

**Identificación y validación funcional de la mutación c.2355+1G>A en *MSH4*
descubierta en una familia afectada por insuficiencia ovárica primaria: descripción de
una nueva etiología molecular de la enfermedad**

Carolina Carlosama Puerta MD

**Universidad del Rosario
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Maestría en Genética Humana**

Bogotá, D.C., 2018

**Identificación y validación funcional de la mutación c.2355+1G>A en *MSH4*
descubierta en una familia afectada por insuficiencia ovárica primaria: descripción de
una nueva etiología molecular de la enfermedad**

Carolina Carlosama Puerta MD

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en Genética Humana**

DIRECTOR

Paul Laissue MD., MSc., PhD., HDR

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Maestría en Genética Humana

Bogotá, D.C., 2018

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

**Identificación y validación funcional de la mutación c.2355+1G>A en *MSH4*
descubierta en una familia afectada por insuficiencia ovárica primaria: descripción de
una nueva etiología molecular de la enfermedad**

Carolina Carlosama Puerta MD

APROBADO

**Paul Laissue MD, MSc, PhD., HDR
DIRECTOR**

JURADO

JURADO

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de maestría por su dedicación y cariño en el proceso de aprendizaje.

A la *Dra Dora Fonseca* por el amor con el que enseña, por su tenacidad y ejemplo de mujer.

Al *Dr Paul Laissue* por su asistencia y guianza para la culminación de este trabajo.

A mis compañeros por el apoyo incondicional que me brindaron constantemente.

A mis amigos de corazón, por la paciencia, por escucharme, por hacer más alegre los días y la vida.

A *Camilo*, por ser esa cordada que hace que este sendero sea más liviano, más amplio, más colorido, por acompañarme de la mano hacia cualquier cumbre.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia, por ser esa base y ejemplo de vida, por enseñarme que se trabaja con amor para construir los sueños.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	2
2.1 Objetivo General	2
2.2. Objetivos Específicos	2
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	4
4.1 Historia clínica familiar	4
4.2 Extracción de ADN	5
4.3. NGS, secuenciación de Sanger y análisis <i>in silico</i>	5
4.3.1. Secuenciación de siguiente generación (NGS)	5
4.3.2. Análisis <i>in silico</i>	6
4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de Sanger	7
4.3.4. Análisis <i>in silico</i> de la mutación c.2355+1G>A de <i>MSH4</i>	8
4.4. Minigenes / <i>Exon trapping</i>	8
4.4.1. Diseño del cassette de <i>exon trapping</i>	8
4.4.2. Diseño de primers y PCR de fragmento 1 y 2	9
4.4.3. Diseño de primers y PCR de sobreposición (<i>overlapping PCR</i>)	11
4.4.4. Adenilación del fragmento fusión y clonaje en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®	15
4.5. Cultivo celular, transfección y RT-PCR	19
5. RESULTADOS	20
5.1. NGS, secuenciación de Sanger y análisis <i>in silico</i>	20
5.1.1. Análisis <i>in silico</i>	20
5.1.2. PCR y secuenciación de Sanger	21
5.1.3. Análisis <i>in silico</i> de la variante c.2355+1G>A de <i>MSH4</i>	24
5.2. Minigenes / <i>Exon trapping</i>	25
5.2.1. PCR de la obtención de los fragmentos del cassette del <i>exon trapping</i>	25
5.2.2. PCR del fragmento de sobreposición y del fragmento fusión del cassette del <i>exon trapping</i>	26

5.2.3. Verificación del clonaje y de la integridad de la secuencia del fragmento fusión en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®-----	27
5.2.4. Ensayo del <i>exon trapping</i> de la variante c.2355+1G>A del gen <i>MSH4</i> -----	27
6. CONCLUSIONES -----	29
7. CONSIDERACIONES FINALES -----	30
8. BIBLIOGRAFÍA -----	31
9. ANEXOS -----	37
Anexo 1. Región de <i>MSH4</i> usada como modelo para la construcción del cassette del minigen-----	37
Anexo 2. Artículo publicado en <i>Human Molecular Genetics</i> -----	39
Anexo 3. Artículo publicado en <i>Human Reproduction</i> -----	40
Anexo 4. Artículo publicado en <i>Clinical Endocrinology</i> -----	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol genealógico -----	5
Figura 2. Filtrado y número de las variantes, hipótesis recesiva -----	6
Figura 3. Cassette de <i>MSH4</i> c.2355+1G>A-----	8
Figura 4. Región WT de <i>MSH4</i> usada como modelo para la construcción del cassette del minigen -----	9
Figura 5. Fragmento 2 con extensión de oligonucleótidos que se sobrepone sobre el fragmento 1 -----	11
Figura 6. Fragmento fusión (fragmento 1 y fragmento 2)-----	14
Figura 7. Mapa del vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® -----	16
Figura 8. Amplificación del fragmento de <i>MSH4</i> (exón 17 – intrón 17) variante c.2355+1G>A -----	22
Figura 9. Cromatograma del fragmento de la variante c.2355+1G>A de <i>MSH4</i> -----	22
Figura 10. Predicción de los mecanismos de <i>splicing</i> relacionados con la variante c.2355+1G>A del gen <i>MSH4</i> -----	24
Figura 11. Predicción de la consecuencia a nivel proteico de la variante c.2355+1G>A del gen <i>MSH4</i> -----	25
Figura 12. Amplificación del fragmento 1 y del fragmento 2 del cassette del <i>exon trapping</i> -----	26
Figura 13. Amplificación del fragmento fusión del cassette del <i>exon trapping</i> -----	26
Figura 14. RT-PCR del fragmento WT y del fragmento mutante-----	27
Figura 15. Secuenciación de Sanger del fragmento WT y del fragmento mutante -----	28

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers de identificación de la variante c.2355+1G>A del gen <i>MSH4</i> -----	7
Tabla 2. Programa de PCR para la amplificación del fragmento de <i>MSH4</i> (exón 17 - intrón 17) -----	7
Tabla 3. Primers para la amplificación del fragmento 1-----	10
Tabla 4. Primers para la amplificación del fragmento 2-----	10
Tabla 5. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 1 -----	10
Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 2 -----	10
Tabla 7. Primers para la amplificación del fragmento 2 con una cola de sobreposición----	11
Tabla 8. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 2 con extensión -----	12
Tabla 9. Programa de PCR para la amplificación del fragmento sobrepuesto -----	13
Tabla 10. Programa de PCR para la amplificación del fragmento fusión-----	13
Tabla 11. Primers internos para la amplificación del fragmento fusión-----	14
Tabla 12. Programa de PCR para la amplificación del fragmento fusión-----	15
Tabla 13. Condiciones de la reacción de poliadenilación del fragmento fusión -----	15
Tabla 14. Condiciones del clonaje en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®-----	16
Tabla 15. Primers internos y de vector para la verificación en colonias del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® -----	17
Tabla 16. Programa de PCR para la verificación en colonias del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® -----	17
Tabla 17. Primers internos y de vector para la verificación por secuenciación del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® -----	18
Tabla 18. Variantes homocigotas candidatas -----	20

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una enfermedad frecuente que afecta a mujeres por debajo de los 40 años de edad (Conway, 2000). Clínicamente, se caracteriza por la interrupción de la menstruación (amenorrea primaria o secundaria) y niveles elevados de FSH sérica ($> 40\text{UI/L}$). En cuanto a la etiología, se han descrito casos relacionados con anomalías genéticas en presentaciones sindrómicas y no sindrómicas de la enfermedad. Sin embargo, únicamente se han descrito algunas mutaciones en genes específicos como responsables del fenotipo (Laissue, 2015; Qin *et al.*, 2015).

Esto puede deberse a que la reproducción femenina implica varias etapas, desde la diferenciación de los ovarios hasta la gametogénesis y la ovulación, cuyo daño puede tener un impacto en el desarrollo y bienestar de los ovocitos. Este escenario dificulta la selección de genes candidato relevantes para ser analizados por secuenciación de Sanger. Recientemente, estudios en casos familiares y aislados de IOP, a partir de la secuenciación de siguiente generación (NGS), han permitido la identificación de mutaciones en nuevos genes (Caburet *et al.*, 2014; de Vries *et al.*, 2014; Wood-Trageser *et al.*, 2014).

En el presente trabajo de tesis se efectuó la secuenciación del exoma completo (WES) en miembros de una familia afectada por POI, lo que condujo a la identificación de una mutación homocigótica del sitio de *splicing* en el gen de meiosis *MSH4*. Se determinó que esta mutación es causal del fenotipo y por primera vez se asoció una versión mutante de *MSH4* con el fenotipo de IOP.

