



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

De la bioinformática traslacional a la bioquímica personalizada. Identificación y análisis del efecto fenotípico de variantes genéticas aplicado a la deficiencia de hormonas hipofisarias.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Sebastián Alexis Vishnopolska

Director:

- Dr. Marcelo A. Martí

Directora Adjunta:

- Dra. María Inés Pérez Millán

Consejero de estudios:

- Dr. Alejandro Nadra

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional- Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina. 11 de Julio de 2022

Título: De la bioinformática traslacional a la bioquímica personalizada. Identificación y análisis del efecto fenotípico de variantes genéticas aplicado a la deficiencia de hormonas hipofisarias.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Sebastián Alexis Vishnopolska

Resumen

La deficiencia de hormonas hipofisarias o hipopituitarismo congénito (HC) suele presentarse con fenotipos altamente variables y usualmente se ve asociada a otros defectos congénitos. Numerosos genes han sido descritos en la etiología de HC, sin embargo, se estima que solo el 16% de los pacientes recibe un diagnóstico genético certero, dejando a la mayoría de los casos familiares y esporádicos inconclusos. En este trabajo de tesis implementamos un panel de testeo de genes, utilizando secuenciación de *single-molecule molecular inversion probes*. Este panel consta de un conjunto de 104 genes, los cuales incluyen genes previamente reportados y genes candidatos a causar HC. Capturamos ADN genómico de 265 pacientes argentinos pediátricos con HC, ya sea aislado o con otras anomalías. Encontramos variantes candidatas patogénicas, posiblemente patogénicas y de significado incierto (VUS) en el 56% de los casos.

Con el fin de validar los efectos de variantes VUS en los genes ya descritos como causantes de la patología, *LHX3*, *LHX4*, y *GLI2*, realizamos ensayos funcionales *in-vitro*, utilizando líneas celulares humanas. Para evaluar las variantes en *LHX3/4* se co-transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión conteniendo los cDNAs de *LHX3/4* wild type (WT) ó mutados, junto con plásmidos reporteros. Estos últimos, contienen el gen de la luciferasa río abajo de los promotores de α GSU ó GH-1, para *LHX3* y 4, respectivamente. Para el análisis funcional de *GLI2* utilizamos la línea celular NIH/3T3-CG, la cual fue transfectada establemente para expresar GFP ante la presencia de la forma activa de *GLI2*. El gen *Gli2* endógeno fue *knockeado* por CRISPR-Cas9. Utilizamos entonces esta nueva línea reportera para evaluar la capacidad de *GLI2* WT ó mutado de restaurar la expresión de GFP. Mediante estos distintos experimentos funcionales, concluimos que las variantes *LHX3*:p.Pro187Ser *LHX4*:p.Arg84His, p.Gln100His y p.Trp204Leu y *GLI2*:p.Ser1404Lfs afectan a la activación del gen reportero, mientras que las variantes *LHX3*:p.Leu220Met, *GLI2*:p.Ala203Thr y p.Leu761Pro tiene actividad equivalente a las proteínas WT en sus respectivos ensayos.

Por otro lado, evaluamos una variante sinónima en *POU1F1* y una variante intrónica en *PNPLA6*, ambas identificadas por secuenciación completa de exoma y genoma respectivamente y predichas como disruptores del splicing. Análisis del ARN de los pacientes confirmaron que ambas variantes afectan la longitud del ARN mensajero, probablemente afectando la función de la proteína o su presencia.

Por último, proponemos la creación de un catálogo funcional para variantes en los genes *POU1F1* y *GLI2*. Para ello, construimos todas las posibles variantes de nucleótido

único en el exón 2 de *POU1F1*, región involucrada en splicing, por mutagénesis de saturación. Luego de transfectar células COS7 con los plásmidos conteniendo todas las variantes, se secuenció el ARN transcripto y se evaluó la proporción de las distintas isoformas de POU1F1 ó la pérdida completa del exón. Asimismo, desarrollamos los primeros pasos para evaluar de manera equivalente múltiples variantes en el dominio de transactivación de GLI2.

Creemos que el análisis funcional de variantes potencialmente patogénicas se vuelve crítico a la hora de definir un diagnóstico molecular preciso. En este trabajo queda plasmada esta necesidad, y se muestra que la identificación de variantes causantes de HC es una tarea complicada debido a la variación fenotípica y penetrancia incompleta. Se debe seguir trabajando en la creación de un catálogo entero de efectos de variantes en genes causantes de la patología, disponible para los/as médicos/as, de forma de simplificar la interpretación de variantes nóveles encontradas y reducir así la odisea de diagnóstico.

Palabras clave: bioinformática - genética humana - hipófisis - desarrollo - molecular inversion probes - panel de genes - exoma - genoma - deficiencia hormonal - massive allele variant effects

Title: From translational bioinformatics to personalized biochemistry. Analysis of the phenotypic effect of genetic variants in pituitary hormone deficiency.

Abstract

Congenital hypopituitarism (CH) presents with highly variable phenotypes and is often associated with other birth defects. Several genes have been described in CH etiology, however only an estimated 16% of patients receive a genetic diagnosis, thus the majority of familial and sporadic cases have unknown genetic origin. We implemented a target panel genetic screening using single-molecule molecular inversion probes sequencing to identify causative mutations in a set of 104 previously reported and candidate associated genes. We captured genomic DNA from 265 argentinean pediatric patients with CH, either alone or with other abnormalities. We found candidate pathogenic, likely pathogenic and uncertain significance variants (VUS) in 56% of the cases.

In order to validate the effects of VUS in known causative genes *LHX3*, *LHX4*, and *GLI2*, we performed *in-vitro* functional assays to study the activity of the mutated proteins. To test *LHX3/4* variants we co-transfected HEK293T cells with wild type (WT) or mutated *LHX3/4* variant plasmids and the luciferase reporter gene downstream of *α GSU* promoter or *GH1* promoter respectively, and the luciferase assay was performed. For *GLI2* functional analysis, we used the cell line NIH/3T3-CG, which was stably transfected to express GFP under the presence of *GLI2* activated form. Endogenous *Gli2* was knocked out by CRISPR-Cas9 and clones were selected for absence of GFP expression upon activation of the sonic hedgehog pathway. We tested the ability of transfected WT or mutated *GLI2* expression plasmids to restore GFP fluorescence. We concluded that variants *LHX3*:p.Pro187Ser *LHX4*:p.Arg84His, p.Gln100His and p.Trp204Leu and *GLI2*:p.1404Lfs impair activation of the reporter gene, while the *LHX3*:p.Leu220Met and *GLI2*:p.L761P have WT activity on their respective assays.

We also tested a synonymous variant in *POU1F1* and an intronic variant in *PNPLA6*, both found in whole exome and whole genome sequencing respectively, that splicing predictors assessed as splicing disruptive. Minigen experiments confirmed that both variants affect the length of the resulting ARN, possibly affecting protein function or availability.

Finally, we proposed to create a catalog of functional testing of variants for *POU1F1* and *GLI2*. We created all possible SNV in exon 2 of *POU1F1* by saturation mutagenesis in a minigen plasmid, transfected cells and then extracted and sequenced ARN transcribed from the plasmid. That allowed us to test whether each variant affected the proportion of alpha, beta isoforms of *POU1F1*, or promoted exon skipping. Finally, we developed the first steps to test in a similar fashion multiple variants of *GLI2*.

Identification of disease causing variants in CH is complicated by phenotypic variation and incomplete penetrance. Functional testing of potential pathogenic variants becomes critical to arrive at a definitive molecular diagnosis. Further work needs to be done to have a full catalog of variant effects in known causative genes available to clinicians in order to simplify the interpretation of novel found variants and reduce diagnostic odyssey.

Keywords: bioinformatics - human genetics - pituitary - development - molecular inversion probes - gene panel - exome - genome - hormone deficiency - massive allele variant effects

ÍNDICE

Introducción General	5
Hipótesis y objetivos	22
Capítulo 1 - Diseño de MIPS y secuenciación de pacientes	23
1A - Introducción	23
1B - Materiales y Métodos	27
1C - Resultados	42
Capítulo 2 - Ensayos funcionales	65
2A - Materiales y Métodos	65
2B -Resultados	76
Capítulo 3 - Massive Parallel Variant Effects Assays	87
3A - Introducción	87
3B - Materiales y Métodos	90
3C - Resultados	95
DISCUSIÓN	105
ANEXO	116
BIBLIOGRAFÍA	131

Introducción General

La Hipófisis como órgano endócrino

La hipófisis es una pequeña glándula que se encuentra en una estructura llamada Silla Turca, un hueso óseo ubicado en la base del cráneo, debajo del cerebro y por detrás del puente nasal (Patel et al. 2016). Es un regulador central del crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la homeostasis. En humanos se encuentra dividida en 2 regiones, la hipófisis anterior, o adenohipófisis, derivada del ectodermo oral, y la hipófisis posterior o neurohipófisis, una prolongación directa de neuronas del hipotálamo, derivada del ectodermo neural (Amar and Weiss 2003). La hipófisis es un órgano central en el sistema endócrino, formando parte del eje Hipotálamo-Hipófisis-Órgano Blanco. El hipotálamo es el centro sensorial de los requerimientos hormonales del organismo, y libera péptidos/hormonas que comandan el funcionamiento de la hipófisis, la cual frente a este estímulo sintetiza y libera otras hormonas con diversas funciones en los órganos blanco (Clarke 2014).

La adenohipófisis contiene cinco tipos de células endocrinas: los somatotropos que sintetizan y liberan hormona de crecimiento (GH del inglés Growth Hormone); los corticotropos, hormona adrenocorticotrópica (ACTH); los tirotropos, hormona estimulante de la tiroides (TSH); los lactotropos, prolactina (PRL) y los gonadotropos que producen tanto hormona luteinizante (LH) como hormona folículo estimulante (FSH). A su vez, se encuentran presentes otros tipos celulares no endocrinos, como las células folículo estrelladas, células madre, células endoteliales y pericitos. En la neurohipófisis se encuentran las terminales axónicas de neuronas del hipotálamo que secretan vasopresina (AVP) y oxitocina.

La GH es una hormona peptídica liberada por los somatotropos frente a la acción de la hormona liberadora de GH (GHRH), secretada en el hipotálamo, y es inhibida por acción de la somatostatina y la propia GH (Giustina et al. 2008). Esto produce que su secreción se dé de manera pulsátil, con 6-8 picos de liberaciones por día en humanos (Daughaday 2000). En sangre, la mayor parte de la GH circula unida a la proteína de unión a GH, que corresponde al dominio extracelular del receptor de GH (GHR). La GH promueve, principalmente en el hígado, la liberación del Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), que retroalimenta negativamente en el hipotálamo, inhibiendo la liberación de GH. De manera sistémica, la GH baja la masa de grasa corporal; aumenta la masa muscular y la fuerza; promueve el crecimiento de los huesos largos y aumenta su densidad mineral; promueve la lipólisis y la disponibilidad de ácidos grasos; aumenta la síntesis de proteínas; induce la resistencia periférica a la insulina y reduce la absorción de glucosa en los músculos. La GH y el IGF-1 actúan de manera coordinada con la insulina para promover el crecimiento en momentos de suficiente aporte nutritivo, permitiendo la hipertrofia celular frente a los estímulos correctos, previniendo la apoptosis, y estimulando la división celular (Clemmons 2012).

La ACTH es la hormona intermediaria en el eje Hipotalámico-Hipófisis-Adrenal, un eje crítico para la homeostasis de los niveles adecuados de glucocorticoides. Las neuronas del núcleo parvocelular del hipotálamo, responden a estímulos de los ciclos de luz/oscuridad y a la

presencia real o percibida de estrés, secretando hormona liberadora de corticotropina (CHR) hacia el sistema porta, lo cual estimula la liberación de ACTH por los corticotropos. La ACTH viaja por circulación sistémica hasta llegar hasta la zona fasciculata de la corteza adrenal, activando la subsecuente síntesis *de novo* y liberación de glucocorticoides, entre ellos, el cortisol. Los glucocorticoides tienen particular función hiperglucemiante, promoviendo la gluconeogénesis en el hígado, e inhibiendo la utilización de la glucosa en todo el organismo. También tienen función a nivel inmunológico, inhibiendo los procesos inflamatorios; a nivel neuronal, en el comportamiento y memoria (Oitzl et al. 1997); y participan en el metabolismo del agua.

Los tirotropos secretan TSH frente a la acción de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), un poderoso secretagogo liberado por el hipotálamo. La TSH consiste en un dímero de la subunidad de α -glucoproteína (α GSU) y TSH β (Drouin et al. 1998). La subunidad α GSU es común tanto para TSH, LH y FSH. El órgano blanco de la TSH es la tiroides, estimulando la liberación de las hormonas triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4), los cuales son elementos regulatorios esenciales en el metabolismo y desarrollo de vertebrados. Las hormonas tiroideas (TH) actúan mediante receptores nucleares, regulando el proceso de transcripción (Ortiga-Carvalho et al. 2014). La hormona T3 promueve el desarrollo neuronal tanto en cerebro como cerebelo (Martinez and Gomes 2002), la diferenciación de las células de la glía, el desarrollo de la retina y las estructuras de la membrana tectorial de las células sensoriales del oído (Meza et al. 1996). En el corazón, las TH participan en la diferenciación y funcionalidad de los cardiomiocitos, teniendo la T3 un efecto inotrópico directo sobre la contractibilidad cardíaca (Swanson et al. 2003). Las TH tienen un rol principal en la regulación del balance energético, la temperatura corporal y el metabolismo de nutrientes. Estimula la termogénesis basal y adaptativa, estimula tanto la síntesis como degradación de lípidos, la síntesis de colesterol y su uso por las células y su metabolismo a ácidos biliares (Ness and Lopez 1995). Participan en el metabolismo de carbohidratos y tienen influencia sobre los centros reguladores del apetito. Por último, las TH tienen un marcado efecto en el crecimiento lineal y la maduración ósea (Waung et al. 2012).

Las gonadotropinas, FSH y LH, son esenciales para la maduración sexual y la función reproductiva. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sintetizada por el hipotálamo, es el principal agente estimulante en su liberación (Belchetz et al. 1978). De esta forma estas hormonas entran en circulación, actuando principalmente sobre los ovarios y testículos, regulando la foliculogénesis, ovulación, espermatogénesis y esteroidogénesis (Burger et al. 2004). FSH y LH son dímeros de glucoproteínas compuestos por una subunidad alfa en común α GSU (Drouin et al. 1998) y distintas subunidades beta (FSH β ó LH β , respectivamente) (Cicccone and Kaiser 2009) (Gharib SD et al. 1990).

Por último, la prolactina es una hormona producida en la hipófisis por los lactotropos, cuya función más conocida es la expansión del epitelio mamario y la estimulación de la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, en modelos murinos, se demostró que la prolactina tiene múltiples blancos y funciones pleiotrópicas, incluidos roles en el metabolismo (Freemark et al. 2002), la piel y folículos pilosos (Langan et al. 2010), homeostasis ósea, cuidado materno y función adrenal (Bernard et al. 2019).

