15* con el fin de identificar mutaciones asociadas al fenotipo (10,22–29). Sin embargo, sólo algunas han sido evaluadas funcionalmente (29,30).

En el presente trabajo de tesis se realizó la genotipificación de *BMP15* en 35 pacientes colombianas con IOP, y la evaluación de la función de acuerdo a potenciales cambios de expresión, actividad biológica y efecto sinérgico con GDF9.

Figura 1. Acción de los homo/heterodímeros de BMP15 y GDF9 en diferentes especies de mamíferos.
A. En los humanos y las ovejas la actividad de los homodímeros GDF9:GDF9 es casi nula. Los homodímeros BMP15:BMP15 se unen a BMPR2 y ALK6 para regular la actividad de genes responsables de la expansión de las células del cúmulo mediante la vía de señalización SMAD1/5/8, mientras que en heterodímero GDF9:BMP15 se une al complejo de receptores BMPR2/ALK4/ALK6 transmitiendo una señal muy potente mediante la vía de señalización SMAD2/3. **B.** En el ratón, el dímero Bmp15:Bmp15 es inactivo, pero el heterodímero se comporta de manera similar en humanos y ovejas. Modificado de: (19).



El artículo publicado con los resultados de este capítulo (**Anexo1**) describe la identificación de una variante nueva en el gen *BMP15* (c.986G>A, R329H) en una paciente IOP colombiana. Esta mutación junto con otras nueve previamente reportadas, fueron caracterizadas funcionalmente. Se evaluó la producción del péptido maduro luego de la transfección con los plásmidos *BMP15*-WT y mutantes. Se realizó una cuantificación de la banda obtenida en el WB (*western blot*), con el peso esperado correspondiente al péptido maduro (~17 KDa) mediante densitometría, como referencia se tuvieron en cuenta diferentes cantidades de proteína BMP15 recombinante (R&D Systems) sembrados en el mismo gel. Para la evaluación de la bioactividad de BMP15, las células de la granulosa COV434 fueron tratadas con diferentes concentraciones de proteína recombinante purificada mediante

cromatografía de afinidad con el anticuerpo anti-FLAG, seguido de la evaluación de la activación transcripcional de la vía de señalización SMAD1/5/8 (activada por los homodímeros BMP15:BMP15) con el constructo reportero BRE (BRE-luciferase reporter construct) (31). Adicionalmente, se realizaron ensayos similares para evaluar la sinergia con GDF9 utilizando el elemento de respuesta a activina/TGF- β (ARE) y adicionando al tratamiento proteína GDF9 recombinante (GDF9r). Finalmente, se cultivaron células de la granulosa de ratones hembra (C57BL/6), las cuales se trataron con las proteínas BMP15 recombinantes junto con GDF9r para analizar los niveles de expresión de genes responsables de la expansión de las células del cúmulo (*Ptx3*, *Ptgs2* y *Tnfaip6*) (19).

Los resultados demostraron que las mutaciones en *BMP15* disminuían la función de la proteína por tres mecanismos: 1) La disminución en la expresión del péptido maduro (mutaciones R138H, L148P, F194S, Q211X, Y235C); 2) La disminución de la actividad de BMP15 (R138H, R329H) y 3) la inhibición del sinergismo con GDF9 (R68W, F194S, N196K). Estos resultados indicaron que la alteración de cualquiera de estos mecanismos era capaz de modificar la función ovárica (**Tabla 1**).

Tabla 1. Evaluación de las mutaciones en BMP15 respecto a la expresión del péptido maduro, su bioactividad y la acción sinérgica con GDF9. Las variantes evaluadas disminuyen o bloquean alguno de estos tres mecanismos.

hBMP15	Expresión	Actividad	Sinergia
WT	++++	++++	++++
R68W	++++	+++	+
R138H	+	+	+++
L148P	+	++++	++++
A180T	+++	++	+++
F194S	++	+++	+
N196K	++++	+++	+
R206H	++++	+++	+++
Y235C	++	++++	+++
R329H	++++	+	+++
Q211X	-	-	-

3. CAPÍTULO II

Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional *in vitro*

El segundo capítulo de esta tesis de doctorado se focalizó en la identificación de mutaciones con un efecto moderado/severo que pudieran estar potencialmente relacionadas con la etiología de la IOP, utilizando la técnica de NGS. Los genes involucrados en los procesos, desde la determinación sexual hasta la ovulación, son particularmente interesantes de evaluar ya que sus mutaciones podrían contribuir con esta etiología. Estas etapas involucran cientos de genes que se sobreponen en las diferentes cascadas moleculares que regulan la biología ovárica. Como se mencionó anteriormente, numerosos genes se han analizado principalmente mediante la secuenciación de Sanger con el fin de identificar variantes que contribuyan con la etiología de esta enfermedad. A pesar de que esta técnica continúa proporcionando la mayor especificidad para la identificación de variantes genómicas puntuales, permite únicamente el análisis de hasta 700 pb en cada reacción, lo que constituye una limitación para el estudio de regiones extensas del genoma. Por esta razón, en este capítulo se utilizó la técnica de NGS, la cual permite procesar millones de nucleótidos de manera simultánea y eficiente (32). Adicionalmente, algunas de las variantes identificadas fueron evaluadas mediante ensayos *in vitro* para confirmar su posible patogenicidad y de esta manera, su asociación con la enfermedad.