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el trabajo presentado (Lakhal *et al.*, 2008, 2009, 2010, Laissue *et al.*, 2009a, 2009c, 2009b, 2016, 2017; L'Hôte *et al.*, 2010; Caburet *et al.*, 2012; Diggle *et al.*, 2012; Niño *et al.*, 2012; Vatin *et al.*, 2012, 2014, Fonseca *et al.*, 2012b, 2012a, 2012c, 2013, 2014, 2015; Castro *et al.*, 2013; Ortega-Recalde *et al.*, 2013b, 2013a, 2015a, 2015b, 2016, Patiño *et al.*, 2014, 2017b, 2017c, 2017a; Prada and Laissue, 2014; Laissue, 2015; Mitropoulos *et al.*, 2015; Forero *et al.*, 2016; Ducat *et al.*, 2016; Mateus *et al.*, 2017; Quintero-Ronderos *et al.*, 2017b, 2017a; Valero-Rubio *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Objetivo General

1. Identificar la causa genética en un caso familiar de IOP.

2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar variantes genéticas candidatas que puedan explicar el fenotipo de IOP mediante secuenciación de exoma.
2. Determinar por experimentos funcionales *in vitro*, si la variante homocigota c.2355+1G>A de *MSH4* es causal del fenotipo.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la causa genética de IOP en una familia colombiana afectada por la enfermedad?

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Historia clínica familiar

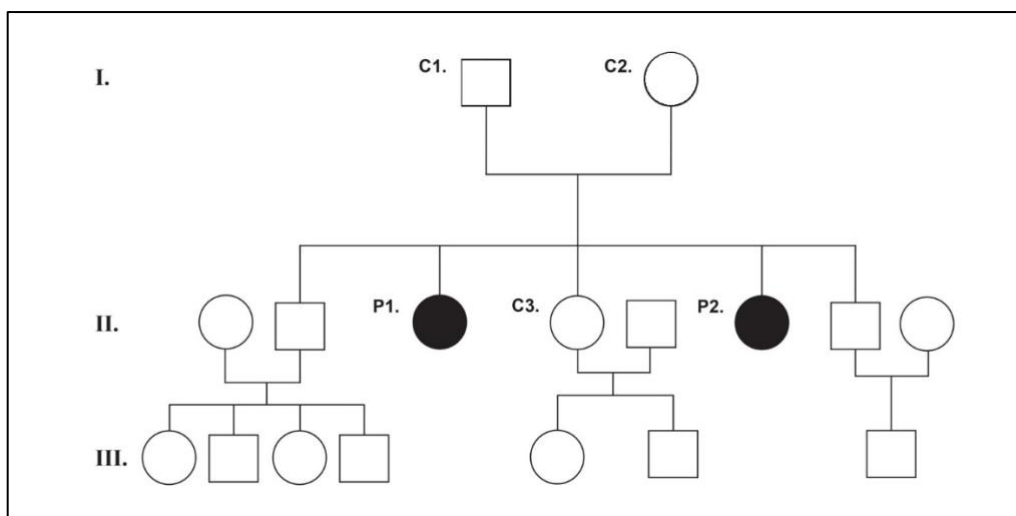
La familia del presente estudio está constituida por dos hermanas quienes presentaron el fenotipo característico de IOP (Cox and Liu 2014). Los padres no reportaron consanguinidad. Sin embargo, provienen de una región de Colombia (Boyacá) que ha mostrado una incidencia elevada de enfermedades recesivas (Velasco *et al.*, 2017).

La paciente 1 (P1) es una mujer de 42 años, presentó la menarquia a los 12 años, con ciclos regulares hasta los 34 años, los cuales se volvieron irregulares presentando al año un cese completo de la menstruación. Los valores de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona leutinizante (LH) para el momento fueron de 78,4 UI/L y 42,2 UI/L, respectivamente (valores normales: FSH: 4-13 UI/L, LH: 2-15 UI/L) (Coulam 1982). La ecografía transvaginal reportó miomatosis uterina sin ningún hallazgo a nivel ovárico, niega otra enfermedad y condición clínica asociada.

La paciente 2 (P2) hermana de P1 tiene 35 años, refirió menarquia a los 14 años, presentando irregularidad en los ciclos desde los 25 años, con cese definitivo de la menstruación a la edad de 30 años. Valores de FSH y LH de 97.1 UI/L y 51.2 UI/L respectivamente (valores normales: FSH: 4-13 UI/L, LH: 2-15 UI/L) (Coulam, 1982). Niega embarazos, ecografía pélvica sin alteraciones y niega patologías asociadas.

Adicionalmente, se entrevistó a la hermana de ambas pacientes la cual no presentó el fenotipo de insuficiencia ovárica primaria (C3). Actualmente, refiere ciclos menstruales regulares, G2 P2 A0 C0 y niega alguna enfermedad asociada. La madre (C1) no refirió antecedentes de hipofertilidad, la edad de su menopausia fue a los 59 años. El padre (C2) solo menciona hipertensión arterial al momento de la consulta.

Figura 1. Árbol genealógico



4.2 Extracción de ADN

Se realizó una toma de muestra de sangre periférica a las pacientes P1, P2, la hermana no afectada (C3) y ambos padres (C1, C2). Seguidamente, se realizó la extracción del ADN genómico mediante la técnica de precipitación salina, previa firma de un consentimiento informado.

4.3. NGS, secuenciación de Sanger y análisis *in silico*

4.3.1. Secuenciación de siguiente generación (NGS)

La extracción de ADN genómico de P1, P2 y C3 fue enviada para la secuenciación de exoma completo por parte de *Genotypic technologies*, India. La preparación e hibridación fue realizada mediante el kit *Sure Select™ 50 MB* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El secuenciador utilizado fue el NextSeq 500 de *Illumina*. Se obtuvieron “raw reads” que pasaron los filtros de calidad y que posteriormente fueron analizados mediante el *software* *Cassava* (Illumina, San Diego, CA). A continuación, por medio del algoritmo BWAMEM se alinearon los fragmentos de mejor calidad con el genoma humano de referencia (HG19 versión GRCh37) y finalmente se realizó el llamado de variantes (*variant*

calling) usando la herramienta Samtools 0.1.18. Los resultados fueron cargados a la base de datos *PhenomeCentral* con los siguientes códigos de acceso P1: P0002496, P2:P0002497 C3: P0002498.

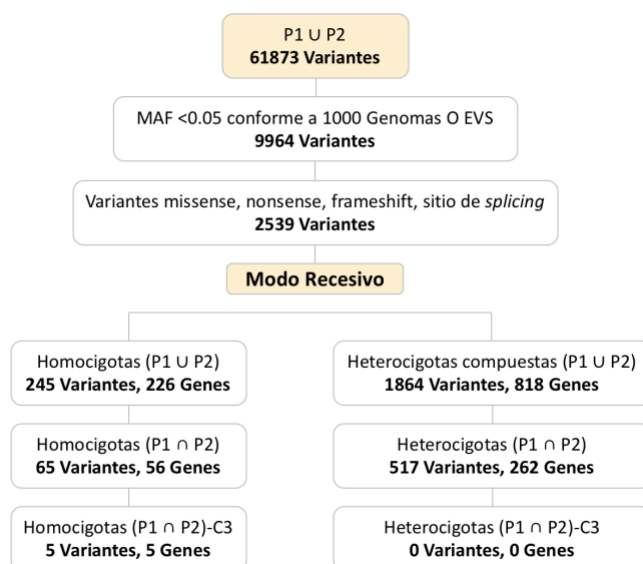
4.3.2. Análisis *in silico*

Las variantes obtenidas al final de los filtros primarios y secundarios de control de calidad realizados durante el NGS fueron posteriormente analizadas por diferentes herramientas informáticas (Excel y “R” versión 3.2.3). El estudio de estos datos consistió en un análisis de la totalidad de las variantes, donde se consideró la hipótesis recesiva. Adicionalmente, se efectuaron los siguientes filtros:

- La frecuencia alélica mínima (MAF) menor a 0.05%, teniendo en cuenta el proyecto de 1000 genomas y el *Exome Variant Server* (EVS).
- El tipo de mutación (*missense*, *nonsense*, *splice site* y *frameshift*).

Posteriormente, se filtraron las variantes presentes en estado homocigoto o heterocigoto compuesto en P1 y P2 que en C3 se encontraban ausentes o en estado heterocigoto.

Figura 2. Filtrado y número de las variantes, hipótesis recesiva



4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de Sanger

Para la confirmación de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*, identificada como candidata por NGS, se diseñaron varios oligonucleótidos mediante el programa Primer 3, con el fin de poder amplificar la región donde se encontró la mutación (**Tabla 1**).

Tabla 1. Primers de identificación de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*

Nombre del primer	Secuencia	Tamaño
h <i>MSH4</i> _e17_e1F	5' GCTCAGCAGGATGTCTCTAAGAA 3'	574 pb
h <i>MSH4</i> _e17_e1R	5' ACATCATTGCACATGGAGGCA 3'	

El fragmento fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 25µl, con 200ng de ADN, 12.5µl de Master MIX (Promega) y 0.8µM de cada primer. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 2. Programa de PCR para la amplificación del fragmento de *MSH4* (exón 17 - intrón 17)

Etapas en el Termociclador	T°	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 35		
2. Desnaturalización	95°	40 segundos
3. Anillamiento	61°	40 segundos
4. Elongación	72°	45 segundos
Finalización ciclos		
5. Elongación final	72°	10 minutos

La amplificación se realizó en P1, P2, C3, así como en los padres (C1, C2) y los hermanos (II:I; II:V) (**Figura 1**). A continuación, los fragmentos amplificados fueron enviados a secuenciar por el método de Sanger con el primer h*MSH4*_e17_e1F para posteriormente ser analizados.