Desarrollo embrionario de la hipófisis

El desarrollo de la hipófisis anterior durante la embriogénesis es dependiente de una sucesión temporal y espacial de distintas moléculas señalizadoras y factores de transcripción, que llevan a las células del órgano a dividirse y diferenciarse. Principalmente, el desarrollo de la glándula fue y es estudiado en modelos murinos y se presume una cierta correlación en el desarrollo de la hipófisis humana. En embriones de vertebrados, los órganos sensoriales craneales (ojos, nariz, oídos) y los ganglios sensoriales son formados con la contribución de células derivadas de placodas del ectodermo cranial. Las placodas son regiones transitorias de epitelio columnar engrosadas que se forman en posiciones específicas en el ectodermo en el embrión en desarrollo. Entre las placodas olfatorias, señalando probablemente un origen filogenético en común, se desarrolla la placoda Adeno-hipofisaria impar, una evaginación del ectodermo oral (Duque Osorio 2003), que aparece en ratones en el día embrionario (E) 7.5. Para el E9.0 la placoda se invagina y forma la rudimentaria bolsa de Rathke, la cual dará origen a los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis (Takuma et al. 1998). Por otro lado, en la base del ectodermo neural ocurre una evaginación que dará origen a la hipófisis posterior. Entre los días E10.5 y E12.5, el epitelio de la bolsa de Rathke sigue proliferando y para el E12.5 se separa del ectodermo oral. Luego, las células progenitoras proliferan ventralmente y migran para ocupar la región que formará al lóbulo anterior (Ward et al. 2006) (Pérez Millán et al. 2016). Las primeras células secretoras de hormonas que empiezan a diferenciarse son los corticotropos, manifestándose por la expresión de *Pomc*, que también es expresado por los melanotropos del lóbulo intermedio. Luego los tirotropos son detectados por la expresión de *Tshb* en algunas células del lóbulo anterior, y para E15.5 la expresión de *Gh* y *Prl* marca la diferenciación de somatotropos y lactotropos respectivamente. Para E18.5 el número de somatotropos aumenta marcadamente, migrando hacia las regiones centrales y laterales del lóbulo anterior, mientras los lactotropos permanecen mayormente localizados en la zona medial, en la zona adyacente al lóbulo intermedio. Los gonadotropos son las últimas células en completar la diferenciación. La distribución de los distintos linajes celulares no es al azar, sino que se mantienen redes estructurales y funcionales que permiten la acción coordinada de las distintas células a estímulos específicos y contribuyen a la plasticidad de la glándula (Alatzoglou et al. 2020). Respecto a esto último, particularmente se identificaron células madre o *stem cells* *Sox2* (+) que persisten en la hipófisis adulta que mantienen la habilidad de proliferar y diferenciarse a cada linaje celular, de modo de suplir a la glándula de células productoras de hormonas en caso de injuria u otros estímulos fisiológicos, según los requerimientos.

Moléculas señalizadoras y Factores de Transcripción durante el desarrollo hipofisario embrionario

A modo de resumen se muestra en la Fig. 1, el proceso de diferenciación de la hipófisis indicando los principales factores de transcripción y moléculas señalizadoras involucradas, que luego se describirán en detalle.

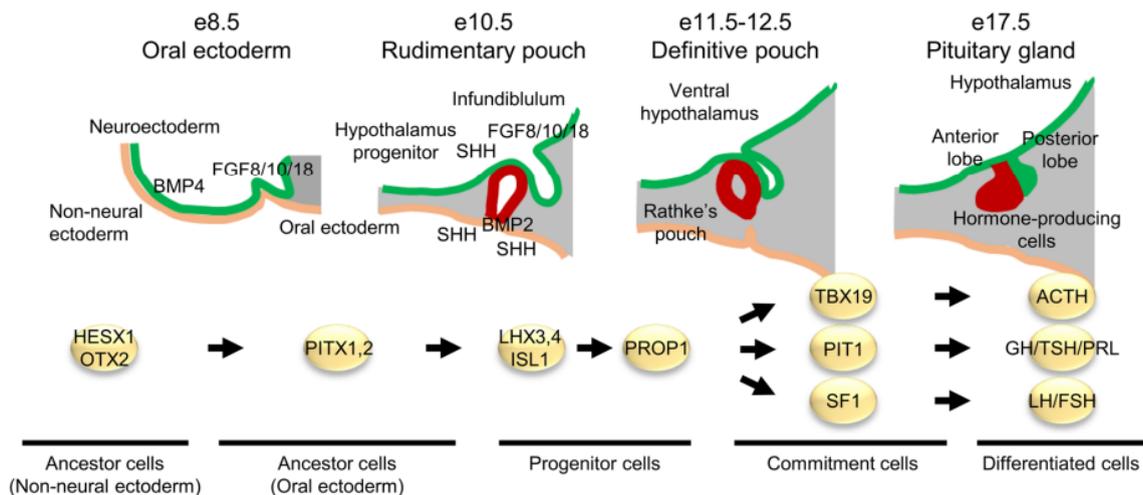


Figura 1: Diferenciación *in vivo* de la hipófisis en ratón (arriba). El primer signo del desarrollo de la hipófisis es el engrosamiento del ectodermo oral. Luego de recibir moléculas señalizadoras del hipotálamo ventral, el ectodermo oral se invagina hacia el infundíbulo (e10.5) y subsecuentemente se forma una estructura provisoria llamada bolsa de Rathke (e11.5–12.5). Los lóbulos anteriores e intermedios de la hipófisis derivan de la misma, y el lóbulo posterior a partir del infundíbulo (e17.5). Durante este proceso, se expresan diversas moléculas señalizadoras y factores de transcripción de manera ordenada temporal y espacialmente (abajo) para dar lugar a los distintos linajes celulares productores de hormonas. Imagen de (Matsumoto and Takahashi 2020).

En el comienzo de la diferenciación de la placoda hipofisaria, la molécula Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) se detecta en el futuro infundíbulo hipotalámico (porción del hipotálamo que lo conecta a la hipófisis), al momento de contacto entre el diencéfalo ventral y el ectodermo oral (Fig. 1). Desde ese momento da comienzo a la diferenciación de la hipófisis, induciendo la formación de la bolsa de Rathke y manteniéndola en el tiempo. La delección o pérdida de Bmp4 resulta en letalidad embrionaria, y los embriones que logran sobrevivir hasta E10 no muestran señales de formación de la placoda hipofisaria o la bolsa de Rathke (Takuma et al. 1998). Siguiendo a la expresión de BMP4, se genera una señalización derivada de la región ventral de la hipófisis anterior de BMP2, que induce la expresión de ISLET1 (Isl1) y α GSU, ambos marcadores ventrales hipofisarios (Davis and Camper 2007). Por otro lado, los factores de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) y FGF10 comienzan a expresarse en el infundíbulo, generando una señalización dorsal en la hipófisis. De esta manera BMP2 y FGF8 generan patrones de expresión espacialmente diferentes. FGF8 media la proliferación de las células de la bolsa de Rathke, induciendo la expresión de los factores de transcripción Lhx3 y Lhx4 (Ericson et al. 1998). Por su lado, FGF10 es necesario para la supervivencia de las células progenitoras en proceso de diferenciación (Celli 1998). Para la inducción de FGF8 y FGF10 es necesaria la expresión temprana del factor de transcripción Otx2 en el infundíbulo (Mortensen et al. 2014).

El morfógeno Sonic hedgehog (Shh) se expresa a su vez en el diencéfalo ventral y a lo largo del ectodermo oral, con excepción de la bolsa de Rathke. Sin embargo, en la futura hipófisis sí se expresa el receptor para SHH, Patched, lo que lleva a la activación o represión de genes vía los factores de transcripción de la familia Gli: Gli1, Gli2, y Gli3 (Treier et al. 2001). Río abajo de la cascada de señalización se encuentran genes como Bmp2, Gata2 y Pou3f4, requeridos para la diferenciación de los tipos celulares ventrales en

la bolsa de Rathke. La pérdida de función en Shh en el diencefalo ventral, produce un fenotipo severo en ratones con defectos a nivel hipotalámico, hipofisario y ocular, reminiscente al fenotipo de Displasia Septo-Óptica (SOD) en humanos (Zhao et al. 2012).

Pitx1, miembro de la familia de factores de transcripción con homeodominio, se detecta en el ectodermo anterior a partir de E8 y se expresa a lo largo del ectodermo oral en la bolsa de Rathke, manteniéndose su expresión durante el desarrollo de todos los linajes celulares productores de hormonas. Comparte cierta función redundante con Pitx2. Este gen se activa por vía de señalización de Wnt, y a su vez, regula el ciclo celular mediante la expresión de las ciclinas D1 y D2. La falta de Pitx2 en la hipófisis lleva a la nula expresión de Lhx3 (Charles et al. 2005).

Existen cuatro factores de transcripción con homeodominio LIM importantes en el desarrollo de la hipófisis: ISL1, LHX2, **LHX3 y LHX4**. ISL1 estaría principalmente involucrado en el desarrollo y función de los tirotropos y en la iniciación de la diferenciación a gonadotropos (Castinetti et al. 2015). **Lhx3** se empieza a expresar uniformemente en la bolsa de Rathke a partir de E9.5, y se mantiene hasta la adultez. Participa en mantener la expresión de Hesx1 y Pou1f1 (Ellsworth et al. 2008), dos factores de transcripción importantes durante la diferenciación de los distintos linajes celulares de la hipófisis, que se describirán en los siguientes párrafos. **Lhx4** también se expresa en la bolsa de Rathke en E9.5, pero se restringe su localización al futuro lóbulo anterior (Mullen et al. 2007). Los ratones deficientes de **Lhx4** presentan adenohipófisis con todos los tipos celulares, pero con menor número de células, marcado por una elevada apoptosis, llevando a hipoplasia. Por último, si bien Lhx2 no se expresa en la bolsa de Rathke, se expresa en el diencefalo y el lóbulo posterior, y su falta lleva a falla de la evaginación del neuroectodermo y un lóbulo anterior desorganizado (Zhao et al. 2010).

El factor de transcripción Hesx1 es expresado tempranamente durante la gastrulación en la región que formará el prosencefalo y luego su expresión se restringe al diencefalo ventral y a la bolsa de Rathke (Andoniadou et al. 2007). Mientras que Lhx3 es importante para mantener la expresión de Hesx1, su expresión va disminuyendo progresivamente hasta desaparecer en E15.5, correlacionado a la progresiva diferenciación de la hipófisis. Hesx1 es típicamente un represor transcripcional y su regulación negativa es importante para la subsecuente activación de Prop1 y la emergencia del linaje celular Pou1f1 (+) (Dasen et al. 2001).

PROP1 (prophet of PIT-1) es el factor de transcripción específico de la hipófisis que más temprano se expresa. Aparece en la región dorsal de la bolsa de Rathke entre E10 y 10.5, tiene un pico de expresión en E12.0, luego se vuelve indetectable al E15.5 (Ward et al. 2005) y reaparece su expresión postnatal, durante los primeros 7 días de vida. PROP1 participa en el proceso de EMT (transición epitelio mesenquimal) de las células progenitoras hipofisarias a células diferenciadas y es el activador transcripcional de POU1F1, . Por otro lado, PROP1 está involucrado en la represión de HESX1 y OTX2 (Dasen et al. 2001). PROP1 es un gen frecuentemente alterado en pacientes con deficiencias hipofisarias congénitas.

POU1F1 (previamente conocido como PIT1), controla la expansión y diferenciación terminal de los somatotropos, lactotropos y tirotropos (Li et al. 1990) y es necesario para la

regulación transcripcional de GH1, PRL, TSH β , GHRHR. Participa en la represión del camino de diferenciación hacia gonadotropos, inhibiendo la expresión del factor de transcripción GATA2 (Dasen et al. 1999). Comienza a expresarse tardíamente (E14.5) y mantiene su expresión durante la adultez.

La expresión de GATA2 por su lado, se detecta en la región ventral de la bolsa de Rathke a partir de E10.5, inducido por PITX2 (Suh et al. 2002), marcando a los futuros tirotrapos y gonadotropos, y se mantiene su expresión hasta la adultez. En la ausencia de POU1F1, GATA2 induce la expresión de factores de transcripción que determinan la diferenciación a gonadotropos, incluido el factor esteroideogénico 1 (SF1), necesario para regular varios genes relacionados a la determinación sexual, la esteroideogénesis y la reproducción, incluidos CGA, LH β , FSH β , and GnRHR (Zhao et al. 2001).

Por último, TBX19 (antes conocido como TPIT), es un factor de transcripción de la familia T-Box que se expresa exclusivamente en la hipófisis, a partir de E12.5 en las células POMC (propiomelanocortina) (+), y posteriormente en corticotropos y melanotropos, manteniendo su expresión en la glándula adulta (Lamolet et al. 2001). TBX19 actúa en conjunto a PITX1 para activar al promotor de POMC, inhibir la diferenciación hacia gonadotropos antagonizando a SF1 (Pulichino et al. 2003) y promover la maduración de precorticotropos y premelanotropos a células endocrinas maduras (Pulichino et al. 2004).

Se hará mayor hincapié en algunos de estos factores de transcripción más adelante, indicando su relación a patologías en la hipófisis.

Patologías vinculadas al mal desarrollo de la Hipófisis: Hipopituitarismo congénito

La disfunción de la hipófisis, es decir, la inhabilidad de la glándula de producir una o más de sus hormonas (hipopituitarismo), es un importante problema de salud, principalmente causado por defectos congénitos (aunque también la causa del hipopituitarismo pueden ser otras, como trauma, radiación y/o adenomas hipofisarios, entre otras).

Las deficiencias hormonales pueden ser aisladas, siendo en este caso la deficiencia de hormona de crecimiento (IGHD por sus siglas en inglés: Isolated Growth Hormone Deficiency) la más común; ó pueden involucrar dos o más hormonas: deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD por Combined Pituitary Hormone Deficiency). La IGHD suele progresar con el tiempo en CPHD en aproximadamente el 45% de los pacientes (Blum et al. 2014) (Otto et al. 2014).

En la infancia, la presencia de baja estatura y baja velocidad de crecimiento suele ser la principal manifestación clínica de deficiencia de hormona de crecimiento. Otros fenotipos que se suelen observar en el neonato son hipoglucemia, ictericia prolongada, micropene y criptocordismo, alteraciones en el neurodesarrollo, obesidad, problemas cardiacos y malformaciones de la línea media (incluyendo cerebro, ojos y oídos). Actualmente, sólo el 16% de los casos con CPHD congénito puede explicarse por mutaciones en genes conocidos (Cogan et al. 1998) (Coya et al. 2007) (Dateki et al. 2010) (de Graaff et al. 2010) (De Rienzo et al. 2015) (Mehta and Dattani 2008) (Reynaud et al. 2006) bajando a un 11% en el caso de IGHD (Alatzoglou and Dattani 2010) (Wit et al. 2016).

El diagnóstico molecular, es decir, identificar a la o las variantes patogénicas que se asocian al fenotipo clínico del paciente, es crítico para predecir la progresión de la enfermedad y el riesgo de recurrencia familiar (Agarwal et al. 2000) (Böttner et al. 2004) (Flück et al. 1998) (Pernasetti et al. 2000). Algunos casos de CPHD congénitos están asociados a hipófisis agrandadas, y el diagnóstico molecular puede ayudar a distinguir a estas afecciones benignas de adenomas que pueden parecer similares en una resonancia magnética (MRI), evitando así una cirugía intracraneal innecesaria (Mendonca et al. 1999) (Riepe et al. 2001). El hipopituitarismo no detectado a tiempo, puede resultar en muerte infantil, mientras que casos de hipopituitarismo progresivos, pueden derivar en peligrosos riesgos a la salud asociados a hipoglucemia e insuficiencia renal (Couture et al. 2012) (Glaser et al. 1998).