La identificación de mutaciones potencialmente causales en el segundo capítulo de esta tesis se realizó de acuerdo a tres aproximaciones:

- Diseño de un *subset* de genes candidatos para la secuenciación específica de regiones codificantes (**Sección 3.1.**)
- Secuenciación de exoma en una familia afectada por IOP (**Sección 3.2.**)
- Secuenciación de exoma en pacientes con IOP (casos no familiares) (**Sección 3.3.**)

Estas aproximaciones serán detalladas a continuación.

3.1. Diseño de un *subset* de genes candidatos para la secuenciación específica de regiones codificantes

Para esta aproximación, se realizó la secuenciación de la región codificante de 70 genes candidatos en 12 pacientes colombianas con IOP. Estos genes fueron escogidos teniendo en cuenta: su expresión en el ovario, modelos animales con IOP, ensayos funcionales previos positivos y moléculas que hubieran mostrado previamente una relación directa con el fenotipo IOP. Se identificaron cuatro variantes heterocigotas en tres pacientes: *ADAMTS19*-p.Thr943Ile, *BMPR2*-p.Ser987Phe, *LHCGR*-p. Asn99Ser y *LHCGR*-p.Ser176Pro. La conservación evolutiva de los residuos mutados sugirió un efecto patogénico según el análisis *in silico*. De manera interesante, una de las pacientes presentaba dos mutaciones (*BMPR2*-p.Ser987Phe, *LHCGR*-p.Asn99Ser). Estos resultados permitieron sugerir, por primera vez en la literatura, un efecto aditivo implicado en la etiología de la IOP (**Anexo 2**). Entre las mutaciones identificadas por esta aproximación, la mutación *BMPR2*-p.Ser987Phe fue evaluada mediante ensayos *in vitro* para determinar su posible patogenicidad.

3.1.1. Estudio de la localización subcelular de BMPR2

El gen *BMPR2* (*bone morphogenic protein receptor type 2*) codifica para un receptor tipo serina treonina quinasa miembro de la familia de los TGF- β . Actúa como un receptor de las proteínas solubles BMPs junto con los receptores de tipo I para la activación de la cascada de proteínas SMAD mediante series de fosforilación. Como se indicó anteriormente, corriente abajo, el complejo de proteínas SMAD se transloca al núcleo y produce la transcripción de genes diana. Las mutaciones heterocigotas en *BMPR2* se han relacionado con el desarrollo de hipertensión pulmonar primaria (33). En el ovario, esta proteína se expresa en oocitos y en células de la granulosa en todos los estadios foliculares a excepción de los folículos primordiales y actúa como un receptor de los homo/heterodímeros de GDF9 y BMP15 (34).

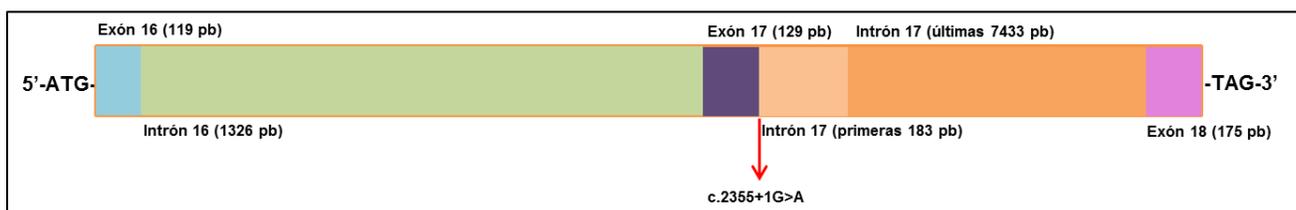
En este trabajo de tesis, se evaluaron las diferencias en los perfiles de localización subcelular de la proteína BMPR2 luego de la transfección de constructos con las versiones WT (*wild type*) y mutante (*BMPR2*- p.Ser987Phe) en células CHO. Se establecieron categorías fenotípicas y se realizó un recuento celular el cual indicó un perfil de localización subcelular anormal para las células que expresaban la proteína mutante. Se determinó que las células transfectadas con el constructo mutante se relacionaban con la categoría fenotípica “ER+” (un patrón similar a la formación de agregados en la

región perinuclear que se colocalizaba con la tinción del retículo endoplasmático), sugiriendo una posible agregación de la proteína mutante en este organelo celular (**Anexo 3**).