4.3.4. Análisis *in silico* de la mutación c.2355+1G>A de *MSH4*

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas como *Netgene v.2.0* y *Human Splicing Finder v.3.0* se realizó el análisis de los potenciales transcritos alternativos resultado de la mutación c.2355+1G>A encontrada en el gen *MSH4*. En paralelo, manualmente se evaluaron las hipótesis del *skipping* exónico y de la retención intrónica concerniente a la mutación previamente descrita.

4.4. Minigenes / *Exon trapping*

4.4.1. Diseño del cassette de *exon trapping*

Se diseñó un cassette funcional a partir de la secuencia del transcrito ENST00000263187.3 de *MSH4*. El cassette se construyó a partir de 2 fragmentos. El primero incluyó el exón 16 precedido de un ATG, con el fin de generar un marco de lectura abierto potencialmente traducible, el intrón 16, el exón 17 y una secuencia perteneciente a la región 5' del intrón 17 teniendo en cuenta la posición donde se encontró el cambio. El segundo fragmento incluyó una secuencia al final de la región 3' del intrón 17 y el exón 18 que finalizó con un codón de parada artificial (**Figura 3** y **Figura 4**) (**Anexo 1**. Cassette completo).

Figura 3. Cassette de *MSH4* c.2355+1G>A

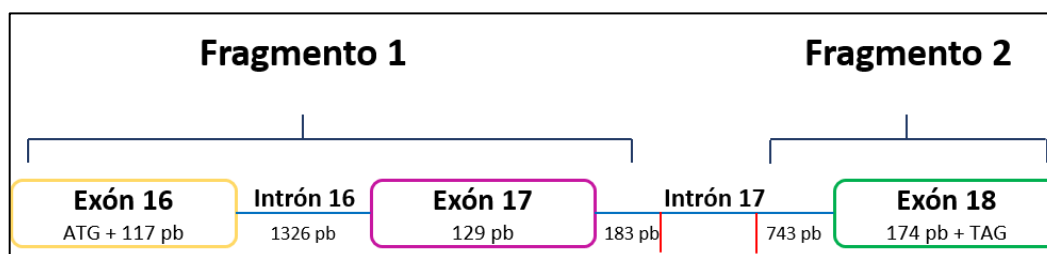
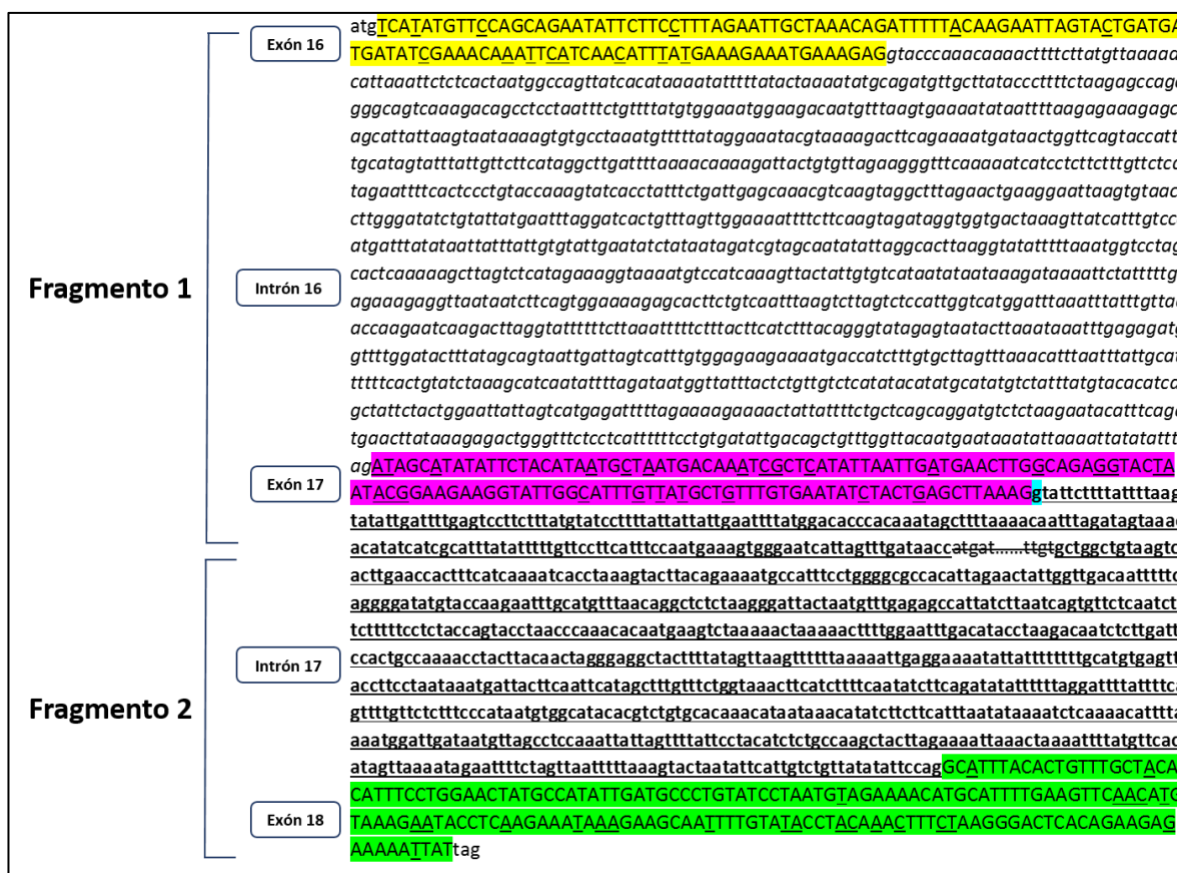


Figura 4. Región WT de *MSH4* usada como modelo para la construcción del cassette del minigen



El color amarillo resalta el exón 16, la región en cursiva muestra el intrón 16, el color morado resalta el exón 17, la región subrayada en negrilla muestra el intrón 17 y la resaltada en color verde el exón 18. La mutación c.2355+1G>A de *MSH4* está resaltada en azul. Los nucleótidos con una línea central no fueron clonados en el cassette. **Exón16-intrón16**
Exón17-intrón17-Exón18

4.4.2. Diseño de primers y PCR de fragmento 1 y 2

Posteriormente, se diseñaron primers para la amplificación y la obtención de los fragmentos 1 y 2. A continuación, se procedió a realizar una PCR con condiciones específicas, donde se usó como base el ADN de C3 y P1 para conseguir estos fragmentos en sus versiones WT y mutante respectivamente.

Tabla 3. Primers para la amplificación del fragmento 1

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
hMSH4_Ex16-F	5'atgTCATATGTTCCAGCAGAATATTC3'	Exón 16	62°	1758 pb
hMSH4_In17-R	5'ggttatcaaactaatgattccca3'	Intrón 17	62°	

Tabla 4. Primers para la amplificación del fragmento 2

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
hMSH4_in17_920pb_F	5'gctggctgtaagtcactgaac3'	Intrón 17	66°	920 pb
hMSH4_Ex18-R	5'ctaATAATTTTCTCTTCTGTGAGTC3'	Exón 18	60°	

Los fragmentos 1 y 2 fueron amplificados mediante PCR, en un volumen final de 50µl, con 100ng de ADN, 1µl de *AccuPrime™ Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) y 1.5µl de primer mix. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 5. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 1

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 35		
Desnaturalización	95°	45 segundos
Anillamiento	54°	40 segundos
Elongación	68°	1 minuto 50 segundos
Finalización ciclos		
Elongación final	68°	10 minutos

Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 2

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°	10 minutos

Número de ciclos: 35		
2. Desnaturalización	95°	45 segundos
3. Anillamiento	57°	40 segundos
4. Elongación	68°	1 minuto 10 segundos
Finalización ciclos		
5. Elongación final	68°	10 minutos

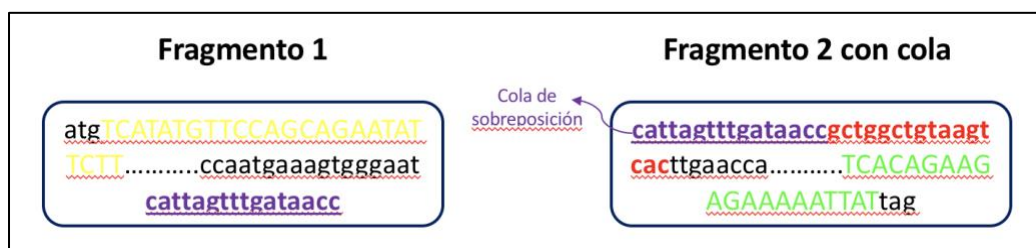
4.4.3. Diseño de primers y PCR de sobreposición (*overlapping PCR*)

Para la purificación del ADN del producto amplificado del segundo fragmento (**Tabla 6**), se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% teñido de bromuro de etidio seguido de electroforesis de 100µl del producto amplificado a 100V por una hora. Posteriormente, la banda fue purificada y extraída usando el kit QIAquick (Qiagen). A continuación, se diseñaron primers (**Tabla 7**) para la amplificación y la obtención del fragmento 2 con una extensión de oligonucleótidos en la región 5' que estuviera sobrepuesta sobre las últimas 16 pares de bases del fragmento 1 (**Figura 5**).