Los defectos en el desarrollo de la hipófisis pueden derivar en CPHD congénito, y a veces puede estar asociado a anomalías extra hipofisarias, tal como labio leporino y paladar hendido, cuello corto y rígido e hipoplasia del nervio óptico. Por ejemplo mutaciones en *HESX1*, pueden causar displasia septo óptica (SOD), CPHD o IGHD (Dattani et al. 1998), mutaciones en *OTX2* pueden causar anomalías craneofaciales, incluida anoftalmia con o sin IGHD o CPHD (Dateki et al. 2008) (Tajima et al. 2009), y mutaciones en *GLI2* pueden causar holoprosencefalia, CPHD, o hipogonadismo hipogonadotrópico (Arnhold et al. 2015) (França et al. 2010). Se observa así una escala de fenotipos diferenciados en severidad, de los más leves como IGHD hasta los más graves como holoprosencefalia, en la que mutaciones en el mismo gen puede resultar en distintos fenotipos y más aún, la misma mutación en distintos pacientes tener expresividad variable y penetrancia incompleta.

Genes más comunes involucrados en Hipopituitarismo Congénito

A continuación se reforzará la importancia de algunos genes relacionados al desarrollo hipofisario. Estos genes fueron particularmente estudiados y analizados en este trabajo de tesis.

PROP1

El gen *PROP1* (Homeobox protein prophet of Pit-1; OMIM:*601538) ubicado en 5q35.3, codifica para un factor de transcripción específico de la hipófisis, y es el primero de este tipo en expresarse durante el desarrollo embrionario. Se identificó la presencia de tres exones que codifican para una proteína de 226 aminoácidos de largo (Duquesnoy et al. 1998). Es esencial para desarrollar una cantidad normal de células madre hipofisarias y estimula a estas células a que sufran un proceso de transición de tipo epitelial a mesenquimal (EMT) necesario para su migración y posterior diferenciación (Pérez Millán et al. 2016).

Los ratones *Prop1^{df/df}* (Ames) tienen una mutación de aparición espontánea p.Ser83Pro en el gen *Prop1*, en el dominio de unión al ADN (homeodominio), que resulta en una reducción de hasta 8 veces en su capacidad de unión (Somson et al. 1996). Estos animales exhiben enanismo severo con proporciones corporales adecuadas e infertilidad, y deficiencias de GH, TSH, PRL, LH y FSH (Slabaugh et al. 1981). Principalmente se observa una disminución en el número de somatotropos, tirotrópos y lactotópos, llevando a una hipófisis anterior hipoplásica y dismórfica (Gage et al. 1996).

En humanos, las mutaciones homocigotas o en heterocigosis compuesta en *PROP1* (Fig. 2) son la causa más común de CPHD, con un 11% del total de los casos a nivel mundial (Wu et al. 1998) (Deladoëy et al. 1999). Dos mutaciones de corrimiento de marco de lectura c.301_302delAG y c.150delA, son las más comunes en detectarse en pacientes con CPHD, y se originaron mediante un efecto fundador hace aproximadamente 101 generaciones o 2525 años en Europa Central y del Este (Dusatkova et al. 2015). Sin embargo, este efecto fundador no se comparte con las poblaciones de la península Ibérica (Portugal y España) y latinoamérica, por lo que resulta innovador estudiar la relevancia de mutaciones en este gen en la población local.

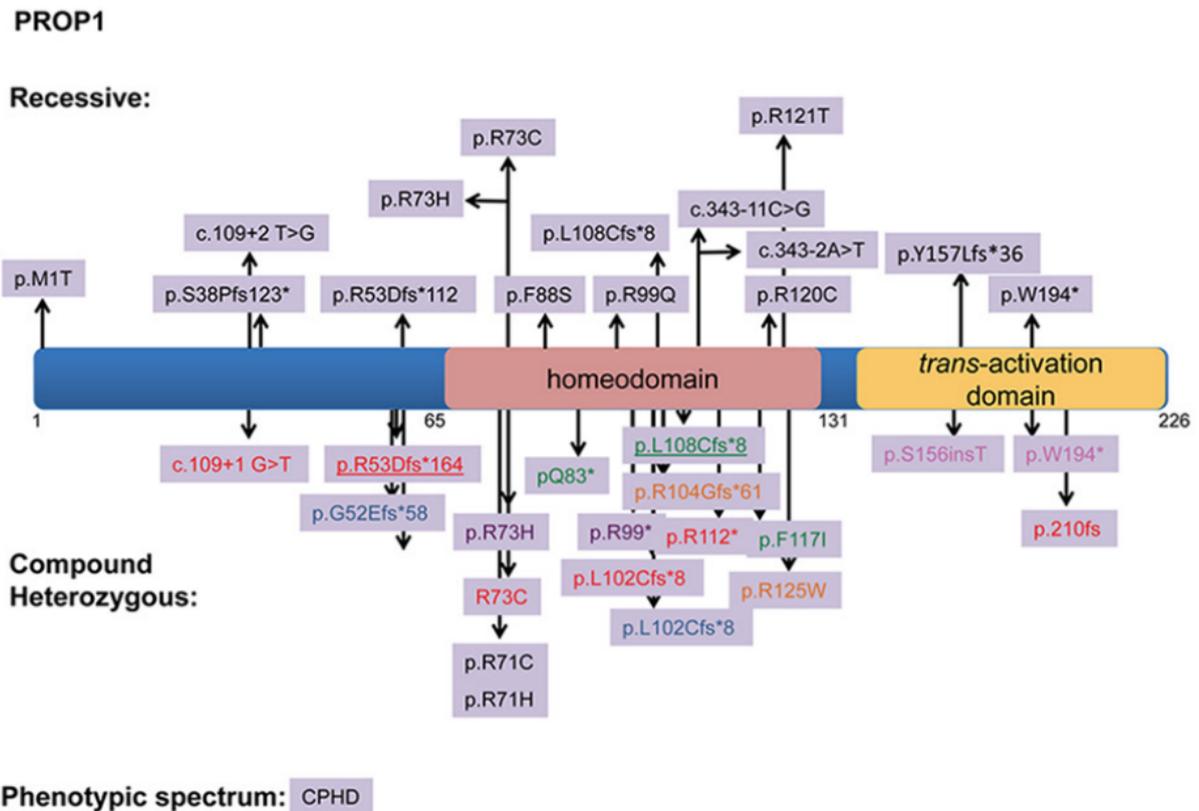


Figura 2: Mutaciones previamente reportadas en el gen PROP1 y su posición relativa en la estructura proteica. Se encuentran marcadas con el mismo color las mutaciones halladas en el mismo paciente. Imagen de (Fang et al. 2016)

POU1F1

POU1F1 (OMIM: *173110), previamente conocido como PIT1, es un factor de transcripción específico de la hipófisis, responsable del desarrollo hipofisario y la producción de hormonas en mamíferos. Su estructura genómica comprende seis exones localizados en la región cromosómica 3p11.2, que codifican para una proteína de 291 aminoácidos.

Es un miembro de la familia de factores de transcripción POU, llamada así por los primeros 3 factores identificados: PIT1 y OCT1 en mamíferos y Unc-86 en *C. elegans* (Herr et al. 1988). POU1F1 contiene 2 dominios proteicos, llamados POU-específico y POU-homeo (dominio), ambos necesarios para su unión de alta afinidad al ADN. Se une a los genes que

codifican para la hormona de crecimiento, prolactina y las dos subunidades de la hormona estimulante de la tiroides.

En ratones, *Pou1f1* se expresa luego del pico de expresión de *Prop1* al E14.5 y se mantiene su expresión en la adultez. Los ratones enanos Snell son un modelo bien caracterizado de restricción de crecimiento y mayor longevidad (*Pou1f1^{dw/dw}*), portando la mutación p.Trp261Cys en el homeodominio (Li et al. 1990). Estos ratones son indistinguibles de sus hermanos heterocigotas al nacimiento, pero los adultos homocigotas son aproximadamente un tercio del tamaño normal, y poseen una función hipofisaria disminuida, con niveles indetectables en suero de GH, PRL y TSH.

El primer caso de una variante recesiva en humanos con pérdida de función en POU1F1 fue descrita en un niño con CPHD nacido de padres consanguíneos (Tatsumi et al. 1992). Desde entonces se han identificado múltiples variantes tanto homocigotas como heterocigotas en *POU1F1* en pacientes tanto con CPHD (generalmente involucrando GH, PRL y TSH) como en IGHD (Fig. 3) (Radovick et al. 1992) (Sobrier et al. 2015) (Turton et al. 2005).

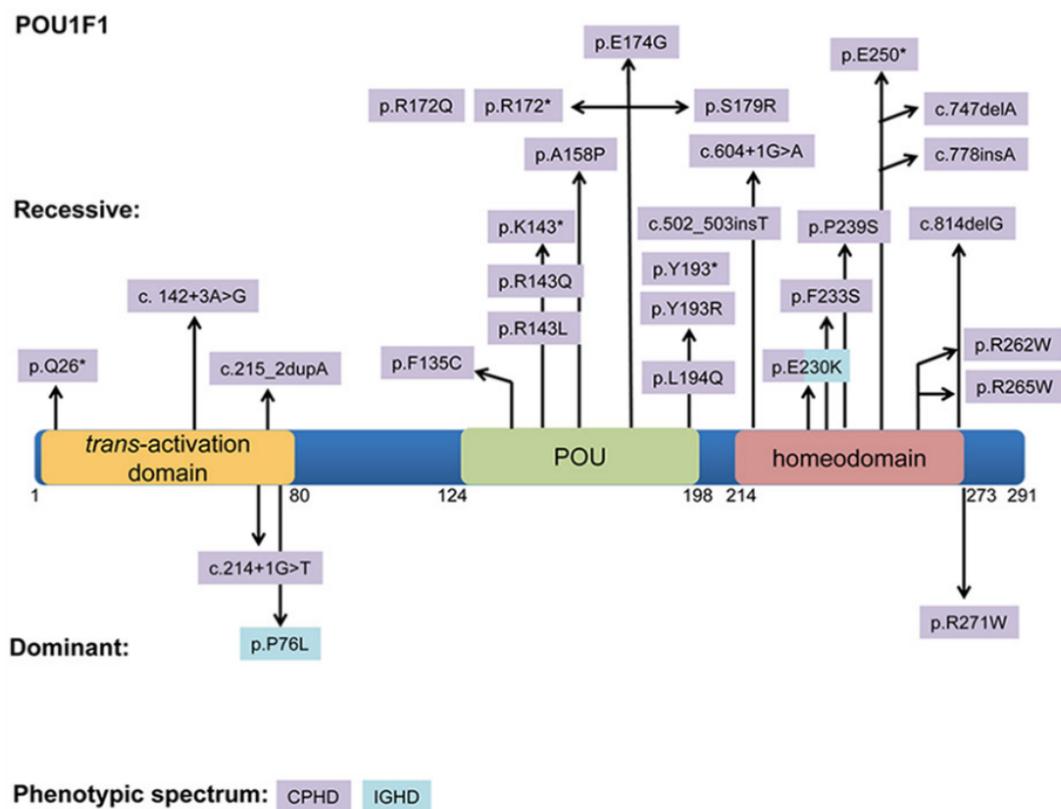


Figura 3: Mutaciones previamente reportadas en el gen POU1F1 y su posición relativa en la estructura proteica. Imagen de (Fang et al. 2016)

POU1F1 posee un programa de splicing alternativo conservado evolutivamente (Schanke et al. 1997) (Wallis 2018), resultando en una isoforma predominante, alfa, que actúa como un activador transcripcional, y una isoforma beta que actúa como represor. En la hipófisis del humano, la isoforma beta corresponde a aproximadamente entre 1 y 3% de los transcritos totales de *POU1F1* (Carithers et al. 2015) (Wallis 2018). Esta isoforma beta se genera al

utilizar un sitio aceptor de splicing alternativo para el exón 2, localizado a 78 pb río arriba del aceptor para la isoforma alfa, resultando en una incorporación de 26 aminoácidos adicionales que codifica para un sitio de interacción para el factor de transcripción ETS1 (MIM: 164720). Esta inserción trunca el dominio de transactivación de POU1F1 en el aminoácido 48. Las dos isoformas poseen actividades diferentes dependiendo del contexto del gen, por ejemplo, la isoforma alfa activa su propia expresión, no así la isoforma beta, y la beta interfiere con la autoactivación de la isoforma alfa (Kozak and Moore 1992) (Jonsen et al. 2009). Aunque este splicing alternativo se mantiene conservado evolutivamente, se desconoce actualmente la significancia funcional de la isoforma beta.

LHX3

El gen *LHX3* (OMIM: *600577) codifica para un factor de transcripción temprano en el desarrollo de la hipófisis. *LHX3* es un factor de transcripción miembro de la familia de proteínas homeodominio *Lin11*, *Isl-1* y *Mec-3* (LIM). Se expresa en la bolsa de Rathke y el tubo neural y es importante tanto para el desarrollo de la hipófisis como para la organización de la neuronas de la médula espinal (Bach et al. 1995) (Tsuchida et al. 1994). Se localiza en el cromosoma 9q34.3 y posee 6 exones, con dos inicios alternativos de transcripción, dando lugar a dos isoformas, *LHX3a* y *LHX3b*, con diferentes extremos amino-terminal, pero idénticas en sus dominios LIM y homeodominio. Ambas isoformas se localizan en el núcleo y son expresadas en la hipófisis del embrión y del adulto, pero parecen tener diferencias funcionales, ya que difieren en su habilidad de trans-activar distintos genes hipofisarios (Sloop et al. 1999).