3.2. Secuenciación de exoma en una familia afectada por IOP

En la segunda aproximación experimental para la identificación de mutaciones por NGS, se realizó la secuenciación de exoma completo de dos hermanas con IOP y una hermana sana pertenecientes a una familia proveniente de Boyacá (Colombia). Luego del análisis de los datos y la filtración de las variantes, se identificó una mutación en el sitio donador del *splicing* en el gen *MSH4* (*MutS Homolog 4*). La función de la proteína MSH4 consiste en formar un complejo con MSH5, para estabilizar y preservar las uniones de *Holliday* durante la meiosis I, asegurando una adecuada segregación cromosómica (35,36). Mediante la técnica de minigenes (*exon trapping*), se generó un *cassette* funcional con o sin la mutación (c.2355+1G>A) (**Figura 2**). Estos plásmidos fueron transfectados en células HeLa para estudiar el efecto de la mutación sobre los transcritos post-transfección. La secuenciación de la RT-PCR demostró que la mutación generó la proteína predicha p.Ile743_Arg785del como consecuencia de la delección del exón 17. Nuestros ensayos sugirieron que la mutación identificada mediante el análisis de exoma en esta familia estaba asociada con la etiología de la IOP (**Anexo 4**). Además, este estudio permitió por primera vez describir una mutación en *MSH4* relacionada con el fenotipo.

Figura 2. Diseño de minigenes para MSH4. Esquema de los constructos realizados mediante *exon trapping* desde la región codificante para el exón 16 hasta la región codificante para el exón 18, con un codón de inicio y de parada artificial. La versión WT no tenía la mutación (c.2355+1G>A).



3.3. Secuenciación de exoma en pacientes con IOP (casos no familiares).

3.3.1. Búsqueda de mutaciones potencialmente asociadas al fenotipo IOP

En esta aproximación efectuamos la secuenciación de exoma completo en pacientes no relacionados con IOP. Se realizó el análisis de un *subset* de 420 genes candidato en los exomas de 69 mujeres

caucásicas con IOP. En 33 de las 69 pacientes (48%) se identificaron mutaciones potencialmente relacionadas con la enfermedad. En total, se identificaron 55 variantes en 49 genes. Adicionalmente, entre las pacientes con mutaciones identificadas, el 42% presentaban al menos dos mutaciones en diferentes genes. Esto permitió sugerir nuevamente una etiología poligénica de esta patología (**Anexo 5**).

3.3.2. Identificación de una nueva mutación en el gen *KHDRBS1* (*Sam68*) en pacientes IOP.

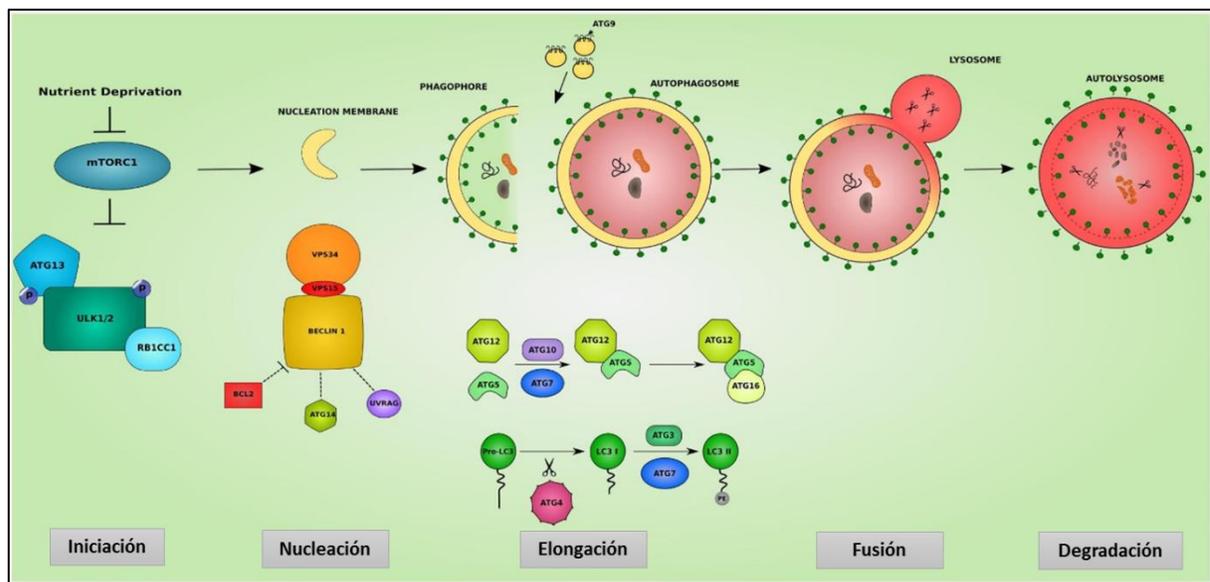
Es importante señalar que los datos obtenidos de la NGS se pueden reanalizar de acuerdo a nuevos hallazgos y la formulación de nuevas hipótesis. Wang y colaboradores en el 2017 identificaron una mutación en el gen *KHDRBS1* (*Sam68*) en pacientes IOP. Los autores describieron que la mutación heterocigota c.460A>G (p.Met154Val) alteraba la expresión del mRNA y el *splicing* alternativo de diferentes genes blanco, aumentando el riesgo de desarrollar IOP (37). De acuerdo a estos hallazgos, re-analizamos nuestros datos de secuenciación de exomas de pacientes IOP buscando variantes en este gen y disminuyendo la astringencia de algunos filtros presentados en el Anexo 5. Se identificó la mutación p.Pro296Leu. El residuo Pro²⁹⁶ se encontró altamente conservado en la evolución. Además, está ubicado en una región rica en prolinas, la cual permite la interacción proteína-proteína mediante los dominios SH3. Esta evidencia permitió sugerir que la mutación podría disminuir la unión de Sam68 al ARN (38) y asociarse con la etiología de la IOP. Esta variante es candidata a ser evaluada mediante ensayos *in vitro* (**Anexo 6**).