Tabla 7. Primers para la amplificación del fragmento 2 con una cola de sobreposición

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
hMSH4_int17_fusion3	5'cattagtttgataaccgctggctgtaagtcacttgaac3'	Intrón 17	66°	936 pb
hMSH4_Ex18-R	5'ctaATAATTTTCTCTTCTGTGAGTC 3'	Exón 18	60°	

Figura 5. Fragmento 2 con extensión de oligonucleótidos que se sobrepone sobre el fragmento 1



El fragmento 2 con extensión fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 50µl, con 200ng de ADN usando como matriz el fragmento 2 que se obtuvo de la extracción de banda, 1µl de *AccuPrime™ Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) y 1.5µl de la mezcla del primer *forward* y *reverse*. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 8. Programa de PCR para la amplificación del fragmento 2 con extensión

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 20		
Desnaturalización	95°	45 segundos
Anillamiento	57°	40 segundos
Elongación	68°	1 minuto 10 segundos
Finalización ciclos		
Elongación final	68°	10 minutos

Posteriormente, se procedió a realizar la purificación de ADN del producto de PCR del fragmento 1 (**Tabla 5**) y del fragmento 2 con extensión (**Tabla 8**) sobre un gel de agarosa al 1% y se realizó la extracción de las bandas mediante el kit QIAquick (Qiagen). Seguidamente se realizó la PCR *overlapping*, que generó una unión estable entre el primer y el segundo fragmento.

El fragmento sobrepuesto fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 50µl, con 200ng de ADN tanto del fragmento 1 y del fragmento 2 con extensión y 1µl de *AccuPrime™ Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 9. Programa de PCR para la amplificación del fragmento sobrepuesto

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 5		
2. Desnaturalización	95°	45 segundos
3. Anillamiento	54°	40 segundos
4. Elongación	68°	2 minutos 45 segundos
Finalización ciclos		
5. Elongación final	68°	10 minutos

Sobre el producto de PCR del fragmento sobrepuesto, se procedió a realizar la PCR fusión con los primers *hMSH4_*Ex16-F (**Tabla 3**) y *hMSH4_*Ex18-R (**Tabla 4**) obteniendo la fusión del fragmento 1 y 2 (**Figura 6**).

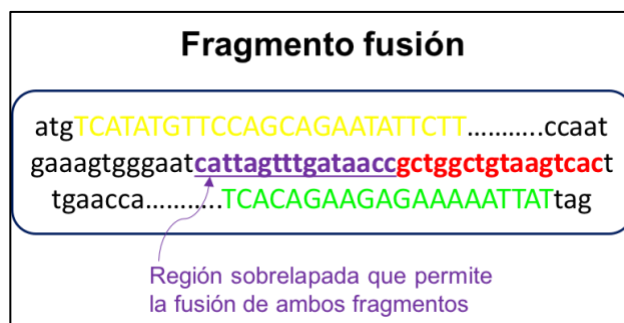
El fragmento fusión fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 50µl, con 25 µl del producto de la PCR de sobreposición, 1µl de *AccuPrime™ Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) y 1.5µl de la mezcla del primer *forward* y *reverse*. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 10. Programa de PCR para la amplificación del fragmento fusión

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 20		
2. Desnaturalización	95°	45 segundos
3. Anillamiento	54°	40 segundos
4. Elongación	68°	2 minutos 45 segundos
Finalización ciclos		

5. Elongación final	68°	10 minutos
---------------------	-----	------------

Figura 6. Fragmento fusión (fragmento 1 y fragmento 2)



A continuación, se realizó la purificación del producto de PCR del fragmento fusión sobre un gel de agarosa al 1% y se realizó la extracción de la banda mediante el kit QIAquick (Qiagen). Posteriormente, se realizó una PCR del fragmento fusión con el fin de verificar la ligación del fragmento 1 y 2. Se diseñó un primer *forward* localizado en el fragmento 1 y un primer *reverse* en el fragmento 2 (**Tabla 11**).

Tabla 11. Primers internos para la amplificación del fragmento fusión

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
hMSH4_ex17_13F_Seq	5' CTACATAATGCTAATGACAAATCGC3'	Exón 17	68°	1220 pb
hMSH4_Ex18-R	5'ctaATAATTTTCTCTTCTGTGAGTC3'	Exón 18	60°	

El fragmento fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 25µl, con 200ng de ADN del producto de purificación de ADN del fragmento fusión, 12.5µl de Master MIX (Promega) y 0.8µM de cada primer. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 12. Programa de PCR para la amplificación del fragmento fusión

Etapas del Termociclador	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°	10 minutos
Número de ciclos: 35		
Desnaturalización	95°	45 segundos
Anillamiento	58°	40 segundos
Elongación	72°	1 minuto 20 segundos
Finalización ciclos		
Elongación final	72°	10 minutos

4.4.4. Adenilación del fragmento fusión y clonaje en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

El producto de extracción de banda obtenido del fragmento fusión se llevó a un proceso de poliadenilación (**Tabla 13**) con el fin de ser insertado posteriormente en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®.

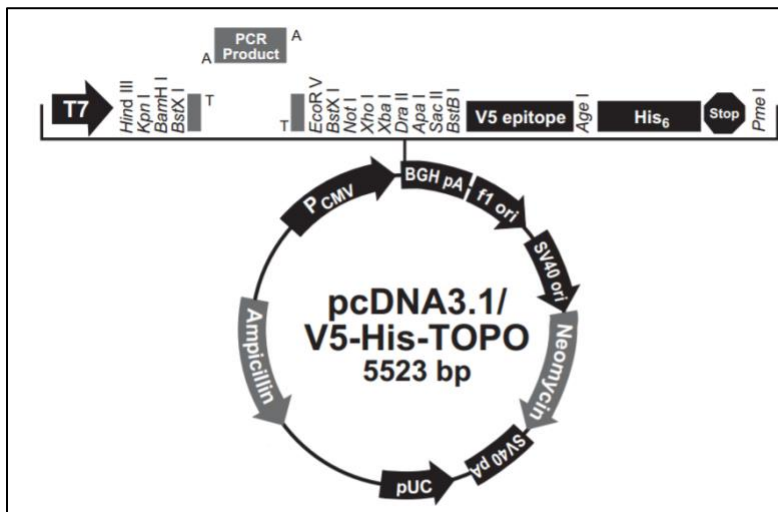
Tabla 13. Condiciones de la reacción de poliadenilación del fragmento fusión

Condiciones de la reacción de poliadenilación	
Producto purificado	25µl (1000ngs)
dATP 10µM	2µl
10X PCR Rxn Buffer	6µl
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	1µl
Agua	16µl
Incubación a 72°C por 30 minutos	

A continuación del proceso de poliadenilación, se procedió con el clonaje del fragmento fusión en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® (Invitrogen). Este plásmido, tiene un sitio

de clonaje en múltiple en orientación tanto *forward* como *reverse* por el sistema de clonaje TA. Contiene los genes de resistencia a la neomicina y a la ampicilina como marcadores de selección. Adicionalmente, en el C-terminal tiene una epítipo V5 y una secuencia de poli histidinas (**Figura 7**).

Figura 7. Mapa del vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®



Las siguientes fueron las condiciones usadas en el clonaje:

Tabla 14. Condiciones del clonaje en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

Condiciones de la clonación del fragmento fusión.	
Producto poliadenilado	3µl
Solución salina	1µl
Agua	1µl
Vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® (10 ng/µl)	1µl
Incubación a T° ambiente por 10 minutos	

El producto del clonaje fue llevado a un proceso de transformación bacteriana, que se llevó a cabo en células de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

Las colonias obtenidas en el LB agar fueron extraídas y añadidas a 5 ml de LB Broth con ampicilina. Se dejaron toda la noche a 37°C en agitación a 225 r.p.m. Luego se procedió a realizar la PCR de 10 colonias tanto de la transformación WT como mutante con la siguiente combinación de primers:

Tabla 15. Primers internos y de vector para la verificación en colonias del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

A.

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
hMSH4_ex17_13F_Seq	5'CTACATAATGCTAATGACAAATCGC3'	Exón 17	68°	1379 pb
BGH Reverse	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	Vector	56°	

B.