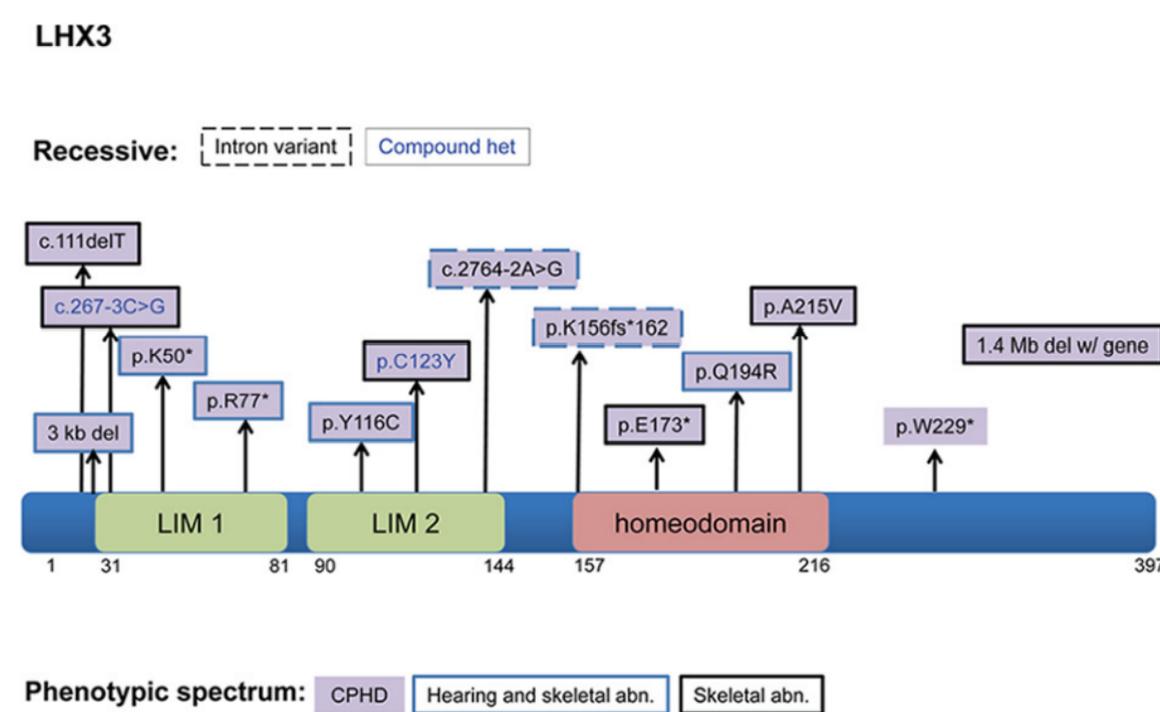


Figura 4: Mutaciones previamente reportadas en el gen *LHX3* y su posición relativa en la estructura proteica. Imagen de (Fang et al. 2016)

Mutaciones en *LHX3* suelen causar CPHD con un patrón de herencia autosómico recesivo, con variantes homocigotas o en heterocigosis compuesta (Fig. 4) (Bechtold-Dalla Pozza et

al. 2012) (Bhangoo et al. 2006) (Kriström et al. 2009). Las hormonas más comunmente afectadas son GH y TSH, y en orden descendente también pueden verse afectadas la producción de PRL, LH/FSH y ACTH. El síntoma acompañante más común es la rotación limitada del cuello (Bonfig et al. 2011). En ratones, Lhx3 y Lhx4 se expresan en las neuronas motoras ventrales, por lo que el movimiento limitado del cuello puede deberse a una inervación anormal de los músculos anteriores del cuello. Otras manifestaciones clínicas que pueden aparecer son hiperplasticidad de la hipófisis anterior, disminución de la audición, dificultades respiratorias y anomalías esqueléticas. Existen casos reportados de CPHD con variantes en LHX3 heterocigotas, p.T63M y p.A322T (Dateki et al. 2010), pero distintos predictores las clasifican como benignas y, en particular p.A322T se encuentra en bases de datos poblaciones de sujetos control, por lo que su patogenicidad no está del todo probada.

LHX4

El gen *LHX4* (OMIM: *602146) se encuentra en 1q25.2, conteniendo 6 exones en total que codifican para otro factor de transcripción homeodominio de la familia LIM, y posee cierta función redundante con LHX3. Sin embargo, a diferencia del factor de transcripción anterior, mutaciones en *LHX4* comunmente resultan en CPHD con un patrón de herencia autosómico dominante y de penetrancia incompleta (Fig. 5) (Castinetti et al. 2008) (Machinis et al. 2001) (Pfaeffle et al. 2008) (Takagi et al. 2012).

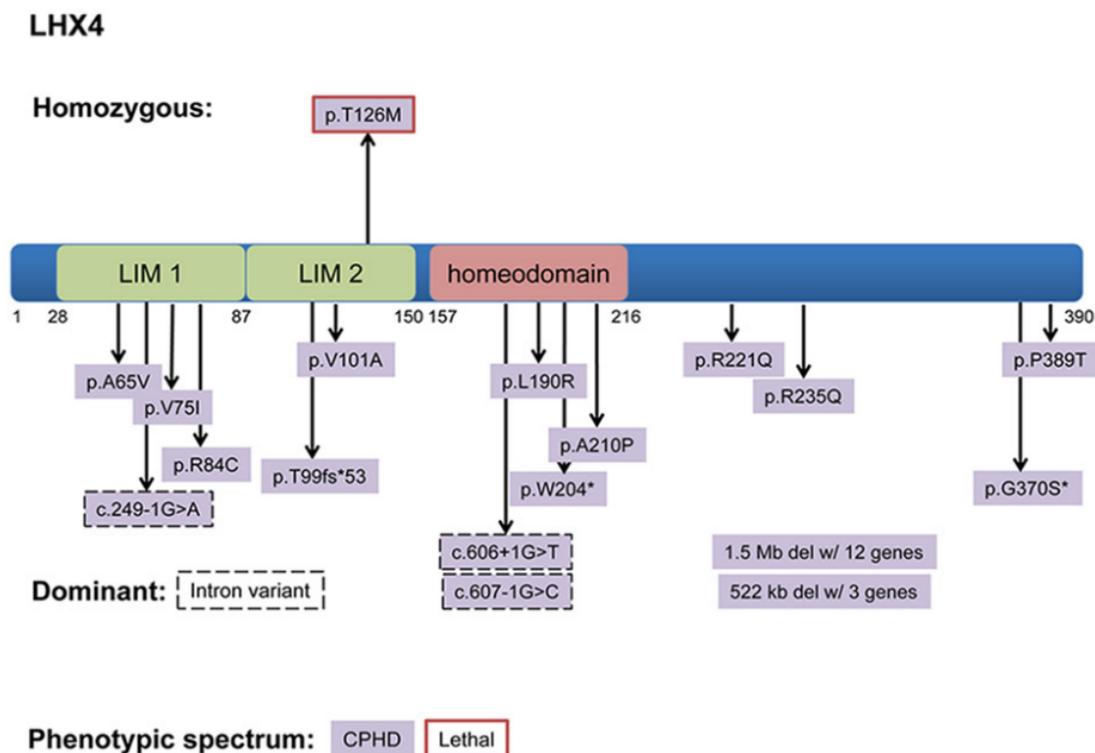


Figura 5: Mutaciones previamente reportadas en el gen LHX4 y su posición relativa en la estructura proteica. Imagen de (Fang et al. 2016)

Actualmente sólo hay una variante homocigota para LHX4 documentada (p.T126M), asociada a un fenotipo letal (Gregory et al. 2015). Las variantes heterocigotas de LHX4

generalmente producen alelos con pérdida de función (Loss of function; LOF) y los pacientes portadores de estas variantes presentan CPHD, baja estatura, silla turca pequeña, defector cerebelares, hipófisis anterior hipoplásica, enfermedades respiratorias, malformaciones genitales, algunas características craneofaciales e hipotiroidismo (Filges et al. 2012) (Rochette et al. 2015) (Tajima et al. 2007).

Existen algunos reportes con deleciones *de novo* en LHX4 con fenotipos similares a mutaciones missense en LHX4, dando a entender que el mecanismo más probable de patogenicidad es la haploinsuficiencia (Dateki et al. 2010) (Filges et al. 2012). Existe un caso con una duplicación de 7.5Mb conteniendo al gen LHX4 asociado a estatura alta, deficiencias cognitivas y dismorfias craneofaciales (Kehrer et al. 2015), abriendo la puerta a que una sobreexpresión de LHX4 también podría ser problemática, pero son necesarios más estudios para establecer la relación fehacientemente.

GLI2

El gen *GLI2* (OMIM: *165220), ubicado en 2q14.2, codifica para un factor de transcripción de vertebrados involucrado con la señalización de vía de SHH (OMIM: *600275) (Roessler et al. 2003), junto a los otros miembros de la familia GLI1 y GLI3. Originalmente fue descubierto debido a su acción como oncogen en gliomas de cerebro, de ahí el nombre de la familia GLI. La secuenciación del cDNA (ADN copia/complementario) de GLI demostró la presencia de 5 dedos de zinc conectados por uniones histidina-cisteína, indicando que el gen pertenece a la familia de factores de transcripción con dedos de zinc relacionados a Kruppel (Kr), un gen descrito en *Drosophila* (Ruppert et al. 1988).

La secuencia completa de GLI2 se extiende a 1586 aminoácidos, codificados por 14 exones, con un dominio represor de la transcripción amino-terminal (Roessler et al. 2005), y un dominio de transactivación carboxi-terminal. Tanto GLI2 como GLI3 poseen dominios de activación y de represión, pudiendo tener ambas funciones, mientras que GLI1 carece del dominio represor y funciona principalmente como activador de la transcripción. Sasaki et al. demostraron que al deleccionar el dominio amino-terminal, GLI2 se convierte en un activador fuerte, similar a GLI1, mientras que si se deleccionan distintos fragmentos del dominio carboxi-terminal, se vuelve un represor fuerte (Fig. 6). En particular, es relevante notar que los autores demostraron que los últimos 100 aminoácidos de la secuencia son esenciales en GLI2 para tener su capacidad activadora de la transcripción. Este concepto es importante destacar ya que en la presente tesis proponemos evaluar funcionalmente alteraciones en el ADN correspondientes a este fragmento del gen, donde varias mutaciones han sido reportadas en pacientes, como veremos más adelante.

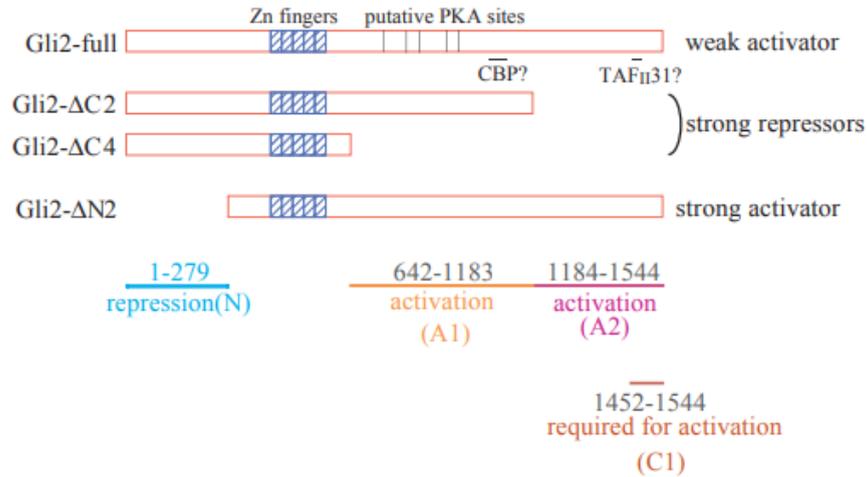


Figura 6: Dominios funcionales de GLI2. Gli2-full: secuencia completa de Gli2. Gli2-ΔC2: secuencia de GLI2 sin dominio de transactivación A2 carboxiterminal. Gli2-ΔC4: secuencia de Gli2 sin dominios de activación A1 y A2 carboxiterminal. Gli2-ΔN2: secuencia de Gli2 sin dominio represor amino-terminal. Imagen de (Sasaki et al. 1999)

La señalización por Hedgehog (Hh) se encuentra evolutivamente conservada y provee las señales necesarias para promover la morfogénesis durante el desarrollo embrionario y contribuye a la homeostasis tisular y reparación de heridas en la infancia y adultez. Consiguientemente, desordenes en esta vía de señalización puede ocasionar anomalías del desarrollo y distintos tipos de cáncer (Ingham and McMahon 2001).

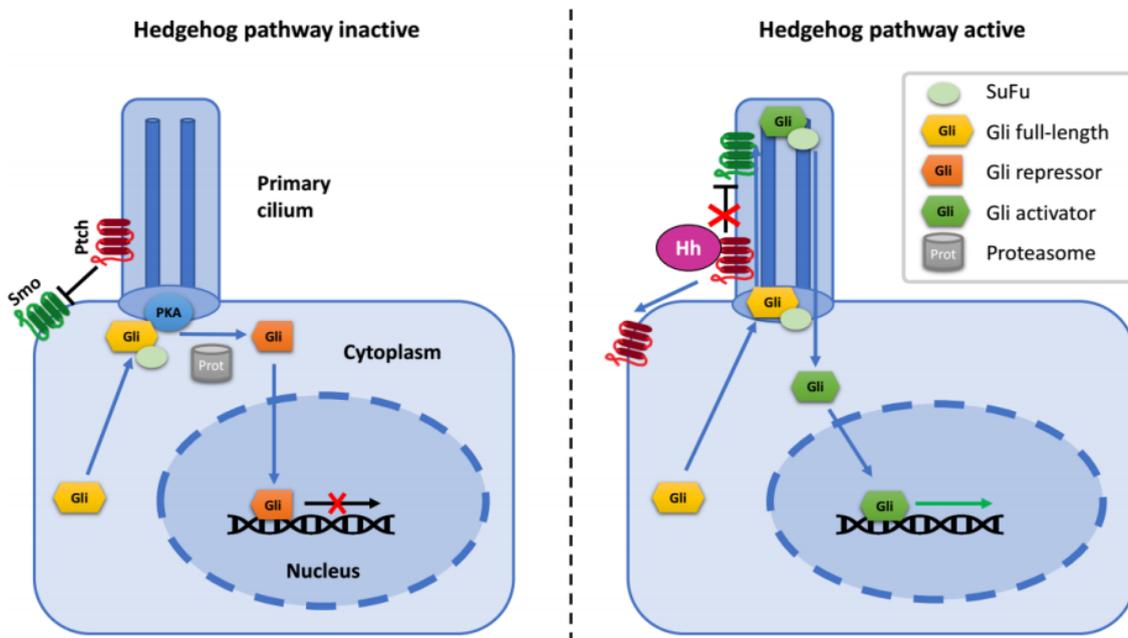


Figura 7: Esquema de la vía de señalización por hedgehog (Hh). Imagen de (Niewiadomski et al. 2014)

Dos proteínas de transmembrana son cruciales para la transmisión intracelular de la señal de SHH: La proteína supresora de tumores Patched (PTCH1) y *receptor-like* acoplado a

proteína G de siete pasos de transmembrana Smoothened (SMO) (Fig. 7). Cuando la vía de señalización se encuentra apagada, es decir, en ausencia de SHH, la actividad de SMO es inhibida por PTCH1 (Regl et al. 2004) (Tripathi et al. 2014) (Fig. 7 izquierda). Bajo estas condiciones, GLI2 y GLI3 son truncadas parcialmente en el extremo C-terminal por el proteasoma (Pan and Wang 2007), eliminando así su dominio de transactivación transcripcional y confiriéndoles una función de represores de los genes blanco de Hh (Niewiadomski et al. 2019). Además de la formación de isoformas represoras de Gli, también se mantienen proteínas Gli de longitud completa inactivas mediante su interacción con el supresor tumoral SuFu (Supresor de Fused), que restringe la localización de las proteínas Gli al citoplasma, y promueve su asociación con co-represores transcripcionales (Svärd et al. 2006).