3.3.3. Validación funcional de las mutaciones *ATG7*-p.Phe403Leu y *ATG9A*-p.Arg758Cys.

Los genes *ATG* (*autophagy related genes*) son los principales reguladores de la macroautofagia (de ahora en adelante autofagia), proceso en el cual se engloba el citoplasma en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, para posteriormente fusionarse con los lisosomas y degradar su contenido (39). La autofagia basal es importante en el mantenimiento de la función celular de proteínas y organelos. Bajo condiciones de estrés, la autofagia principalmente se encarga de suplir los nutrientes necesarios para la supervivencia celular. Este proceso está bajo el control de múltiples proteínas ATG, pero solo la proteína LC3 y los miembros de la familia de proteínas ATG8 permanecen anclados en la membrana del autofagosoma (40). La forma citosólica de la proteína LC3 (LC3-I) se conjuga con fosfatidil etanolamina para formar el conjugado LC3-fosfatidil etanolamina (LC3-II), el cual es reclutado en la membrana del autofagosoma. LC3 actúa como un sustrato autofágico, por lo cual, esta proteína ha sido ampliamente utilizada para evaluar la actividad autofágica (41) (**Figura 3**). En el ovario, los procesos de autofagia constituyen un mecanismo de

supervivencia celular para mantener el número inicial de células germinales antes del establecimiento del *pool* de folículos primordiales (42). Los estudios de Song, *et al.* (2015) en modelos murinos mostraron que la deficiencia del gen *Atg7* en células germinales disminuía el número de folículos tanto primordiales como activados, resultando en ratones con fenotipo de IOP (43).

Figura 3. Etapas de la macroautofagia. El proceso de macroautofagia consiste en diferentes etapas. La **iniciación** comienza con la formación del complejo ULK1/ULK2 y ATG13 el cual está bajo el control del complejo MTORC1. La segunda etapa consiste en la **nucleación** de la membrana autofágica, lo cual es controlado por el complejo de nucleación formado por las proteínas PIK3C3/VPS34, BECN1 y PIK3R4/VPS15. Este punto es considerado un *check point* ya que la proteína BECN1 interactúa con proteínas reguladores de la apoptosis (ATG14, UVRAG y BCL2). Luego el fagóforo comienza un proceso **elongación** para la formación del autofagosoma. Este paso involucra dos sistemas de conjugación donde interviene la proteína ATG7 e involucra la proteína transmembranal ATG9 en el reclutamiento doble membranas. El autofagosoma ya formado se **fusiona** con el lisosoma para llevar a cabo la **degradación** lisosomal. Modificado de: (44)



En este trabajo de tesis, se evaluó el efecto funcional de dos mutaciones en dos genes relacionados con autofagia (*ATG7*-p.Phe403Leu y *ATG9A*-p.Arg758Cys). La mutación en *ATG7* fue identificada en nuestro estudio de 2017 (**Anexo 5**). La mutación *ATG9A*-p.Arg758Cys la identificamos realizando un nuevo análisis de los datos de los 69 exomas IOP (**Anexo 5**). La validación funcional para estas variantes se realizó, luego de la transfección de las versiones WT y mutantes, y luego de la inducción de la autofagia, de la siguiente manera: 1) Teniendo en cuenta que la proteína LC3-II se asocia con la membrana del autofagosoma resultando en la formación de estructuras punteadas, estas estructuras fueron visualizadas y cuantificadas mediante el marcaje de LC3-II endógeno observado por inmunofluorescencia mediante microscopia confocal. 2) Se monitoreó por WB la expresión de LC3-II luego del tratamiento con cloroquina (CQ, inhibidor de la función lisosomal) a las 2 y 4 horas. Los