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m	Tamaño
T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	Vector	68°	439 pb
hMSH4_in16_226R_Seq	5'cttaataatgctagctctttctc 3'	Intrón 16	62°	

El fragmento fue amplificado mediante PCR, en un volumen final de 25µl, con 200ng de ADN, 12.5µl de Master MIX (Promega) y 0.8µM de cada primer. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes:

Tabla 16. Programa de PCR para la verificación en colonias del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

Etapas en el Termociclador	T°	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°	5 minutos
Número de ciclos: 25		
2. Desnaturalización	95°	40 segundos
3. Anillamiento	57°	40 segundos

4. Elongación	72°	1minuto 10 segundos
Finalización ciclos		
5. Elongación final	72°	5 minutos

A continuación, se extrajo el ADN plasmídico utilizando en protocolo *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* de las colonias que dieron positivas y posteriormente fueron enviadas a secuenciar con los siguientes primers:

Tabla 17. Primers internos y de vector para la verificación por secuenciación del fragmento fusión en pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

Nombre del primer	Secuencia	Localización	T°m
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Vector	56°
hMSH4_in16_226R_Seq	cttaataatgctagctctttctc	Intrón 16	57°
hMSH4_in16_153F_Seq	ctgttttatgtggaaatggaagac	Intrón 16	61°
hMSH4_in16_559F_Seq	gtgactaaagttatcatttgtccc	Intrón 16	61°
hMSH4_in16_945F_Seq	gagatggttttggatactttatagc	Intrón 16	63°
hMSH4_ex17_13F_Seq	5'CTACATAATGCTAATGACAAATCGC3'	Exón 17	68°
hMSH4_in17_920pb_F	gctggctgtaagtcaactgaac	Intrón 17	71°
hMSH4_in17_6756F_Seq	catagctttgtttctggtaaacttc	Intrón 17	63°
BGH Reverse	5'TAGAAGGCACAGTCGAGG3'	Vector	56°

4.5. Cultivo celular, transfección y RT-PCR

A continuación de la verificación de la presencia del fragmento fusión clonado en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®, se realizó la purificación plasmídica de las versiones WT y mutante mediante el protocolo Qiagen Plasmid MidiKit (Qiagen). Posteriormente, se realizó la transfección de cada uno de estos plásmidos en células HeLa. El método de transfección usado fue el de fosfato de calcio, que se fundamenta en la formación de un precipitado con el DNA, facilitando su unión a la superficie celular generando su entrada a la célula por endocitosis. Luego de 48 horas de haber sido realizada la transfección, las células en cultivo fueron fijadas con trizol.

A continuación, se realizó la extracción del ARN total del cultivo celular, mediante la técnica de extracción por TRIzol (ThermoFisher). La transcripción reversa fue realizada usando el protocolo de SuperScript II (ThermoFisher). Seguidamente, se realizó la PCR mediante el protocolo de Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent) y finalmente se enviaron a secuenciar los transcritos obtenidos a Eurofins Genomics.

5. RESULTADOS

5.1. NGS, secuenciación de Sanger y análisis *in silico*

5.1.1. Análisis *in silico*

La cantidad de variantes obtenidas mediante el análisis realizado sobre los datos de la NGS con las herramientas informáticas (Excel y “R” versión 3.2.3), se muestran en la **Figura 2**. El análisis mostró un total de 61873 variantes entre P1 y P2. Al realizar el filtro con el MAF menor a 0.05% la cantidad de variantes disminuyó a 9964. Entre ellas, 2539 tenían un impacto sobre la secuencia a nivel de la proteína. La hipótesis de transmisión recesiva mostró 245 variantes homocigotas en 226 genes en P1 y P2. Las variantes comunes fueron 65 localizadas en 56 genes. Estas variantes disminuyeron a 5 (5 genes: *LCK*, *SYDE2*, *DCP1A*, *SLC28A1* Y *MSH4*) al aplicar el filtro de exclusión con C3 (**Tabla 18**). Se tomó este grupo como probables genes candidato. En paralelo, se realizó el análisis de las variantes heterocigotas compuestas totales que en P1 y P2 fueron 1864 en 818 genes. Las variantes comunes en P1 y P2 fueron 517 localizadas en 262 genes. Al analizar con el filtro de exclusión con C3 no se identificó ninguna variante.

Las 5 variantes que se encontraron como probables candidatas se estudiaron con respecto a su potencial relación con la insuficiencia ovárica primaria a partir de la literatura. Entre estas se encontró únicamente una nueva variante homocigota en el gen de meiosis *MSH4* (NM_002440.3: c.2355+1G>A), que afecta el sitio donador de *splicing* del intrón 17.

Tabla 18. Variantes homocigotas candidatas

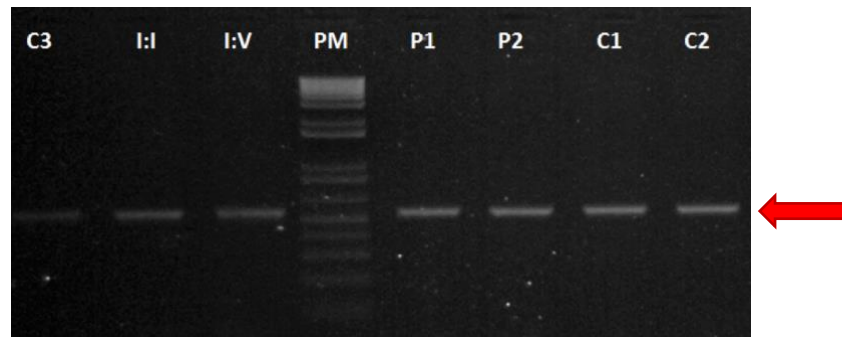
Gene	Tipo	DNA	Proteína	Función	Expresión
<i>LCK</i>	Missense	cGg/cAg	p.Arg45Gln	Transducción TCR	Linfocitos
<i>SYDE2</i>	Missense	Gtt/Att	p.Val545Ile	Activador GTPasa	Placenta, útero, retina, glándula adrenal, ovario,

					y músculo esquelético
<i>DCP1A</i>	Missense / deletion	tCCAGTGCC AGTGCCAtc/t CCAGTGCCA tc	--	Complejo de <i>decapping</i> mRNA	Corazón, cerebro, placenta, pulmón, músculo esquelético, hígado, riñón y páncreas
<i>SLC28A1</i>	Missense / insertion	cTc/cTTGTc	p.Leu140Val	Cotransportador de Sodio	Hígado y riñón
<i>MSH4</i>	Donor splice site	c.2355+1G>A	--	Proteína involucrada en la recombinación meiótica	Testículo y ovario. KO estéril secundario a defecto en meiosis.

5.1.2. PCR y secuenciación de Sanger

La amplificación del fragmento que incluye la variante c.2355+1G>A en el gen *MSH4*, se realizó en P1, P2, C3, en los padres (C1, C2) y en los hermanos (II:I; II:V) (**Figura 1**). Se verificó mediante un gel de electroforesis con agarosa al 1%. (**Figura 8**).

Figura 8. Amplificación del fragmento de *MSH4* (exón 17 – intrón 17) variante c.2355+1G>A

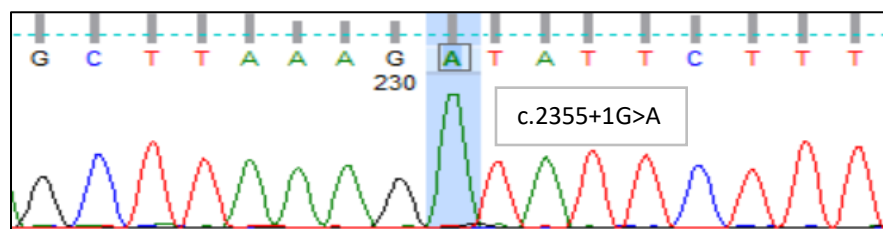


La flecha señala el fragmento amplificado de 574 pb de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*.

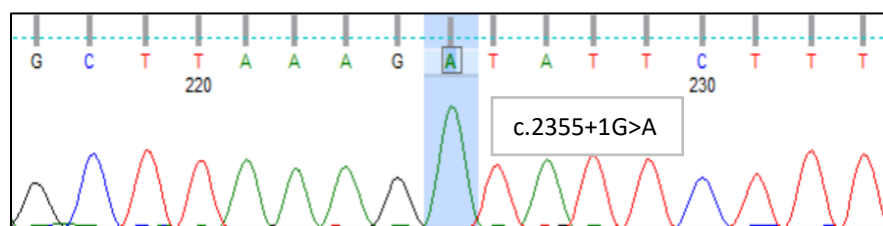
La secuenciación de Sanger del fragmento de *MSH4* que contiene la variante c.2355+1G>A (exón 17 – intrón 17), mostró que ésta se encontraba en estado homocigoto en P1 y P2 y en estado heterocigoto en C1, C2 y I:V. C3 y I:I no presentaban la variante (**Figura 9A – Figura 9G**).