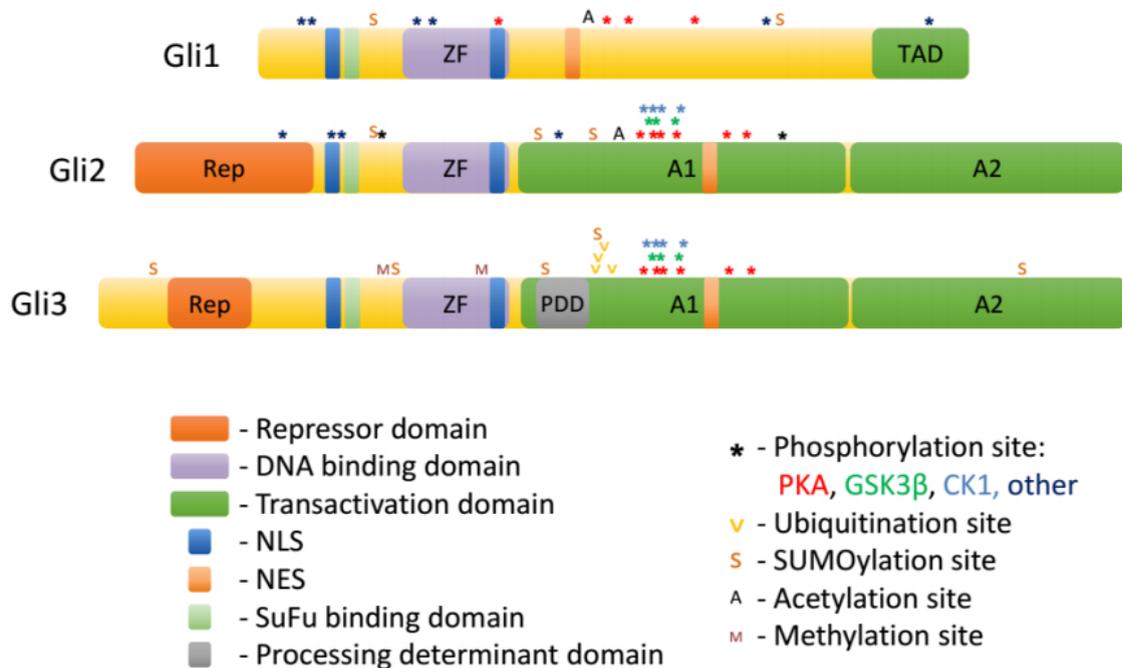


Figura 8: Dominios y modificaciones post-traduccionales de las proteínas Gli. Imagen de (Niewiadomski et al. 2014)

En células de mamíferos, la mayor parte de los componentes de la vía de señalización de Hh están situados cerca o en proximidad al cilio primario, una pequeña organela conformada por microtúbulos que funciona como antena celular para algunas vías de señalización específicas y es totalmente esencial en la señalización mediada por Hh (Goetz and Anderson 2010) (Huangfu et al. 2003). Tanto PTCH1 como SMO se concentran en la membrana del cilio primario. Frente a la unión con su ligando SHH, PATCH1 es excluido del cilio, mientras que SMO se concentra en la región (Fig. 7 derecha). La acumulación de SMO en la membrana ciliar activa la entrada de SuFu y las proteínas GLI al cilio (Corbit et al. 2005). La localización ciliar de GLI2 es requerida para su activación y posterior translocación al núcleo para realizar su función como factor activador de la transcripción de sus genes blanco (Santos and Reiter 2014). Al encontrarse GLI2 en su forma activa (GliA), promueve la expresión de GLI1, funcionando como un potenciador de la señal de SHH, y de PTCH1, controlando la señalización de SHH por un feedback negativo. GLI1 y GLI2 se unen a las mismas secuencias promotoras de ADN y activando los mismos genes. Ambas

proteínas interactúan entre sí por sus dominios de dedos de zinc y pueden actuar en conjunto en la activación de sus genes blanco (Tolosa et al. 2020).

Las proteínas GLI son extensamente modificadas postraduccionalmente, y estas modificaciones afectan tanto su tráfico celular como el resultado transcripcional de su vía de señalización. Además del truncamiento por el proteasoma previamente mencionado, las proteínas GLI son fosforiladas, ubiquitinadas, acetiladas, sumoiladas y metiladas. La Fig. 8 resume los sitios de modificaciones post-traduccionales que sufren estas proteínas.

La fosforilación es una de las modificaciones de GLI más estudiadas, especialmente la fosforilación por la proteína kinasa A (PKA). La misma tiene principalmente un efecto inhibitorio en la regulación de la señal de GLI en ausencia de SHH (Niewiadomski et al. 2014). Esta fosforilación mediada por PKA propicia luego que las proteínas GLI sean nuevamente fosforiladas en otros sitios por la casein kinasa 1 (CK1) y la Glucógeno Sintasa Kinasa 3- β (GSK3- β) (Tempé et al. 2006). Esta fosforilación múltiple es suficiente para inducir la ubiquitinación mediada por Cul1/ β -TrCP y la posterior formación de la forma represora de GliR por proteólisis parcial de GLI2 y GLI3. Cuando la vía de señalización es activada, el equilibrio se mueve hacia la desfosforilación de las proteínas GLI.

Además, se identificó que GLI2 es sumoilada en los residuos de lisina K630 y K716. La sumoilación de GLI2 se ve reducida frente a la activación de la vía de SHH, o en mutantes de los sitios de fosforilación para PKA constitutivamente activas, sugiriendo que regula negativamente la actividad de GLI (Han et al. 2012). Tanto GLI1 como GLI2 son acetiladas por acetil transferasas de histonas, y su acetilación y desacetilación constituye un importante alternador funcional de su actividad. GLI1 y GLI2 son acetiladas por p300/CBP en los residuos conservados K518 y K757 respectivamente (Canettieri et al. 2010). La acetilación en GLI1 y GLI2 disminuye su actividad activadora de la transcripción. La mutación p.K575Q, que simularía una acetilación constitutiva en la proteína, disminuye la capacidad de GLI2 de unirse al promotor de PTCH1, uno de sus blancos (Coni et al. 2013). **En este trabajo hemos evaluado una variante en GLI2 que podría afectar la acetilación de la proteína.**

Relacionado al desarrollo de la hipófisis durante la embriogénesis humana, GLI2 se expresa en la bolsa de Rathke entre los estadios de Carnegie 13 y 15 (Gregory et al. 2014). En embriones, la expresión aberrante de la señalización de SHH resulta en desórdenes del desarrollo como holoprosencefalia, síndrome de Greig, Síndrome de Ellis van Creveld, Síndrome de Pallister-Hall, neuropatía periférica, osteoartritis, neoplasia cartilaginosa y enfermedades neurodegenerativas (Alman 2015) (Dellovade et al. 2006) (Ming et al. 1998). En el adulto, la vía de señalización de Hh participa en la regulación de la producción de GH mediante efectos paracrinos de las células foliculoestelares (Botermann et al. 2021).

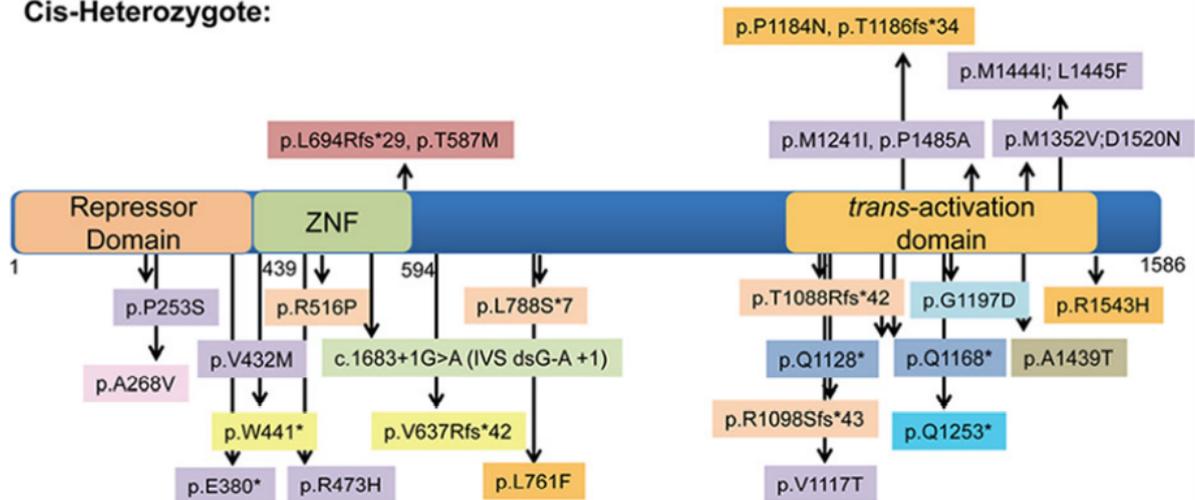
Ratones con deleciones homocigotas del dominio de dedos de zinc de GLI2 poseen letalidad perinatal, defectos esqueléticos severos y anomalías del cartílago, incluido paladar hendido, ausencia en los dientes incisivos, mandíbulas cortas, osificación tardía de los huesos craneales y miembros cortos con baja osificación de los huesos largos (Mo et al. 1997).

Numerosas mutaciones heterocigotas en GLI2 han sido reportadas como pérdida de función en pacientes con CPHD y otras malformaciones craneofaciales. Las variantes en GLI2 son

comúnmente asociadas a holoprosencefalia, paladar hendido, CPHD y polidactilia (Fig. 9). Aproximadamente un tercio de los pacientes con variantes patogénicas en GLI2 presentan CPHD. La mayoría de estos pacientes con CPHD son no sindrómicos, en el sentido que no presentan manifestaciones clínicas de malformaciones craneofaciales o polidactilia. En muchos casos, la variante patogénica está asociada con un fenotipo variable y penetrancia incompleta en la familia. En ratones, se observa que tanto distintos background genéticos, como exposición a teratógenos ambientales, pueden influir tanto en la aparición como en la variación de la severidad de holoprosencefalia frente a haploinsuficiencia de Gli2 (Heyne et al. 2016).

GLI2

Cis-Heterozygote:



Heterozygote:

Phenotypic spectrum:



Figura 9: Mutaciones previamente reportadas en el gen GLI2 y su posición relativa en la estructura proteica. Imagen de (Fang et al. 2016)

Los primeros ensayos funcionales reportados sobre variantes de GLI2 fueron realizados por Roessler et al. 2003, en los que utilizaron embriones de pez cebra inyectados con ARNm (ARN mensajero) exógeno de GLI2. La versión WT y polimórficas de GLI2 generaban tumores epidérmicos en los embriones, mientras que las versiones de GLI2 con mutaciones truncantes de la secuencia de la proteína (ganancia de codón stop, y corrimiento de marco de lectura), no afectaban a los embriones. Flemming et al. 2013 realizaron ensayos de luciferasa como gen reportero en el cual determinaron que la variante p.R516P encontrada en una paciente con IGHD y polidactilia presenta pérdida de función y que dos alelos con modificaciones en dos codones p.[M1352V; D1520N] y p.[M1444I; L1445F], comúnmente presentes en la población control, son levemente hipomórficos. Valenza et al. 2019, identificaron la variante de corrimiento de marco de lectura p.P1167LfsX52 en una familia

con hipopituitarismo, malformaciones faciales y polidactilia, que no es capaz de activar la transcripción tanto de un reportero de luciferasa como de los genes endógenos GLI1 y PATCH1. Tres variantes que provocan el truncamiento de la proteína (p.E380X, p.L694fsX722, p.L788fsX794) con pérdida del dominio de transactivación fueron reportadas en heterocigosis en pacientes con CPHD sin holoprosencefalia, de las cuales no se realizaron ensayos funcionales (França et al. 2010). En Argentina previamente se reportaron dos variantes en el dominio represor de GLI2 p.Arg231Gln y p.Arg226Leu ambas en pacientes con CPHD y malformaciones craneofaciales, también sin ensayos funcionales (Juanes et al. 2016). De esta forma, en líneas generales se puede establecer que las variantes de ganancia de codón stop y corrimiento de marco de lectura son usualmente patogénicas, aún con penetrancia incompleta en algunos casos. Sin embargo, las variantes de cambio de codón de aminoácido no son tan fácilmente catalogables.

Actualmente, de 208 variantes en GLI2 de nucleótido único (SNV) reportadas presentes en ClinVar [acceso: Abril 2022] tres cuartos de estas variantes (151) poseen significado incierto (VUS), es decir, no resulta claro su nivel de patogenicidad. De acá se desprende la necesidad de contar con ensayos funcionales robustos, que nos permitan obtener información concreta sobre el efecto de cada variante en la función final proteica.

En este trabajo de tesis doctoral, proponemos combinar el desarrollo de un nuevo panel de secuenciación, su aplicación a casos reales y su posterior análisis bioinformático (Capítulo 1) con la evaluación funcional de variantes VUS en distintos genes, tanto para mutaciones puntuales (Capítulo 2) como para casos masivos (Capítulo 3). A continuación, se describen la hipótesis y los objetivos del trabajo.

Hipótesis y objetivos

En esta tesis nos centraremos en estudiar las razones genéticas de la deficiencia de hormonas hipofisarias en pacientes pediátricos argentinos. Dada la relevancia de los genes mencionados, y la conocida asociación de mutaciones en los mismos con las diferentes modalidades de hipopituitarismo congénito (HC), buscaremos tanto nuevas variantes como variantes ya reportadas en estos genes usando tecnologías de secuenciación masiva en paralelo. Nuestra **hipótesis** es que **mutaciones en genes** asociados al desarrollo de la hipófisis anterior **explican el fenotipo observado de pacientes con HC**.

Proponemos evaluar, mediante ensayos funcionales que nos permitan dilucidar efectos moleculares en las proteínas o transcritos de los genes mutados, las variantes nóveles o de significado incierto que puedan llegar a aparecer en el estudio molecular del ADN genómico. Además, incursionaremos en el estudio masivo de efectos alélicos: ensayos funcionales de numerosas variantes para un mismo gen realizadas en paralelo, que nos permiten obtener un catálogo de efectos sobre un gen de todas las variantes posibles por sustitución de nucleótidos/aminoácidos.

De esta forma establecemos tres objetivos principales:

Objetivo específico 1: a. Diseñar y validar un panel de genes por single molecule Molecular Inversion Probes para determinar variantes relacionadas a la deficiencia de hormonas hipofisarias congénita.

b. Aplicar el panel de genes para la secuenciación de pacientes pediátricos argentinos con HC.

Objetivo específico 2: Realizar ensayos funcionales de variantes VUS individuales en los genes GLI2, LHX3, LHX4 y PNPLA6 encontradas en 1) para determinar patogenicidad respecto a la enfermedad.

Objetivo específico 3: Diseñar un enfoque para el análisis masivo de variantes en los genes POU1F1 y GLI2 mediante la técnica de MAVEs (Multiple Assesmente of Variant Effects).

Dado lo expuesto, se decidió dividir la presente tesis en tres capítulos. Cada uno presentará, en caso de ser necesario, una introducción a las técnicas a utilizar particulares de cada capítulo, una descripción de los materiales y métodos y los resultados obtenidos. Finalizamos con una discusión que engloba el trabajo completo, evaluando el logro de los objetivos, hallazgos y complicaciones del trabajo, y a su vez, planteando futuras líneas de trabajo que se desprenden de los resultados de esta tesis de doctorado.

Capítulo 1

Diseño de MIPS y secuenciación de pacientes con Hipopituitarismo Congenito

1A - Introducción

Secuenciación de Próxima Generación (NGS) ó Secuenciación Paralela Masiva (MPS)

Como ya se mencionó, es importante identificar las variantes patogénicas en casos de IGHD y CPDH para poder entender la variabilidad y la progresión de la enfermedad, y a su vez, para utilizar el conocimiento de las mismas para el desarrollo de nuevos tratamientos. Hasta hace pocos años, el testeo para enfermedades genéticas se realizaba gen por gen, empezando por los genes candidatos más comunes asociados a la patología. Con la incorporación de la secuenciación de próxima generación (NGS del inglés Next Generation Sequencing) es ahora posible escanear un gran número de genes en múltiples individuos en un sólo ensayo, reduciendo esfuerzo, costos y tiempo, y brindando un mayor acceso al diagnóstico molecular para pacientes y familias con defectos congénitos como el HC ([Castinetti et al. 2014](#)).