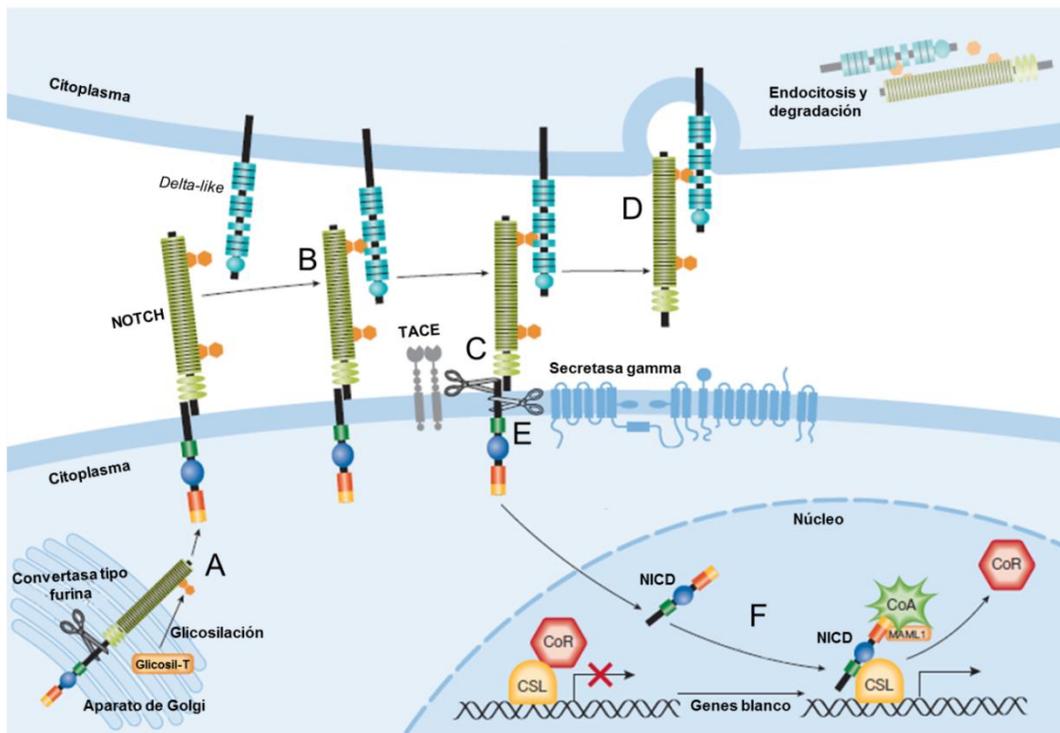
resultados presentados en el **Anexo 7** muestran una disminución en la cantidad estructuras punteadas en las células que expresan las proteínas mutantes en relación con las proteínas WT. Adicionalmente, en la cuantificación por WB se observó que los niveles de LC3-II en las células que expresaban las proteínas WT aumentaron luego de las 2 y 4 horas de tratamiento con CQ, mientras que en el caso de las células que expresaban las proteínas mutadas, los niveles de LC3-II a las 2 y 4 horas no cambiaron. Estos resultados demostraron por primera vez la posible relación de mutaciones en los genes ATG con la patogénesis de la IOP (**Anexo 7**).

3.3.4. Validación funcional de las mutaciones en *NOTCH2*.

Se ha demostrado que la vía de señalización de NOTCH es un medio importante de comunicación intrafolicular. En el ovario, esta vía se activa con la interacción de los receptores NOTCH con los ligandos transmembranales JAGGED1 y JAGGED 2 (45). La señal inducida por la unión con el ligando involucra el clivaje de las proteínas NOTCH, liberando el dominio intracelular (NID) el cual es translocado al núcleo. De esta manera, el NID forma un complejo con la proteína RBP κ (conocida en mamíferos como CSL) y activa la transcripción de genes de la familia *HEY* y *HES*. Estos últimos codifican para proteínas encargadas de la represión de la transcripción (46) (**Figura 4**). Estudios previos han demostrado la importancia de NOTCH2 en la formación de los folículos primordiales y en la regulación de la esteroidogénesis (47,48). En este trabajo de tesis se evaluó el efecto funcional de mutaciones previamente reportadas por nuestro grupo (**Anexo 5**): NOTCH2-p.Ser1804L, NOTCH2-p.Gln1811His y NOTCH2-p.Leu2408H, y de otras dos identificadas mediante un nuevo análisis de los datos presentados en el Anexo 5: NOTCH2-p.Ala2316Val, NOTCH2-p.Pro2359A. Se utilizó un plásmido con un elemento de respuesta de la vía de señalización de NOTCH que permite la expresión de la luciferasa como gen reportero (12XCSL-pGL4). Las mutaciones NOTCH2-p.Ser1804Leu, NOTCH2-p.Ala2316Val, y NOTCH2-p.Pro2359Ala, tuvieron un impacto funcional demostrado por los niveles significativamente menores de la expresión de la luciferasa en relación con las células que expresaban la proteína WT (**Anexo 8**).

Figura 4. Señalización de las proteínas NOTCH.