Figura 9. Cromatograma del fragmento de la variante c.2355+1G>A de *MSH4*

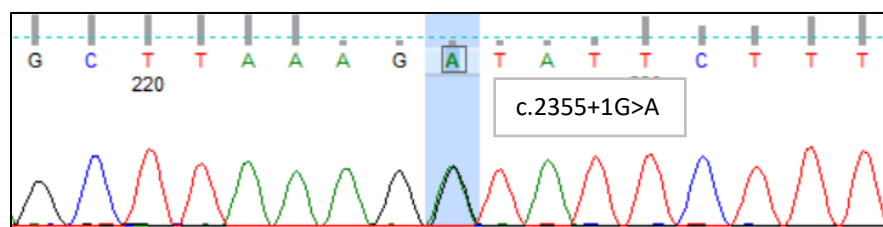
A. P1



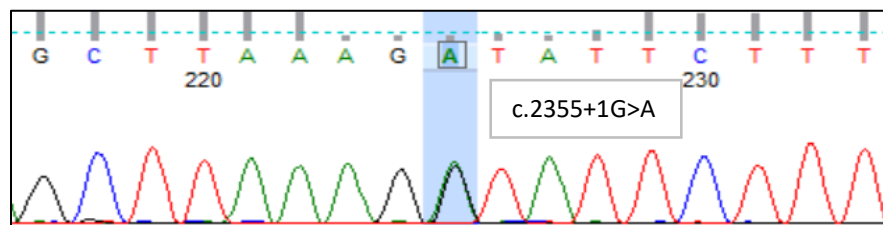
B. P2



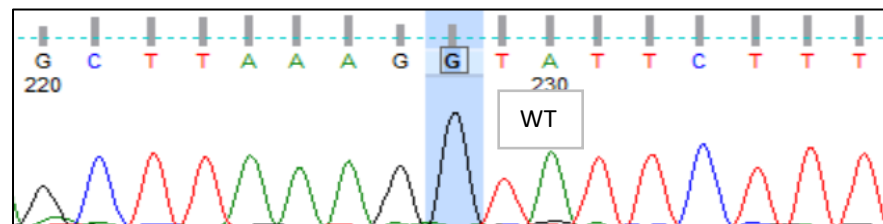
C. C1



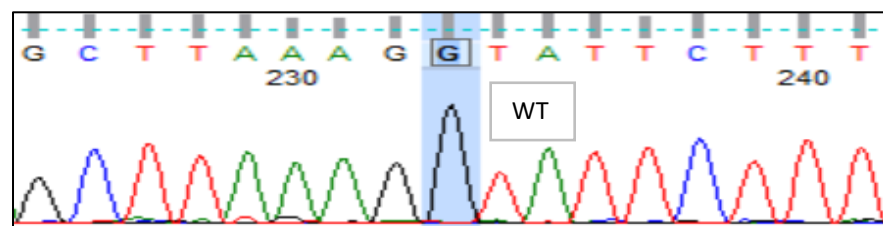
D. C2



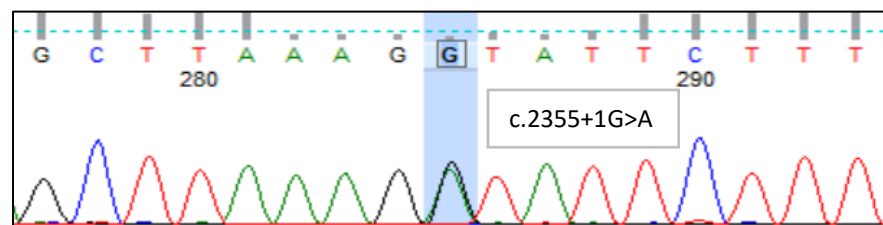
E. C3



F. II:I



G. II:IV



El recuadro señala en cada figura si la lectura en el cromatograma es WT o presenta la variante c.2355+1G>A de *MSH4*.

5.1.3. Análisis *in silico* de la variante c.2355+1G>A de *MSH4*

Las predicciones *in silico* del efecto funcional y potencial de la variante c.2355+1G>A mostraron tres diferentes mecanismos (**Figura 10** - **Figura 11**). El mecanismo 1 (Mech1) está relacionado con el proceso de *skipping* del exón 17, llevando a una modificación de la secuencia proteica de MSH4 (p.Ile743_Lys785del). El mecanismo 2 (Mech2) comprende la retención del intrón 18, generando un cambio proteico de MSH4 (p.Ala786Ilefs*34). Finalmente, el mecanismo 3 (Mech3) se relaciona con la activación de dos sitios crípticos de *splicing*, conduciendo a dos diferentes formas de truncamiento proteico (p.Ala786Ilefs*34 y p.Gly772Tyrfs*13).

Figura 10. Predicción de los mecanismos de *splicing* relacionados con la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*

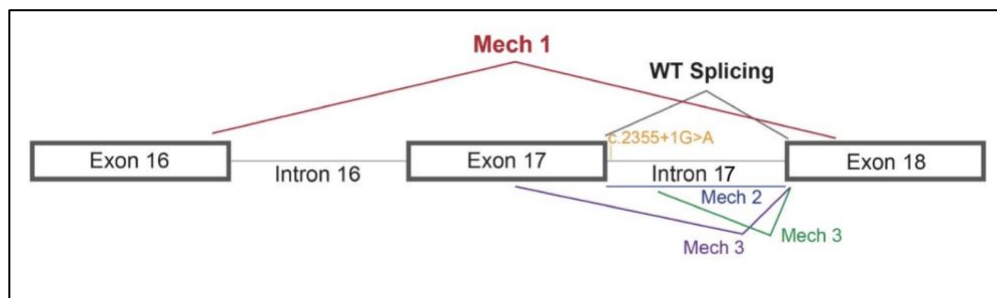
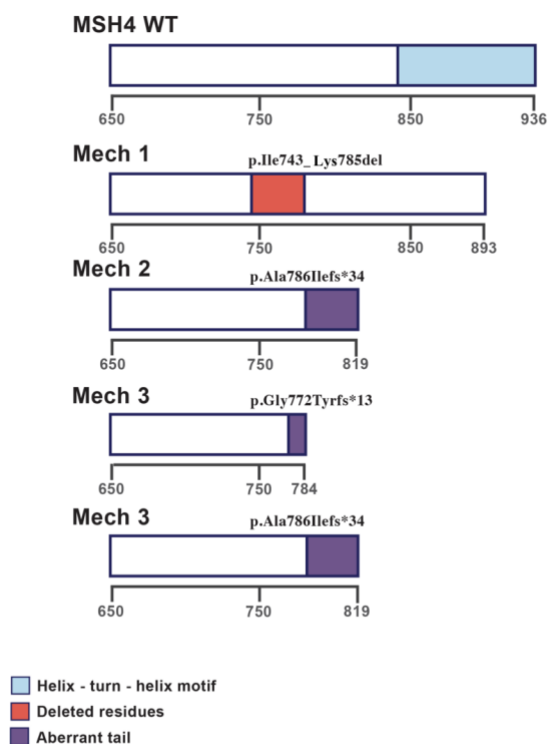


Figura 11. Predicción de la consecuencia a nivel proteico de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*

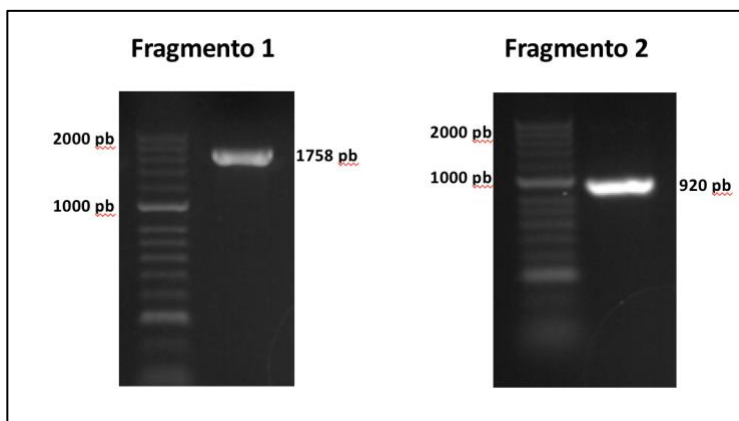


5.2. Minigenes / *Exon trapping*

5.2.1. PCR de la obtención de los fragmentos del cassette del *exon trapping*

Debido a la ausencia del material biológico (ovarios) para estudiar los probables transcritos de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*, se realizaron varios ensayos de exon-trapping/minigenes. Se generó un cassette tanto para la versión WT tal como para la versión mutante. A continuación, las imágenes del gel de agarosa al 1% del fragmento 1 que muestra una longitud de aproximadamente 1758 pb, y del fragmento 2920 pb.

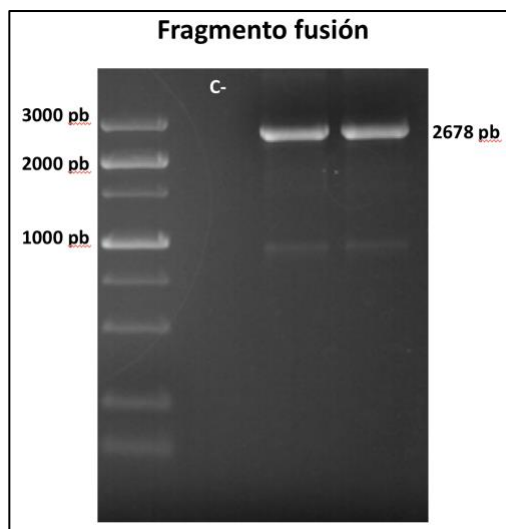
Figura 12. Amplificación del fragmento 1 y del fragmento 2 del cassette del *exon trapping*



5.2.2. PCR del fragmento de sobreposición y del fragmento fusión del cassette del *exon trapping*

A continuación, la imagen del gel de agarosa al 1% del fragmento fusión, que muestra una longitud aproximada de 2678 pb.