Las NGS adaptan la inventiva de la secuenciación de Sanger incorporando en el proceso la creación de una biblioteca de fragmentos de ADN, todos procesados de modo de tener un tamaño específico y que en sus extremos se encuentren presentes adaptadores para la secuenciación ([Goodwin et al. 2016](#)). Estos adaptadores brindan una base en común para todos los fragmentos, de modo que un mismo *primer* pueda hibridar independientemente de la secuencia a determinar, y donde se pueda unir la ADN polimerasa. A su vez, la utilización de tecnología de microfluídica, permite trabajar en un menor volumen y con la consecuente menor cantidad de reactivos, que luego es combinada con un dispositivo de detección de alta precisión. Técnicamente, los fragmentos de ADN se unen covalentemente a un soporte (celda de flujo), permitiendo identificar la secuencia de cada uno de manera individual y en forma paralela. Hoy en día ya existen múltiples tecnologías de secuenciación con diversas estrategias y avances tecnológicos (Illumina, Ion Torrent, PacBio, Oxford Nanopore) con la característica común de brindar toda una secuenciación masiva, o sea, permitiendo secuenciar en un sólo experimento millones de fragmentos ([Goodwin et al. 2016](#)). En este contexto, actualmente se las suele agrupar en una nueva denominación “Secuenciación Paralela Masiva” (MPS por Massive Parallel Sequencing) en detrimento del uso del término NGS ([Tucker et al. 2009](#)). Sin embargo, debido a que trabajaremos con otra sigla similar (MIPS) más adelante, por cuestiones prácticas, en el resto de la presente tesis usaremos NGS para referirnos a las tecnologías de secuenciación masiva.

El avance de las tecnologías NGS permitió en muy poco tiempo disminuir enormemente los costos de secuenciación. En la Fig. 10 se puede observar un quiebre importante a fines del 2007, cuando la introducción de estas tecnologías en el mercado cambiaron el paradigma tecnológico. Si lo miramos, por ejemplo, utilizando como parámetro el costo de secuenciar un genoma humano, los datos muestran que desde la secuenciación del primer genoma en el 2001 hasta hoy en día, el costo de secuenciación bajo hasta 5 órdenes de magnitud.

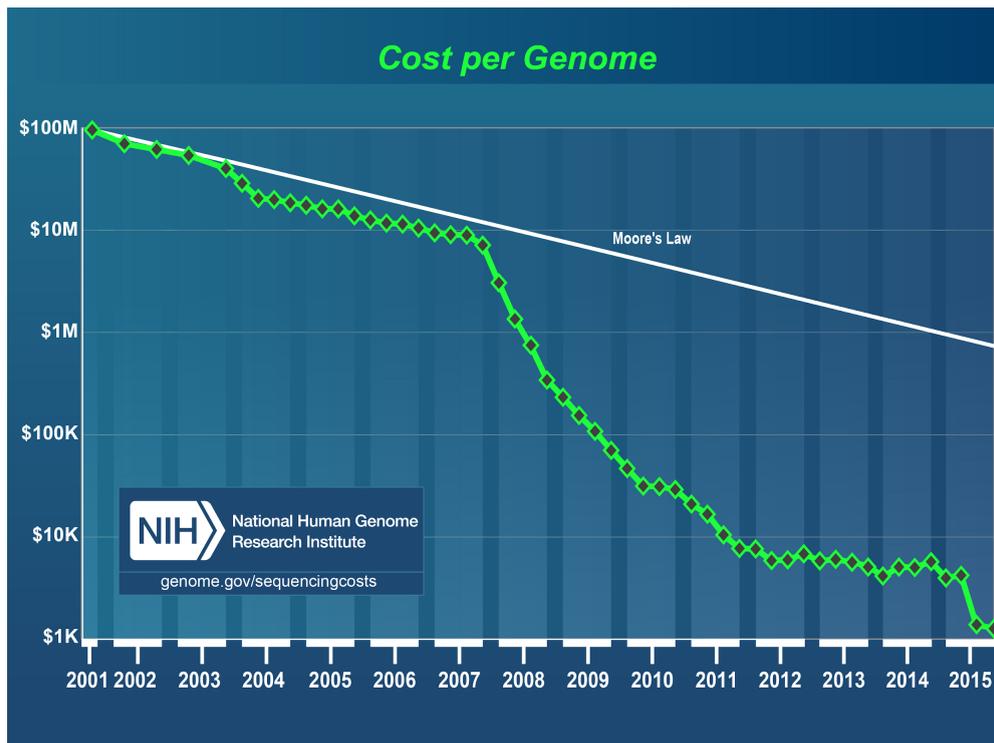


Figura 10: Costos de secuenciación de “un” genoma humano entero en dólares en función del tiempo. Imagen del National Human Genome Research Institute: genome.gov/sequencingcosts

En este trabajo de tesis utilizaremos 3 estrategias de secuenciación, todas ellas basadas en tecnología NGS:

1. Secuenciación de Genoma Completo (WGS del inglés Whole Genome Sequencing): el genoma completo del paciente es fragmentado y secuenciado de manera completa, permitiendo analizar variantes genéticas en regiones tanto exónicas como intrónicas e intergénicas. Se pueden reconocer SNVs, variantes en el número de copias (CNVs) y variantes estructurales (SV) (Hamzeh et al. 2021) (Ho et al. 2019).
2. Secuenciación de Exoma Completo (WES - Whole Exome Sequencing): El ADN genómico es fragmentado mecánicamente y se utilizan sondas complementarias a las regiones exónicas de todos los genes codificantes unidas a un soporte sólido, para hibridar y enriquecer la muestra en fragmentos de ADN derivados exclusivamente de los exones (y sus regiones flanqueantes). Esta muestra enriquecida luego es secuenciada por NGS. Se pueden identificar principalmente SNVs en regiones codificantes, y algunos CNVs (Bamshad et al. 2011) (Meyts et al. 2016).
3. Captura de exones específicos mediante un panel de genes: esta estrategia es similar al punto anterior. Se utilizan sondas que capturan regiones específicas del ADN genómico, pero reduciendo la cantidad total de exones y por ende genes a analizar. Son más fáciles de analizar que WGS o WES debido al tamaño reducido, permitiendo detectar principalmente SNVs (Xue et al. 2015).

Molecular Inversion Probe Sequencing (MIPS)

Si bien la tendencia mundial apunta a obtener genomas completos de todos los pacientes con afecciones genéticas (Prokop et al. 2018), la secuenciación WGS muchas veces resulta impráctica en la clínica, y más aún en el contexto local. Los precios resultan elevados, aún para analizar una sólo muestra, por lo que escalar un estudio a una cohorte de pacientes se vuelve prohibitivo; la cantidad de información recolectada es también enorme, volviéndose necesario mayor espacio de almacenamiento de datos, mayor capacidad de cómputo para el procesamiento de los datos y, mayor tiempo de análisis hasta la obtención de resultados (Gonzalez-Calderon et al. 2020).

Es por esto que muchas veces se opta por disminuir la cantidad de los datos a analizar y realizar una captura de regiones de interés, esto es, enriquecer la muestra en regiones de ADN pertinentes al análisis, usualmente, regiones exónicas, que poseen interpretación directa sobre el efecto en las proteínas codificadas. Tanto la secuenciación WES como la utilización de paneles (donde se secuencia usualmente los exones un grupo de genes) es útil, siendo la segunda preferible cuando la patología tiene un número de genes acotado como la principal causa de la misma. En este trabajo de tesis utilizamos, para el diseño experimental de un panel, la estrategia de secuenciación por *Molecular Inversion Probes* (MIPS) para la captura de las regiones del genoma a secuenciar y analizar por NGS (Turner et al. 2009) (Hardenbol et al. 2003).

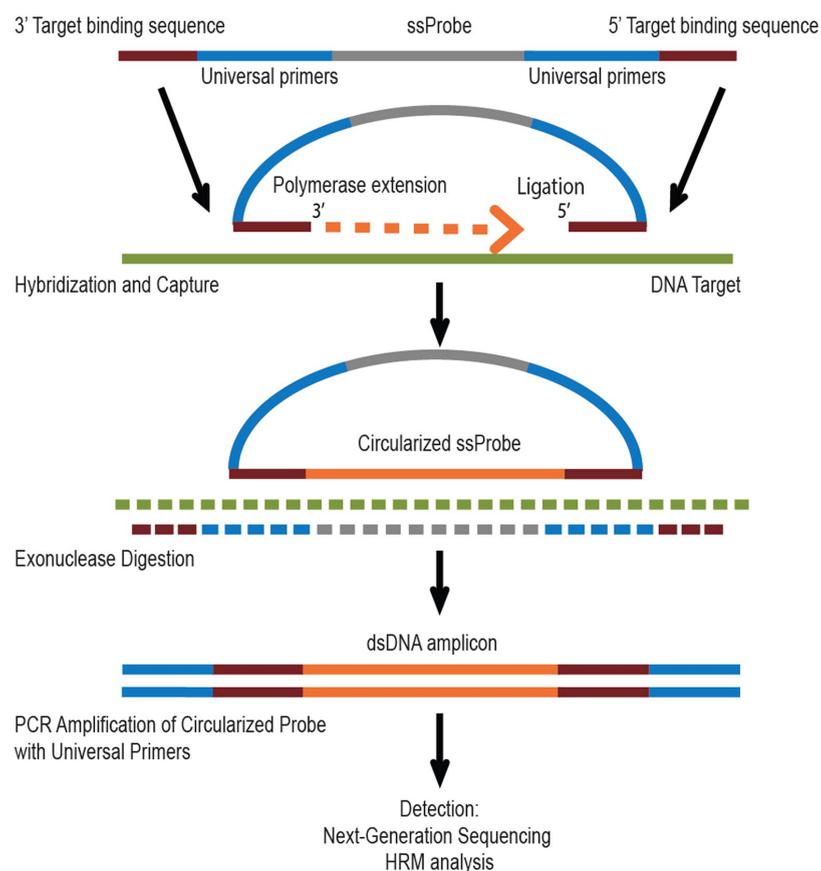


Figura 11: Single molecule Molecular Inversion probes. Esquema de la estrategia de captura de ADN genómico por sondas smMIPs. Imagen de (Stefan et al. 2016)

Las sondas MIPS, están conformadas por ADN lineal simple cadena de aproximadamente 150 nucleótidos. En los extremos de la sonda se encuentran dos secuencias de 20-25 nucleótidos complementarias al ADN genómico (Fig. 11 panel superior). Se diseñan estas sondas de modo que, al hibridar con el genoma, la sonda se invierte, formando un puente, y quedando ambos extremos sobre la misma hebra y enfrentados.

El espacio entre ambos extremos luego es sintetizado por una ADN polimerasa utilizando el extremo 3' libre, y se circulariza la sonda luego por una ligasa, uniendo el ADN sintetizado con el extremo opuesto. De esta forma se completa la captura de las regiones de interés. Posteriormente, tanto el ADN genómico, como las sondas no circularizadas (que mantienen su estructura lineal) son digeridas por exonucleasas (Fig. 11 medio). El ADN capturado se ve protegido de esta degradación al no poseer extremos libres, y luego se amplifica con *primers* universales que agregan los adaptadores para el equipo de secuenciación deseado e índices para la identificación de la muestra (Fig. 11 panel inferior).

Este enfoque utiliza además identificadores de molécula única, que permiten detectar y marcar lecturas de secuenciación derivadas “todas ellas” de una molécula progenitora original en común (la que esta en la muestra), lo que coloquialmente se denomina “duplicado”. Cerca de los extremos de extensión y ligación se encuentra una serie de nucleótidos degenerados, que servirán como identificador de la molécula/sonda individual de la que provino el ADN secuenciado. Esta información luego se usa para guiar a la identificación de variantes génicas en la muestra, molécula por molécula. Por este “etiquetado” de molécula única, también se denomina a este tipo de sondas “single-molecule Molecular Inversion Probes” (smMIPs) (Hiatt et al. 2013).

Este método de captura permite entonces secuenciar de forma masiva y paralela ADN blanco de los individuos a analizar con las siguientes características (Hiatt et al. 2013):

1. Mínimas tasas de error debido a la identificación de moléculas únicas.
2. Captura de múltiples regiones genómicas de interés en un único tubo de reacción.
3. Capacidad de amplificar las sondas originales sintetizadas para múltiples experimentos.
4. Protocolo simple y escalable.
5. Diseño de paneles modular, pudiendo sumar sondas para nuevas regiones en caso de desearse.
6. Efectivo en costos para estudiar múltiples muestras.

Por todo lo expuesto, decidimos desarrollar un panel basado en smMIPs para poder testear ADN genómico de una gran cohorte argentina con HC.

1B - Materiales y Métodos

Diseño de sondas single molecule Molecular Inversion Probes (smMIPs)

Con el objetivo de secuenciar pacientes pediátricos con deficiencias aisladas o combinadas de hormonas hipofisarias, se diseñó un panel de captura de genes basado en *smMIPs*. Estas sondas son oligonucleótidos lineales con regiones de complementariedad a la región de captura en ambos extremos de la secuencia, como se detalló en la introducción a este capítulo.

El diseño del esquema general de la sonda a sintetizar incluye:

- Región de complementariedad para un set de *primers* predefinido. Esto permite amplificar el set de sondas para su posterior uso.
- Un sitio de corte para una enzima de restricción de clase IIS. Estas enzimas a diferencia de las típicas enzimas de restricción -que reconocen una secuencia palindrómica y cortan dentro de esta secuencia-, poseen dos dominios separados, uno que reconoce una secuencia, y el otro que cliva al ADN a algunas bases de distancia del sitio de reconocimiento. Esto permite eliminar los sitios de amplificación de los *primers* y quedarnos con la sonda madura.
- Brazos de complementariedad con el ADN genómico. El brazo 3' se lo denomina "brazo de extensión" ya que permite el *priming* de una ADN polimerasa y extensión sobre la región a capturar, y el brazo 5' es el brazo de ligación, donde la polimerasa se frena y una ligasa une ambos extremos.
- Un identificador de molécula única, que corresponde a 8-10 nucleótidos degenerados, lo que en pasos posteriores de procesamiento permite identificar y eliminar duplicados de secuenciación.
- Regiones complementarias para adaptadores de secuenciación de Illumina, que linealizan el producto capturado y deja el fragmento de ADN listo para secuenciación en un equipo NovaSeq.