A. Los receptores NOTCH son glicosilados en el aparato de Golgi, donde además son clivados por una convertasa tipo furina. Durante su transporte hacia la superficie celular son expresados como heterodímeros. **B.** La unión receptor-ligando activa la vía de señalización. **C.** Se produce un primer clivaje en el dominio extracelular a cargo de la metaloproteínasa TACE (*tumor necrosis factor α -converting enzyme*). **D.** El dominio extracelular es endocitado por la célula vecina, este proceso es controlado por ubiquitin-ligasas. **E.** El segundo clivaje se presenta en el dominio transmembranal y es mediado por la una secretasa-gamma y un complejo multi-proteico de presenilinas. **F.** El dominio intracelular de NOTCH (NICD) que se ha liberado se transloca al núcleo donde se une al factor de transcripción CSL (CBF1 en humanos). Esta interacción permite la activación transcripcional mediante el desplazamiento de corepresores (CoR) y el reclutamiento simultáneo de coactivadores (CoA), incluyendo MAML1 (*mastermind-like proteins*). Glicosil-T: glicosiltransferasa. Modificado de: (49).



4. CONCLUSIONES

Capítulo I. Identificación de mutaciones en *BMP15* en pacientes IOP y ensayos funcionales *in vitro*.

1. Las mutaciones en *BMP15* identificadas en mujeres con IOP pueden alterar la función ovárica por tres mecanismos: la disminución de la secreción de péptido maduro, la disminución en la actividad de *BMP15* o la inhibición de la sinergia con GDF9.
2. La disminución de la bioactividad de *BMP15* con la mutación identificada en este estudio (p.Arg329His), sugiere una relación con el fenotipo IOP

Capítulo II. Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional *in vitro*.

1. En este trabajo de tesis se identificaron aproximadamente 60 variantes potencialmente relacionadas con la etiología de la IOP, involucradas en distintas cascadas moleculares. Entre ellas, al menos 6 fueron evaluadas positivamente mediante ensayos *in vitro* con el fin de verificar una disfunción de la proteína mutada.
2. Mediante la aproximación “Diseño de un *subset* de genes candidatos para la secuenciación específica de regiones codificantes” se identificaron cuatro variantes heterocigotas en tres pacientes: *ADAMTS19*-p.Thr943Ile, *BMPR2*-p.Ser987Phe, *LHCGR*-p. Asn99Ser y *LHCGR*-p.Ser176Pro. La identificación de dos de estas mutaciones (*BMPR2*-p.Ser987Phe, *LHCGR*-p.Asn99Ser) en una paciente sugiere un efecto aditivo en la etiología de la IOP.
3. La colocalización de la proteína *BMPR2*-p.Ser987Phe con el retículo endoplasmático sugiere una agregación de la proteína mutante en este organelo, lo cual podría disminuir la biodisponibilidad de este receptor en la membrana de la célula de la granulosa y de esta manera contribuir con la etiología de la IOP.
4. La mutación c.2355+1G>A en el gen *MSH4* puede estar asociada a la etiología de la IOP en la familia estudiada.
5. La identificación de pacientes con al menos dos mutaciones en diferentes genes (**Anexo 2 y Anexo 5**) sugiere la etiología poligénica de la IOP.
6. La variante c.887C>T (p.Pro296Leu) en el gen *KHDRBS1* es candidata a ser evaluada mediante ensayos funcionales para determinar su relación con la etiología de la IOP

7. Las mutaciones en los genes *ATG7* (p.Phe403Leu) y *ATG9A* (p.Arg758Cys) disminuyen la capacidad de la célula de responder a la inducción de autofagia.
8. Los ensayos realizados indican que las mutaciones en *NOTCH2*: p.Ser1804L, p.Ala2316Val y p.Pro2359A alteran la función del dominio intracelular de esta proteína.
9. Los nuevos genes y mutaciones validados funcionalmente pueden ser utilizados como marcadores moleculares de la enfermedad.

5. PERSPECTIVAS

Capítulo I. Identificación de mutaciones en *BMP15* en pacientes IOP y ensayos funcionales *in vitro*.

1. Evaluar si las mutaciones identificadas en *GDF9* en pacientes con IOP (25,50–52), alteran la sinergia con BMP15.
2. Evaluar la interacción de BMP15 con otras proteínas para determinar si existen otros factores moleculares que regulen la unión de los homó u heterodímeros a su receptor, o si BMP15 cumple otras funciones al interactuar con proteínas de la matriz extracelular.
3. Es importante precisar que el éxito de la función ovárica depende también del adecuado funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y del *feedback* negativo para su regulación. Este eje fundamentalmente depende de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo en forma pulsátil. La GnRH se une a receptores específicos localizados en la superficie de las células gonadotropas situadas en la hipófisis anterior, estimulando la liberación de FSH y LH. Estas hormonas pasan a la circulación y actúan sobre el ovario a través de los receptores de membrana. En el ovario contribuyen a la producción de estrógenos, la maduración folicular y la ovulación (53). Mutaciones en los genes que codifican para proteínas involucradas en este eje también pueden causar IOP. Este es el caso de las mutaciones en el receptor de la GnRH (p.Thr284Cys y p.Arg262Gln), INHA (p.Ala257Thr) y FSHR (p.Ile160Thr, p.Ala419Thr y p.Arg573Cys) (54–57). Dentro de los genes evaluados en este trabajo de tesis, *BMP15* es uno de los que ha demostrado que una función importante en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Otsuka y Shimasaki en el 2002 demostraron la expresión de esta proteína en la hipófisis y observaron que BMP15 estimulaba la transcripción de la subunidad beta de la FSH (FSH β) en las células L β T2 (células gonadotropas murinas) sin afectar la transcripción de LH β ni del receptor de GnRH, sugiriendo un posible mecanismo de control autocrino selectivo para la síntesis de FSH β por parte de BMP15 (11).