Figura 13. Amplificación del fragmento fusión del cassette del *exon trapping*



5.2.3. Verificación del clonaje y de la integridad de la secuencia del fragmento fusión en el vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®

Mediante la PCR de colonia del clonaje del fragmento fusión y posterior secuenciación de Sanger, se identificó una colonia mutante (*Mut*) con una variante en el intrón 16 sin variantes exónicas, y una colonia WT sin variantes. Estos productos de clonaje fueron llevados a purificación plasmídica y seguidamente fueron transfectados en células HeLa.

5.2.4. Ensayo del *exon trapping* de la variante c.2355+1G>A del gen *MSH4*

Los resultados de la RT-PCR posterior a la transfección de la versión mutante del *exon trapping*, (**Figura 14**), mostraron la presencia de una banda de 158 pb, lo que fue compatible con el *skipping* del exón 17. La condición WT mostró una banda de 287 pb lo que correspondió a un producto de *splicing* de la talla esperada. Mediante secuenciación de Sanger se confirmó que el fragmento WT no presentaba variantes mientras que el fragmento mutante portaba el *skipping* del exón 17 (**Figura 15**). Este resultado se relacionó con el cambio de la secuencia proteica p.Ile743_Lys785del.

Figura 14. RT-PCR del fragmento WT y del fragmento mutante

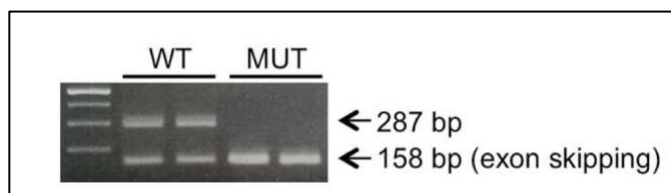
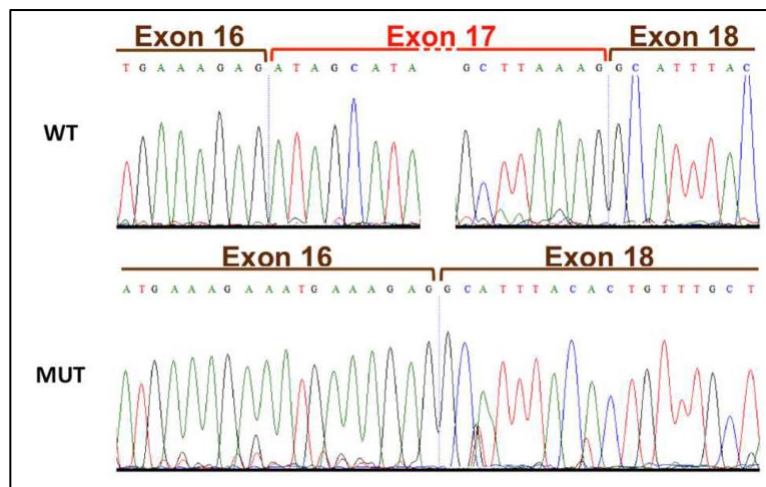


Figura 15. Secuenciación de Sanger del fragmento WT y del fragmento mutante



6. CONCLUSIONES

- La secuenciación de siguiente generación es una herramienta innovadora para el estudio de enfermedades complejas como la insuficiencia ovárica primaria.
- La mutación c.2355+1G>A del gen *MSH4* está asociada a defectos en el *splicing* y con la posible generación de proteínas aberrantes.
- Este estudio demuestra por primera vez que las mutaciones en *MSH4* son causales del fenotipo de insuficiencia ovárica primaria.

7. CONSIDERACIONES FINALES

El presente trabajo de tesis fue publicado en la revista *Human Molecular Genetics* (IF:5.34, Q1) (**Anexo 2**).

Referencia: Carlosama C, Elzaia M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. **A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene *MSH4* causes primary ovarian insufficiency**. Hum Mol Genet. 2017, 15;26(16):3161-3166. doi: 10.1093/hmg/ddx199. PubMed PMID: 28541421.

Además, durante mi curso de maestría participé en la realización de los experimentos y desarrollos teóricos de 2 artículos adicionales:

Referencia: Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. **New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing**. Hum Reprod. 2017, 1;32(7):1512-1520. doi: 10.1093/humrep/dex089. PubMed PMID: 28505269. (IF:5.02, Q1) (**Anexo 3**).

Referencia: Carlosama 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**. Clin Endocrinol (Oxf). 2018 May 28. doi: 10.1111/cen.13749. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29808484. (IF:3.48, Q1) (**Anexo 4**).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, *et al.* Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* [Internet] 2014;**370**:943–949.
- Caburet S, Zavadakova P, Ben-Neriah Z, Bouhali K, Dipietromaria A, Charon C, Besse C, Laissue P, Chalifa-Caspi V, Christin-Maitre S, *et al.* Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure. *PLoS One* 2012;**7**:1–6.
- Castro T, Mateus HE, Fonseca DJ, Forero D, Restrepo CM, Talero C, Vélez A, Laissue P. Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurol Sci* [Internet] 2013;**34**:2219–2222.
- Conway GS. Premature ovarian failure. *Br Med Bull* [Internet] 2000;**56**:643–649.
- Coulam CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril* [Internet] 1982;**38**:645–655.
- Diggle CP, Parry DA, Logan C V, Laissue P, Rivera C, Restrepo CM, Fonseca DJ, Morgan JE, Allanore Y, Fontenay M, *et al.* Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Hum Mutat* [Internet] 2012;**33**:1175–1181.
- Ducat A, Doridot L, Calicchio R, Méhats C, Vilotte J-L, Castille J, Barbaux S, Couderc B, Jacques S, Letourneur F, *et al.* Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep* [Internet] 2016;**6**:19196.
- Fonseca DJ, Garzón E, Lakhal B, Braham R, Ojeda D, Elghezel H, Saâd A, Restrepo CM, Laissue P. Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2012a;**24**:339–341.
- Fonseca DJ, Ojeda D, Lakhal B, Braham R, Eggers S, Turbitt E, White S, Grover S, Warne G, Zacharin M, *et al.* CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Transl Res* [Internet] 2012b;**160**:384–388.
- Fonseca DJ, Ortega-Recalde O, Esteban-Perez C, Moreno-Ortiz H, Patiño LC, Bermúdez OM, Ortiz AM, Restrepo CM, Lucena E, Laissue P. BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian

- failure. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2014;**29**:627–633.
- Fonseca DJ, Patiño LC, Suárez YC, Jess Rodríguez A De, Mateus HE, Jimenez KM, Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, Laissue P. Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril* 2015;**104**:154–162.e2.
- Fonseca DJ, Prada CF, Siza LM, Angel D, Gomez YM, Restrepo CM, Douben H, Rivadeneira F, Klein A de, Laissue P. A de novo 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *Am J Med Genet A* [Internet] 2012c;**158A**:689–693.
- Fonseca DJ, Rojas RF, Vergara JI, Ríos X, Uribe C, Chávez L, Velandia F, Vargas CI, Restrepo CM, Laissue P. A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *Br J Dermatol* [Internet] 2013;**168**:456–458.
- Forero DA, Wonkam A, Wang W, Laissue P, López-Correa C, Fernández-López JC, Mugasimangalam R, Perry G. Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries. *J Med Genet* [Internet] 2016;**53**:438–440.
- L'Hôte D, Laissue P, Serres C, Montagutelli X, Veitia RA, Vaiman D. Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *Bioessays* [Internet] 2010;**32**:132–142.
- Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol* [Internet] 2015;**411**:243–257.
- Laissue P, Burgio G, L'Hôte D, Renault G, Marchiol-Fournigault C, Fradelizi D, Fellous M, Serres C, Montagutelli X, Monget P, *et al.* Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *Int J Dev Biol* [Internet] 2009a;**53**:623–629.
- Laissue P, L'hôte D, Serres C, Vaiman D. Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal* [Internet] 2009b;**3**:55–71.

- Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, Philibert P, Saâd A, Sultan C, Fellous M, *et al.* Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet* [Internet] 2009c;**46**:455–457.
- Laissue P, Lakhal B, Vatin M, Batista F, Burgio G, Mercier E, Santos E Dos, Buffat C, Sierra-Diaz DC, Renault G, *et al.* Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biol* [Internet] 2016;**6**:.
- Laissue P, Restrepo CM, Ortiz AM. Improving the evaluation of milestones for students completing a clinical genetics elective. *Genet Med* [Internet] 2017;**19**:.
- Lakhal B, Laissue P, Braham R, Elghezal H, Saâd A, Fellous M, Veitia RA. A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet] 2009;**71**:752–753.
- Lakhal B, Laissue P, Braham R, Elghezal H, Saâd A, Fellous M, Veitia RA. BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms? *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet] 2010;**72**:425–426.
- Lakhal B, Laissue P, Elghèzal H, Fellous M. [Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes]. *Gynecol Obstet Fertil* [Internet] 2008;**36**:862–871.
- Mateus HE, Pérez AM, Mesa ML, Escobar G, Gálvez JM, Montaña JI, Ospina ML, Laissue P. A first description of the Colombian national registry for rare diseases. *BMC Res Notes* [Internet] 2017;**10**:514.
- Mitropoulos K, Jaibei H Al, Forero DA, Laissue P, Wonkam A, Lopez-Correa C, Mohamed Z, Chantratita W, Lee MTM, Llerena A, *et al.* Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Hum Genomics* [Internet] 2015;**9**:11.
- Niño MY, Mateus HE, Fonseca DJ, Kroos MA, Ospina SY, Mejía JF, Uribe JA, Reuser AJJ, Laissue P. Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. 2012;, p. 39–48Available from: http://link.springer.com/10.1007/8904_2012_138.
- Ortega-Recalde O, Beltrán OI, Gálvez JM, Palma-Montero A, Restrepo CM, Mateus HE,

- Laissue P. Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clin Genet* [Internet] 2015a;**88**:e1-3.
- Ortega-Recalde O, Fonseca DJ, Patiño LC, Atuesta JJ, Rivera-Nieto C, Restrepo CM, Mateus HE, Knaap MS van der, Laissue P. A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion* [Internet] 2013a;**13**:749–754.
- Ortega-Recalde O, Moreno MB, Vergara JI, Fonseca DJ, Rojas RF, Mosquera H, Medina CL, Restrepo CM, Laissue P. A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clin Exp Dermatol* [Internet] 2015b;**40**:757–760.
- Ortega-Recalde O, Silgado D, Fetiva C, Fonseca DJ, Laissue P. Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth-Macklin caused by a KRT1 mutation. *Br J Dermatol* [Internet] 2016;**175**:1372–1375.
- Ortega-Recalde O, Vergara JI, Fonseca DJ, Ríos X, Mosquera H, Bermúdez OM, Medina CL, Vargas CI, Pallares AE, Restrepo CM, *et al.* Whole-Exome Sequencing Enables Rapid Determination of Xeroderma Pigmentosum Molecular Etiology. *PLoS One* 2013b;**8**..
- Patiño LC, Battu R, Ortega-Recalde O, Nallathambi J, Anandula VR, Renukaradhya U, Laissue P. Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS One* [Internet] 2014;**9**:e109576.
- Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Delemer B, Young J, Binart N, *et al.* New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Hum Reprod* [Internet] 2017a;**32**:1512–1520.
- Patiño LC, Silgado D, Laissue P. A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Syst Biol Reprod Med* [Internet] 2017b;**63**:145–149.
- Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, Agapiou D, Gilchrist RB, Laissue P, Harrison CA. BMP15 Mutations Associated With Primary

- Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2017c;**102**:1009–1019.
- Prada CF, Laissue P. A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mamm Genome* [Internet] 2014;**25**:618–635.
- Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen Z-J. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:787–808.
- Quintero-Ronderos P, Mercier E, Fukuda M, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Vaiman D, Gris J-C, Laissue P. Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. In Bandapalli OR, editor. *PLoS One* [Internet] 2017a;**12**:e0186149.
- Quintero-Ronderos P, Mercier E, Gris J-C, Esteban-Perez C, Moreno-Ortiz H, Fonseca DJ, Lucena E, Vaiman D, Laissue P. THBD sequence variants potentially related to recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2017b;**15**:92.
- Valero-Rubio D, Jiménez KM, Fonseca DJ, Payán-Gomez C, Laissue P. Transcriptomic analysis of FUCA1 knockdown in keratinocytes reveals new insights in the pathogenesis of fucosidosis skin lesions. *Exp Dermatol* [Internet] 2018;Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13532>.
- Vatin M, Bouvier S, Bellazi L, Montagutelli X, Laissue P, Ziyyat A, Serres C, Mazancourt P De, Dieudonné M-N, Mornet E, *et al.* Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *Am J Pathol* [Internet] 2014;**184**:362–368.
- Vatin M, Burgio G, Renault G, Laissue P, Firlej V, Mondon F, Montagutelli X, Vaiman D, Serres C, Ziyyat A. Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS One* [Internet] 2012;**7**:e43356.
- Velasco HM, Martín ÁM, Galvis J, Buelvas L, Sánchez Y, Umaña LA. Genética clínica comunitaria: exploración de patología genética en Boyacá, Colombia. *Rev Salud publica* 2017;**19**:32–38.
- Vries L de, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome

sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2014;**99**:E2129-32.

Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, *et al.* MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet* [Internet] 2014;**95**:754–762.

37

gtaacataagatgtgtgacttcaegtcattattttaaagtattgccaatttcaattatagattttaaagttatgagatatcaagaagaatga
 acatcactcagtgacgttaacctcttttggaaaaggggttagtgctttcagttgtgtgaagacagttgtatcatattagaggggaa
 gtatgaectaattattgttctcattttagattaagtgtgtgtataaaggagatgectatggatgccaagtttacaaggggtggatttgtgtg
 aatagttttatgttcaacttggcaaggtcatgggggtgcccagacatttggccaacattctgggtttatctgtaagggcatttctggatg
 agattagtagactgaatgaagcatattgecttccctaggggtggatgggtcccatcaataaattgaaagcctgaatagaagaaaaag
 getgatecttetaagaataagagagaacttactgeectcaatetgaaatactgaaagactaaattgeectcagactcaaacgaaacatt
 ggctctttetaagtetaacagettgcaggcatttggactggagttatccatcaactctctgggtctccagettgtgactgtagattttga
 tcttgcagcctccataattgcatgagccaattccatataataaattctttacacacatacaacacacacacacacacacacacac
 ac
 atggagttttactcttttcccaggtggagtgagtgagtgatctcagctcactgcaacttccacctcacagggtcaagcatacagt
 atctgtttccaaagtatttacaatagttttaaatagtgttttagtattactttacaatatttttctagtataataatttaataaaaaatgta
 attgetacttatttttaatttatttttetaaacacagtatcttagtgectageacaattcttgcacagataggggtgtaataattttt
 getaaattgaattaaactgaaatagagttacaaaagttctetaatagattgggttggcatataacttttaaggacatttattgtaata
 agtctetaccttttaaatagcttactgtgttctaaatatttctgtagctttataaatttgggtttgtttatactcttttattgtttaggta
 tttagaattttcttttctgtcatatacaaaaattatcttcttctgttttcaacttccatagttgatagccatttgcacacacacacac
 gtcttaatttttaatttccactgaacacctaactaatttgcactcataatgtctttaaagctaaactgggtattcagatctctatctgectag
 taaattctgggtgggaaattctgtgctggctgtaagtcacttgaaccactttcatcaaaatcacctaaagtacttacagaaaatg
ccatttccctggggcgccacattagaactattgggtgacaattttcaggggatatgtaccaagaatttgcattgtttaacaggct
ctctaagggattactaatgtttgagagccattatcttaatcagtggttctcaatctttcttttctaccagtacctaaccctaaa
cacaatgaagtctaaaaactaaaaacttttggaaattgacatacctaagacaatctcttgattccactgccaacacctaactta
caactagggaggctacttttatagtttaagtttttaaaaaattgaggaaaatattatttttttgcattgtgagttaccttctaata
aatgattacttcaattcatagctttgtttctgtgtaaaacttcatcttttcaatatcttcagatatatttttaggattttattttcagttt
tgttctctttccataatgtggcatacacgtctgtgcacaaacataataaacatatcttcttcatttaataaaaaatctcaaac
attttaaaatggattgataatgttagcctccaaattattagttttattctcatctctgccaagctacttagaaaattaaacta
aaattttatgttcacatagttaaaatagaattttctagtttaatttttaaggtactaatattcattgtctgttatattccagGCA
TTTACACTGTTTGCTACACATTTCTGGAAGTATGCCATATTGATGCCCTGTATC
CTAATGTAGAAAACATGCATTTGAAGTTCAACATGTAAAGAATACCTCAAGA
AATAAAGAAGCAATTTTGTATACCTACAACTTTCTAAGGGACTCACAGAAGA
GAAAAATTATtag

Anexo 2. Artículo publicado en *Human Molecular Genetics*

Carlosama C, Elzaiat M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene *MSH4* causes primary ovarian insufficiency. Hum Mol Genet. 2017, 15;26(16):3161-3166. doi: 10.1093/hmg/ddx199. PubMed PMID: 28541421.

Anexo 3. Artículo publicado en *Human Reproduction*

Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, Delemer B, Young J, Binart N, Laissue P. **New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing.** Hum Reprod. 2017, 1;32(7):1512-1520. doi: 10.1093/humrep/dex089. PubMed PMID: 28505269.

Anexo 4. Artículo publicado en *Clinical Endocrinology*

Carlosama 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.** Clin Endocrinol (Oxf). 2018 May 28. doi: 10.1111/cen.13749. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29808484.