En el año 2016, mi directora Maria Inés Pérez Millán diseñó un primer panel de genes para hipopituitarismo con 67 genes distintos con una primera versión de sondas MIPs (Pérez Millán et al. 2018). Dicho panel se utilizó para secuenciar algunos de los pacientes analizados en este trabajo de tesis. Sin embargo, el diseño de este panel traía ciertas limitaciones a su uso. En primer lugar, la enzima de restricción que se usó para eliminar los brazos de amplificación de las sondas fue EarI. El sitio de corte de reconocimiento de esta enzima se encontraba en los *primers* típicos de secuenciación de Illumina, por lo que para poder utilizar este panel de MIPs, era necesario secuenciar a las muestras con *primers custom* (diseñados específicamente para resolver el problema). En caso de utilizar una celda de flujo completa para secuenciar en equipos chicos, no habría problema, pero al momento de querer escalar en equipos de mayor porte y compartir la ronda de secuenciación con otros proyectos (y así abaratar los costos), se requería realizar una mezcla de *primers* engorrosa.

Por lo tanto, como uno de los objetivos de esta tesis, planteamos el desarrollo de un nuevo panel de genes modificando el esqueleto de las MIPs, para permitir el uso de los *primers* de secuenciación estándar de Illumina (Fig. 12). Los cambios implican reemplazar la enzima de restricción por **BbsI** y utilizar los *primers* de secuenciación Nextera v2 Read1 Primer (5-TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3) y ILMN multiplexing Read2 SP (5-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3) (Illumina adapter sequences https://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/wp-content/uploads/2013/06/illumina-adapter-sequences_100000002694-00.pdf).

Con el nuevo diseño de las sondas, creamos un nuevo panel para identificación de variantes en genes relacionados a CPHD (combined pituitary hormone deficiency) expandido. A los 67 genes del primer panel, se agregaron 37 otros genes con nuevos reportes de asociación a la patología, o con posibilidad de causar un fenotipo endocrino por literatura y experimentos preliminares del laboratorio (Tabla 1). Se utilizó el *script makeamip* (<https://github.com/kitzmanlab/makeamip>) desarrollado por el laboratorio del Dr. Jacob Kitzman para el diseño de las sondas correspondientes.

Las sondas fueron sintetizadas en GenScript (<https://www.genscript.com/>) mediante su producto Precise Synthetic Oligo Pools, obteniendo 12,472 oligos en solución.

Genes en los cuales mutaciones fueron identificadas en pacientes con deficiencias de hormonas hipofisarias y enfermedades relacionadas				
GEN	Nombre	OMIM	Fenotipos	Referencias
AIP	ARYL HYDROCARBON RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN	* 605555	Predisposición a adenomas hipofisarios	(Tatsi and Stratakis 2019)
ARNT2	ARYL HYDROCARBON RECEPTOR NUCLEAR TRANSLOCATOR 2	* 606036	Síndrome de Webb-Dattani	(Di Iorgi et al. 2016)
BMP4	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 4	* 112262	Microftalmia y anomalías hipofisarias	(Lemyre et al. 1998)
DUOX2	DUAL OXIDASE 2	* 606759	Dishormogénesis tiroidea	(Cortés and Zerón 2019)
EIF2B5	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2B, SUBUNIT 5	* 603945	Ovarioleucodistrofia Amenorrea	(Fogli et al. 2003)
ELP4	ELONGATOR ACETYLTRANSFERASE COMPLEX, SUBUNIT 4	* 606985	Aniridia	(Bhatia et al. 2013)
FGF8	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8	* 600483	Hipogonadismo hipogonadotrófico con o sin anosmia	(McCabe et al. 2011)
FGFR1	FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 1	* 136350	Hipogonadismo hipogonadotrófico con o sin anosmia	(Erbaş et al. 2020)
FOXA2	FORKHEAD BOX A2	* 600288	Hipopituuitarismo e hipoinsulinismo	(Vajravelu et al. 2018) (Boda et al. 2019)
GH1	GROWTH HORMONE 1	* 139250	Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento	(Giordano 2016)
GHR	GROWTH HORMONE RECEPTOR	* 600946	Síndrome de Laron	(Amselem et al. 1989)
GHRH	GROWTH HORMONE-RELEASING HORMONE	* 139190	Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento	(Rughani et al. 2020)

GHRHR	GROWTH HORMONE-RELEASING HORMONE RECEPTOR	* 139191	Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento	(Aguiar-Oliveira et al. 1999)
GHSR	GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE RECEPTOR	* 601898	Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento	(Pantel 2006)
GLI2	GLI-KRUPPEL FAMILY MEMBER 2	* 165230	Síndrome de Culler-Jones, Holoprocensefalia	(França et al. 2010) (Roessler et al. 2003)
GNRHR	GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR	* 138850	Hipogonadismo hipogonadotrofico con o sin anosmia	(Kottler et al. 1999)
GPR161	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 161	* 612250	Síndrome de interrupción de tallo hipofisario	(Di Iorgi et al. 2016) (Karaca et al. 2015)
HESX1	HESX HOMEODOMAIN 1	* 601802	Deficiencia de Hormonas Hipofisarias Displasia Septo-Optica	(Dattani et al. 1998) (Stewart 1983)
HHIP	HEDGEHOG-INTERACTING PROTEIN	* 606178	Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias.	(Blanco et al. 2013)
HMGA2	HIGH MOBILITY GROUP AT-HOOK 2	* 600698	Síndrome de Silver-Russell	(Gorbenko Del Blanco et al. 2011)
IGSF1	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY, MEMBER 1	* 300137	Hipotiroidismo	(Sun et al. 2012)
IRS4	INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 4	* 300904	Hipotiroidismo central congénito	(Heinen et al. 2018)
KAL1	ANOSMIN 1	* 300836	Hipogonadismo hipogonadotrofico	(Li et al. 2016)
LHX3	LIM HOMEODOMAIN GENE 3	* 600577	Deficiencia de hormonas hipofisarias	(Pfaeffle et al. 2007) (Rajab et al. 2008)
LHX4	LIM HOMEODOMAIN GENE 4	* 602146	Deficiencia de hormonas hipofisarias	(TAJIMA et al. 2007) (Pfaeffle et al. 2008)
NKX2-1	NK2 HOMEODOMAIN 1	* 600635	Hipotiroidismo	(Prasad et al. 2019)
NR0B1	NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 0, GROUP B, MEMBER 1	* 300473	Hipogonadismo hipogonadotrofico	(Hay and Wu 2002)
OTX2	ORTHODENTICLE HOMEODOMAIN 2	* 600037	Deficiencia de hormonas hipofisarias, Microftalmia	(Diaczok et al. 2008)
PAX6	PAIRED BOX GENE 6	* 607108	Aniridia, Hipoplasia nervio optico	(Shimo et al. 2014)
PITX2	PAIRED-LIKE HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 2	* 601542	Deficiencia de hormona de crecimiento	(Semina et al. 1996)
POU1F1	POU DOMAIN, CLASS 1, TRANSCRIPTION FACTOR 1	* 173110	Deficiencia de hormonas hipofisarias	(Pellegrini-Bouiller et al. 1996)
PROP1	PROP PAIRED-LIKE HOMEODOMAIN 1	* 601538	Deficiencia de hormonas hipofisarias	(Böttner et al. 2004)
PROKR2	PROKINETICIN RECEPTOR 2	* 607123	Hipogonadismo hipogonadotrofico	(Cole et al. 2008)
SEMA3A	SEMAPHORIN 3A	* 603961	Hipogonadismo hipogonadotrofico	(Hanchate et al. 2012)
SLC15A4	SOLUTE CARRIER FAMILY 15 (OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER), MEMBER 4	* 615806	Deficiencia hormonas hipofisarias, riesgo	(Simm et al. 2018)
SOX2	SRY-BOX 2	* 184429	Hipoplasia nervio optico, hipogonadismo hipogonadotrofico, deficiencia hormona crecimiento	(Macchiaroli et al. 2014)

STAT5B	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5B	* 604260	Insensibilidad a hormona de crecimiento, disregulación inmune	(Bernasconi et al. 2006)
SOX3	SRY-BOX 3	* 313430	Panhipopituitarismo	(Zipf et al. 2008)
TBX19/ TPIT	T-BOX TRANSCRIPTION FACTOR 19	* 604614	Deficiencia hormona adrenocorticotropa	(Vallette-Kasic et al. 2005)
WDR11	WD REPEAT-CONTAINING PROTEIN 11	* 606417	Hipogonadismo hipogonadotrófico	(Kim et al. 2010)
ZSWIM6	ZINC FINGER SWIM DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 6	* 615951	Acromegalia	(Smith et al. 2014)
Genes candidatos, basados en experimentos en modelos animales				
ARX	ARISTALESS-RELATED HOMEBOX, X-LINKED	* 300382	Lisencefalia con anomalías genitales	(Miyata et al. 2009)
ACVRL1	ACTIVIN A RECEPTOR, TYPE II-LIKE 1	* 601284	Telangiectasia. Mediador de gonadotropinas en ovario. Pez Cebra	(Wang and Ge 2003)
BMP2	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2; BMP2	* 112261	Baja estatura, anomalías esqueléticas	(Treier et al. 1998)
BMP7	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 7	* 112267		(Deprez et al. 2013)
CDH1	CADHERIN 1	* 192090		(Batchuluun et al. 2016)
CDH2	CADHERIN 2	* 114020	Agenesia cuerpo calloso	(Chauvet et al. 2009)
CDKN1B	CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1B	* 600778	Neoplasia endocrina	(Alrezk et al. 2017)
DIO2	DEIODINASE, IODOTHYRONINE, TYPE II	* 601413	T4 alta. Leve retardo de crecimiento	(Schneider et al. 2001)
DMXL2	DMX-LIKE 2	* 612186	Perdida de neuronas GnRH	(Tata et al. 2014)
FGF10	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10	* 602115	Apoptosis de pituitaria rudimentaria en Ratones KO	(Ohuchi et al. 2000)
GLI3	GLI-KRUPPEL FAMILY MEMBER 3	* 165240	Síndrome de Pallister-Hall	(Devine et al. 2009)
HNF1A	HNF1 HOMEBOX A	* 142410	Síndrome de Laron. Diabetes mellitus	(Lee et al. 1998).
HNRNPU	HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN U	* 602869		(Selmer et al. 2012)
INSM1	INSULINOMA-ASSOCIATED 1	* 600010		(Welcker et al. 2013)
ISL1	ISL LIM HOMEBOX 1	* 600366		(Sjödahl and Gunhaga 2008) (Brinkmeier et al. 2020)
NKX2-6	NK2 HOMEBOX 6	* 611770		
NOG	NOGGIN	* 602991		
NRP2	NEUROPIILIN 2	* 602070		(Cariboni et al. 2010)
OTX1	ORTHODENTICLE HOMEBOX 1	* 600036	Enanismo transitorio hipogonadismo	(Jorgez et al. 2014)
RAX	RETINA AND ANTERIOR NEURAL FOLD HOMEBOX GENE	* 601881	Microftalmia	(Brachet et al. 2019) (De Souza and Placzek 2021)
SDHA	SUCCINATE DEHYDROGENASE COMPLEX, SUBUNIT A, FLAVOPROTEIN	* 600857		

SHH	SONIC HEDGEHOG SIGNALING MOLECULE	* 600725	Holoprosencefalia	(Gregory et al. 2014) (Belloni et al. 1996)
SIX3	SIX HOMEODOMAIN PROTEIN 3	* 603714	Holoprosencefalia	(Lacbawan et al. 2009) (Gaston-Massuet et al. 2008)
SMOC2	SPARC-RELATED MODULAR CALCIUM-BINDING PROTEIN 2	* 607223		(Long et al. 2021)
TCF7L1	TRANSCRIPTION FACTOR 7-LIKE 1	* 604652		(Gaston-Massuet et al. 2016)
TGIF1	TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-INDUCED FACTOR	* 602630	Holoprosencefalia	(Tatsi et al. 2013)
WNT4	WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 4	* 603490		(Miyakoshi et al. 2009)
WNT5A	WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 5A	* 164975	Síndrome de Robinow baja estatura	(Cha et al. 2004).
ZEB2	ZINC FINGER E BOX-BINDING HOMEODOMAIN PROTEIN 2	* 605802	Mowat-Wilson syndrome, baja estatura	(Pérez Millán et al. 2016)
Genes recientemente reportados en pacientes con deficiencia hipofisaria				
ACP5	PHOSPHATASE, ACID, TYPE 5, TARTRATE-RESISTANT	* 171640	Short stature	(de Bruin et al. 2016)
AKT3	AKT SERINE/THREONINE KINASE 3	* 611223	Megalencefalia y deficiencia de hormona de crecimiento	(Takagi et al. 2017)
B3GAT3	BETA-1,3-GLUCURONYLTRANSFERASE 3	* 606374	Baja estatura, Deficiencia Hormona de Crecimiento, Hipoglucemia	(Bloor et al. 2017)
BTK	BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA TYROSINE KINASE	* 300300	Enfermedad linfoproliferativa, Deficiencia Hormona de Crecimiento	(Alangari et al. 2005)
CDK6	CYCLIN-DEPENDENT KINASE 6	* 603368		(Gorbenko Del Blanco et al. 2011)
CDON	CELL ADHESION MOLECULE-RELATED/DOWNREGULATED BY ONCOGENES	* 608707	Holoprosencefalia, Interrupcion Tallo Hipofisario	(Bashamboo et al. 2016)
CUL7	CULLIN 7	* 609577	Síndrome 3M, Deficiencia Hormona de Crecimiento	(Meazza et al. 2013)
EIF2S3	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2, SUBUNIT 3	* 300161	Deficiencia hormonas hipofisarias, Desregulación Glucosa	(Gregory et al. 2019)
IARS2	ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASE 2	* 612801	Cataratas, Deficiencia Hormona Crecimiento, Sordera	(Schwartzentruber et al. 2014)
IFT172	INTRAFLAGELLAR TRANSPORT 172	* 607386	Deficiencia hormona de crecimiento	(Lucas-Herald et al. 2015)
IGFALS	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN, ACID-LABILE SUBUNIT	* 601489	Baja estatura	(Kumar et al. 2019) (Domené et al. 2013)
KIAA0753	KIAA0753 GENE	* 617112	Síndrome de Joubert Deficiencia Hormona Crecimiento	(Stephen 2017)
NFKB2	NUCLEAR FACTOR KAPPA-B, SUBUNIT 2	* 164012	Inmunodeficiencia. Deficiencia de ACTH	(Shi et al. 2016) (Brue et al. 2014)
OBSL1	OBSCURIN-LIKE 1	* 610991	Síndrome 3M	(Meazza et al. 2013)

PNPLA6	PATATIN-LIKE PHOSPHOLIPASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 6	* 603197	Spindrome de Oliver-McFarlane	(Lisbjerg et al. 2021)
POLR3A	POLYMERASE III, RNA, SUBUNIT A	* 614258	Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch baja estatura	(Pelletier et al. 2020) (Yu et al. 2021)
PROK2	PROKINETICIN 2	* 607002	Hipogonadismo hipogonadotrófico	(Cole et al. 2008)
RBM28	RNA-BINDING MOTIF PROTEIN 28	* 612074	Alopecia, defectos neurológicos, síndrome de endocrinopatía	(Spiegel et al. 2010)
RNPC3	RNA-BINDING REGION-CONTAINING PROTEIN 3	* 618016	Deficiencia combinada hormonas hipofisarias	(Argente et al. 2014)
ROBO1	ROUNDAABOUT GUIDANCE RECEPTOR 1	* 602430	Hipoplasia tallo de la hipófisis	(Scala et al. 2019) (Bashamboo et al. 2017)
TCF7L2	TRANSCRIPTION FACTOR 7-LIKE 2	* 602228	Diabetes	(Brinkmeier et al. 2003) (Lee et al. 2009)
TMEM67	TRANSMEMBRANE PROTEIN 67	* 609884	RHYNYS SYNDROME	(Brancati 2018)
XYLT1	XYLOSYLTRANSFERASE 1	* 608124	Desbuquois Dysplasia	(Bui et al. 2014)
Proteínas interactuantes con PROP1 (resultados preliminares de nuestro laboratorio)				
CTNNB1	CATENIN, BETA-1	* 116806	Cancer	
GABPA	GA-BINDING PROTEIN TRANSCRIPTION FACTOR, ALPHA SUBUNIT	* 600609		
GTF2I	GENERAL TRANSCRIPTION FACTOR II-I	* 601679		
NFIB	NUCLEAR FACTOR I/B	* 600728	Macrocefalia, retraso madurativo	
PBX1	PRE-B-CELL LEUKEMIA TRANSCRIPTION FACTOR 1	* 176310	Anomalías tracto urinario, pérdida audición, retraso madurativo	
SMARCA5	SWI/SNF-RELATED, MATRIX-ASSOCIATED, ACTIN-DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY A, MEMBER 5	* 603375		
STAT3	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3	* 102582	Enfermedad autoinmune	
THAP11	THAP DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 11	* 609119		
ZBTB20	ZINC FINGER- AND BTB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 20	* 606025	PRIMROSE SYNDROME	

Tabla 1: Genes incorporados en el panel de smMIPs. Los genes se dividen en cuatro categorías según el nivel y tipo de evidencia relacionado a HC.