Por esta razón sería interesante determinar si las mutaciones en BMP15 evaluadas en esta tesis alteran la función reguladora de FSH en células de la hipófisis y en el ovario.

Capítulo II. Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional *in vitro*.

1. Teniendo en cuenta que los datos de la secuenciación de exoma permiten ser reanalizados, es posible incluir otros genes no contemplados en el *subset* inicial y/o realizar análisis con enfoques diferentes.
2. Evaluar si la mutación p.Ser987Phe en BMPR2 inhibe o disminuye la señalización de la vía SMAD en respuesta a la unión de los homo u heterodímeros de BMP15.
3. Se ha evidenciado la interacción del dominio intracitoplasmático de BMPR2 con proteínas del citoesqueleto (58). Teniendo en cuenta que la p.Ser987Phe en BMPR2 está en la región intracelular, se podría evaluar si esta mutación inhibe o altera la interacción con otras proteínas.
4. Validar mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* otras variantes identificadas en esta tesis
5. Se ha identificado que Notch2 se expresa en las células embrionarias progenitoras de la hipófisis anterior (E12.5 hasta E14.5). La adecuada regulación de la expresión de Notch2 interfiere en la diferenciación de las células gonadotropas (encargadas de producir la FSH y la LH) (59). Sería interesante evaluar si las mutaciones identificadas en esta tesis de NOTCH2 interfieren en esta diferenciación celular.
6. Evaluar si las mutaciones en *NOTCH2* alteran la expresión de los genes blanco de esta cascada de señalización (e.g. *HES* y *HEY*).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol*. 2010 Nov;45(5):257–79.
2. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016 May;31(5):926–37.
3. Bilgin EM, Kovanci E. Genetics of premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015 Jun;27(3):167–74.
4. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod*. 2003 Jan;18(1):199–206.
5. Chang SH, Kim C-S, Lee K-S, Kim H, Yim SV, Lim YJ, et al. Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause. *Maturitas*. 2007 Sep 20;58(1):19–30.
6. Shelling A, Chapman C, Cree L. The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2015 Sep;799.
7. Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Aug 15;411:243–57.
8. Laissue P. The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Jan;460:170–80.
9. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol*. 1998 Dec;12(12):1809–17.
10. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul;75(1):106–11.
11. Otsuka F, Shimasaki S. A Novel Function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the Pituitary: Selective Synthesis and Secretion of FSH by Gonadotropes. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4938–41.
12. Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8060–5.
13. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):11387–92.
14. Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, et al. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*. 2013 Jul;146(1):27–35.

15. Su Y-Q, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 2007 Nov 21;135(1):111–21.
16. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014 Nov 1;20(6):869–83.
17. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*. 2004 Feb;25(1):72–101.
18. Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: Potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Apr 12;102(15):5426–31.
19. Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, et al. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Feb 19;110(8):E776–85.
20. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):279–83.
21. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001 Jun;15(6):854–66.
22. Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, et al. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(1):135–6.
23. Ledig S, Röpke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(1):1–5.
24. Tiotiu D, Alvaro Mercadal B, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, et al. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2010;25(6):1581–7.
25. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttenn F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(5):739–44.
26. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1976–9.
27. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*. 2006 May;119(4):408–15.
28. Lakhali B, Laissue P, Braham R, Elghezal H, Saâd A, Fellous M, et al. A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(5):752–3.

29. Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat.* 2009 May;30(5):804–10.
30. Inagaki K, Shimasaki S. Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins WITH mutations in the proregion. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Oct 26;328(1–2):1–7.
31. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4883–91.
32. Park ST, Kim J. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J.* 2016 Nov;20(Suppl 2):S76-83.
33. Austin ED, Loyd JE. The Genetics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res.* 2014 Jun 20;115(1):189–202.
34. Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Feb 5;1:9.
35. Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R. hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell.* 2004 Aug 13;15(3):437–51.
36. Snowden T, Shim K-SK-S, Schmutte C, Acharya S, Fishel R. hMSH4-hMSH5 Adenosine Nucleotide Processing and Interactions with Homologous Recombination Machinery. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):145–54.
37. Wang B, Li L, Zhu Y, Zhang W, Wang X, Chen B, et al. Sequence variants of KHDRBS1 as high penetrance susceptibility risks for primary ovarian insufficiency by mis-regulating mRNA alternative splicing. *Hum Reprod.* 2017 Oct;32(10):2138–46.
38. Najib S, Martín-Romero C, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Jan;62(1):36–43.
39. van Beek N, Klionsky DJ, Reggiori F. Genetic aberrations in macroautophagy genes leading to diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2018 May;1865(5):803–16.
40. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul 3;10(7):458–67.
41. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008;445:77–88.
42. Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction.* 2011 Jun 1;141(6):759–65.
43. Song Z-H, Yu H-Y, Wang P, Mao G-K, Liu W-X, Li M-N, et al. Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice. *Cell Death Dis.* 2015 Jan 15;6(1):e1589–e1589.
44. Haidar M, Timmerman V. Autophagy as an Emerging Common Pathomechanism in Inherited

Peripheral Neuropathies. *Front Mol Neurosci*. 2017 May 11;10.

45. Johnson J, Espinoza T, McGaughey RW, Rawls A, Wilson-Rawls J. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mech Dev*. 2001 Dec;109(2):355–61.
46. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2003 Mar;194(3):237–55.
47. Xu J, Gridley T. Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol*. 2013 Feb 13;11(1):13.
48. George RM, Hahn KL, Rawls A, Viger RS, Wilson-Rawls J. Notch signaling represses GATA4-induced expression of genes involved in steroid biosynthesis. *Reproduction*. 2015 Oct;150(4):383–94.
49. Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch “gospel.” *EMBO Rep*. 2005 Dec;6(12):1120–5.
50. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause*. 2006;12(6):749–54.
51. Ma L, Chen Y, Mei S, Liu C, Ma Xi, Li Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in premature ovarian failure-associated genes in a Chinese Hui population. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):2529–38.
52. Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen Z-J, Rajkovic A. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2007 Nov;88(5):1474–6.
53. Hall JE. Endocrinology of the Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Sep;44(3):485–96.
54. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*. 1998 Oct 1;102(7):1352–9.
55. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Mar;87(3):1151–5.
56. Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, et al. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2000 Dec;15(12):2644–9.
57. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, et al. A Family with Hypogonadotropic Hypogonadism and Mutations in the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *N Engl J Med*. 1997 Nov 27;337(22):1597–603.
58. Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, et al. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol*. 2003 Sep 15;162(6):1089–98.
59. Raetzman LT, Wheeler BS, Ross SA, Thomas PQ, Camper SA. Persistent Expression of Notch2 Delays Gonadotrope Differentiation. *Mol Endocrinol*. 2006 Nov;20(11):2898–908.

Anexos

Anexo 1.

Capítulo I. Identificación de mutaciones en *BMP15* en pacientes IOP y ensayos funcionales *in vitro*.

Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, Agapiou D, Gilchrist RB, Laissue P, Harrison CA. 2017. *BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 102(3):1009–1019.

Lo puede ver en:

<https://academic.oup.com/jcem/article/102/3/1009/2760427>

Anexo 2.

Capítulo II. Identificación por NGS de nuevos genes y variantes asociadas a la etiología de la IOP y validación funcional *in vitro*.

Fonseca DJ*, **Patiño LC***, Suárez YC, Jesús Rodríguez A de, Mateus HE, Jiménez KM, Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, 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

*D.J.F. and L.C.P. should be considered similar in author order.

Lo puede ver en:

<https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S0015028215002897?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0015028215002897%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F>

Anexo 3.

Patiño LC, 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.

Lo puede ver en:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19396368.2017.1291767>

Anexo 4.

Carlosama C, Elzaiat M, **Patiño LC**, Mateus HE, Veitia RA, 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.

Lo puede ver en:

<https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/26/16/3161/3852119?redirectedFrom=fulltext>

Anexo 5.

Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. 2017. *New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing*. Human Reproduction. 32(7):1512–1520.

Lo puede ver en:

<https://academic.oup.com/humrep/article/32/7/1512/3823627>

Anexo 6.

Carolina C*, **Patiño LC***, Beau I , Morel A, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. *A novel mutation in KHDRBS1 in a patient affected by primary ovarian insufficiency.* Clinical Endocrinology. 89(2):245-246.

*C.C. and L.C.P. should be considered similar in author order.

Lo puede ver en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cen.13749>

Anexo 7.

Delcour C, Amazit L, **Patiño LC**, Magnin F, Fagart J, Delemer B, Young J, Laissue P, Binart N, Beau I. *ATG7 and ATG9A loss-of-function mutations trigger autophagy impairment and ovarian failure*. Genetics in Medicine. *Submitted, under review.*

Anexo 8.

Patiño LC, Beau I, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P.
NOTCH2 missense mutations are related to primary ovarian insufficiency molecular aetiology. Human Mutation. *Submitted, under review.*