Puesta a punto y captura de ADN

Amplificación de las sondas: Se amplificó la muestra original de sondas en dos etapas. La primera etapa consiste en amplificar las sondas utilizando una termocicladora de PCR en

tiempo real para detener la reacción en el momento de cambio de inflexión de la curva de amplificación (Fig. 13). La reacción se realizó según la Tabla 2.

Los 8 tubos de amplificación se unieron en una sola mezcla posterior, y se limpió al ADN resultante de la reacción con beads magnéticas (Box 1) y se constató la amplificación por la presencia de una banda de aprox 150 pb gel de poliacrilamida (PAGE) (Fig. 14).

	Master Mix #1 tubo (ul)	Master Mix x 10.5 (ul)
5X buffer de reacción Q5 (NEB)	10	105
dNTPs 10mM	1	10,5
dH2O	34,5	362,25
Q5 Hifi Polimerasa (NEB)	0,5	5,25
SYBR Green 100X (final 0.5X)	0,25	2,625
jklab0255_2019mipsPrep1f 10uM (GAGATCGGCGCGTTAGAAGAC)	1,5	15,75
jklab0256_2019mipsPrep1r 10uM (TGCAGGATCTAGGGCGAAGAC)	1,5	15,75
Armar la MM, sacar 2x49 ul para Controles negativos, y agregar al resto las sondas a amplificar. Sondas diluidas 1:5 en TTE8 (10mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,05% Tween-20)	1	8
10 wells: 8 wells (1A-1H) con sonda como molde. 2 wells NTC (no-template control) (1 ul Agua o TTE8) Ciclado: 95°C 3min, {98°C 20 seg, 63°C 15 seg, 72°C 15 seg - lectura placa- 72°C 8 seg}, tantos ciclos como necesario, por lo general entre 11 y 16.		

Tabla 2: Primer reacción de amplificación de las sondas smMIPs

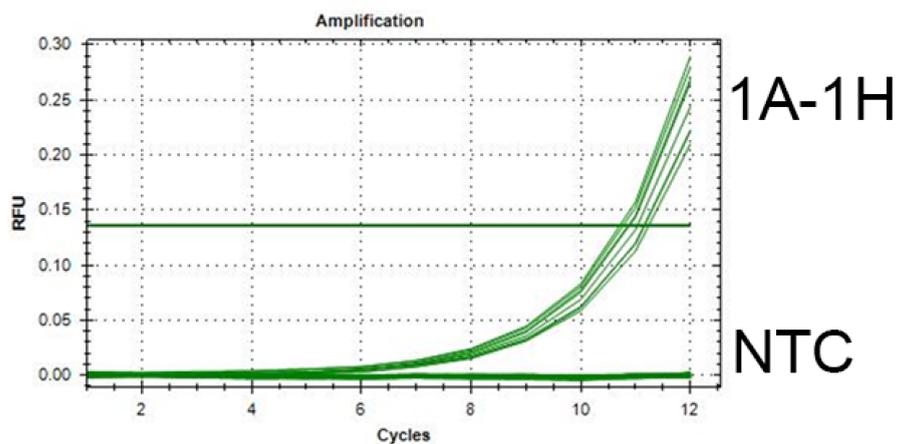


Figura 13: Amplificación de las sondas de smMIPs detectado por PCR en tiempo real. 1A-1H: replicas de amplificación con las sondas como molde; **NTC:** control sin ADN molde (no-template control)

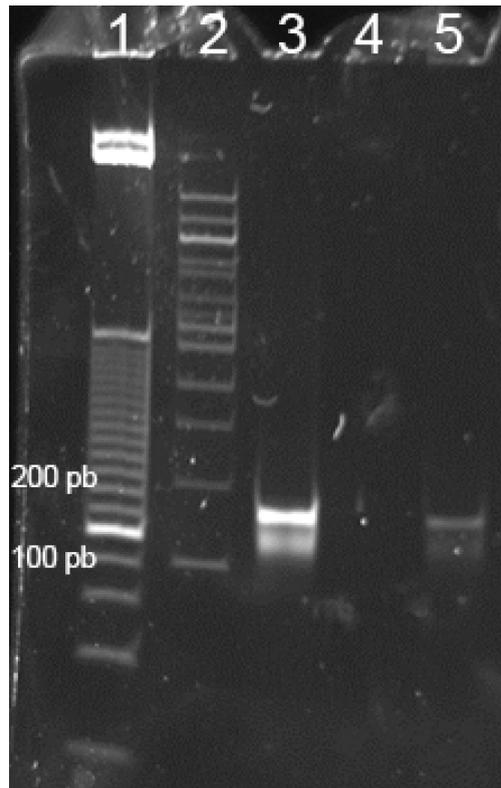


Figura 14: PAGE de ADN para el resultado de la amplificación de smMIPs. Calles: 1) Ladder 25 pb; 2) Ladder 100 pb; 3) Amplificación del panel de smMIPs para CPHD purificado; 4) Control NTC; 5) Amplificación del panel de smMIPS de CPHD antes de la purificación. Se sembraron 3ul de muestra en cada calle.

Box 1: Protocolo de limpieza por beads magnéticas

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL, a los 400 ul de reacción se le agregó 2 volúmenes de beads + buffer (100 ul beads (AMPure XP), 700 buffer (20%*m/v* g PEG-8000 2,5 M NaCL). Se mezcló por inversión y dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Se separaron las beads en rack magnético por 3 min y se separó el sobrenadante. Se lavó el pellet aún en el rack con 2 veces con 1 mL Etanol 80% por 30 segundos. Se sacó el tubo del rack y permitió que se seque. Se reconstruyó el ADN en 40ul de buffer TTE8 (10mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,05% Tween-20), agitando por 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante luego de separar las beads en rack magnético.

La segunda etapa de amplificación ya nos permite tener una masa suficiente de sondas para proceder a la captura de las regiones genómicas. Se parte de 70 pg de ADN de la primera amplificación por well para 48 wells totales. Se realizó la reacción según el protocolo de la Tabla 3, esta vez, permitiendo que la reacción llegue a su *plateau* (Fig. 15).

	Master Mix #2 tubo (ul)	Master Mix x 49 (ul)
5X buffer de reacción Q5 (NEB)	10	490
dNTPs 10mM	1	49
dH2O	32,25	1580,25
Q5 Hifi Polimerasa (NEB)	0,5	24,5
SYBR Green 100X (final 0.5X)	0,25	12,25
jklab0255_2019mipsPrep1f (GAGATCGGCGCGTTAGAAGAC) 10uM	2,5	122,5
jklab0256_2019mipsPrep1r (TGCAGGATCTAGGGCGAAGAC) 10uM	2,5	122,5
Sacar 49 ul para NTC, y agregar al resto las sondas a amplificar Sonda amplificada en primera reacción, diluida a 70pg/ul	1	48
48 wells: 47 wells con sonda como molde. 1 wells NTC (no-template control) (1 ul Agua)		
Ciclado: 95°C 3min, {98°C 20 seg, 63°C 15 seg, 72°C 15 seg - lectura placa- 72°C 8 seg}, tantos ciclos como necesario, por lo general entre 16 y 20.		

Table 3: Segunda reacción de amplificación de las sondas smMIPS

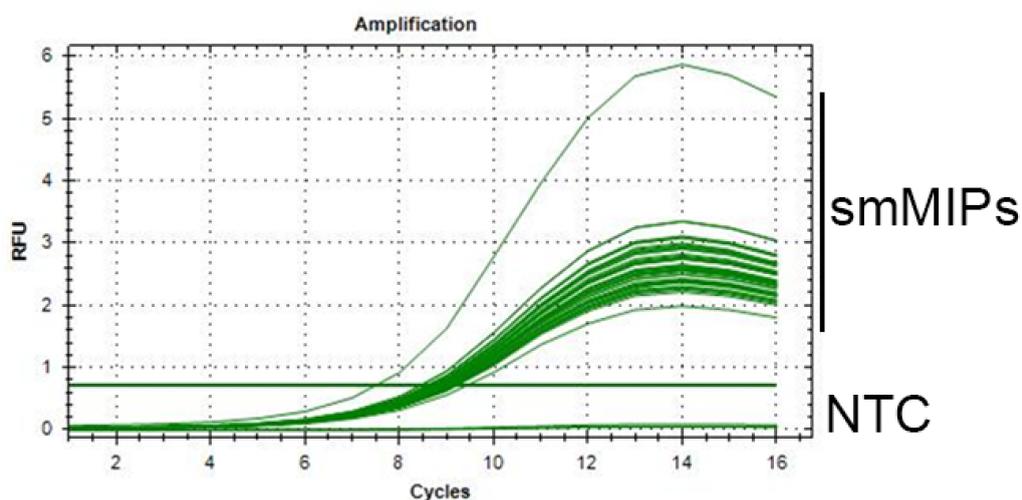


Figura 15: Segunda ronda de amplificación de las sondas de smMIPS detectado por PCR en tiempo real. smMIPs: 48 pocillos de amplificación de las sondas. NTC: control sin ADN molde

Para la limpieza de los productos de amplificación se volvió a usar beads magnéticas como se indica en el Box1. El producto de 8 tubos (400ul) se combinó en un tubo de microcentrifuga y se le agregó 100ul de beads y 900 ul de buffer. Se incubó por 20 min en rotador a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos en rack magnético por 3 min y se

separó el sobrenadante para medir luego concentración de ADN. Los pellets fueron limpiados 2 veces con 1ml de etanol 80%. Se recuperó el ADN en 58 ul de buffer 1X CutSmart (NEB), incubando 5 min a temperatura ambiente, y separando el sobrenadante en rack magnético. A cada elusión (6), se le agregó 2 ul de enzima BbsI-HF (NEB) y se incubó a 37°C overnight, para eliminar los adaptadores de amplificación y obtener las sondas maduras.

Al día siguiente se juntaron las 6 reacciones en 2 tubos de 1.5 mL (180 ul c/u) y se purificaron con beads magnéticas agregando 90ul de buffer, 100ul de beads y 900 ul de Isopropanol. Se incubó en rotador por 20 minutos y se separaron las beads del sobrenadante en rack magnético. El pellet se lavó 3 veces con 1ml etanol 80%, se dejaron secar a temperatura ambiente fuera del rack y se eluyó el ADN con 100 ul de buffer TTE8 por tubo.

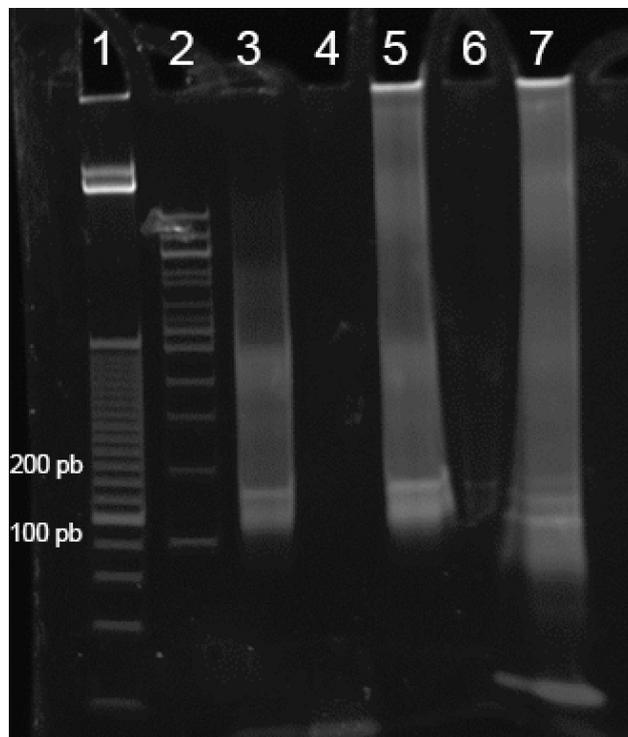


Figura 16: PAGE de ADN para el resultado de la segunda amplificación de smMIPs, limpieza y digestión con BbsI. Calles: 1 y 2) Ladder 25 y 100pb 3) PCR smMIPS 4) PCR NTC 5) PCR de smMIPS purificada; 6) Sobrenadante limpieza por beads magnéticas; 7) smMIPs purificadas luego de la digestión por BbsI – smMIPs listas para captura.

Quantificación: La concentración del producto final se midió por Quantus (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 4) y se observó la presencia de la banda de las sondas por PAGE (Fig. 16).

Muestra	Quantus (ng/ul)	Masa Total
Post-PCR, pre lavado	8,6	50ul x 45 tubos x 8,6 ng/ul = 19,35 ug
Sobrenadante Lavado	0,591	
Post-PCR, post lavado	29	60 ul x 6 tubos x 29 ng/ul = 10,44 ug (54% recuperacion)
Digerido y Lavado (MIPs finales)	25	200 ul x 25 ng/ul = 5 ug (26% recuperación)

Tabla 4: Cuantificación y masa recuperada de luego de la limpieza de beads magnéticas de las sondas smMIPs amplificadas.

Reacción de Captura y digestión: Para la captura de las regiones genómicas de interés se partió de 50 ng/ul de ADN genómico en un volumen de 10 ul. Como control positivo, se utilizó ADN de la línea celular GM18507, derivada de un sujeto control participante del proyecto 1000 Genomas. La reacción de captura se realizó siguiendo el protocolo de la Tabla 5.

	Captura Master Mix x1 (ul)
H2O (total para 10 ul)	6,82
Ampligase buffer 10X	2,00
dNTPs 25 uM (c/u)	0,32
NEB Hemo KlenTaq	0,32
Ampligasa (5U/ul)	0,2
Sondas: 8,5ng por captura	0,34

Tabla 5: Proporción de reactivos para la reacción de captura (por muestra).

En hielo, se alicuotó 10ul de mezcla de captura por well en placa de 96 wells o *strips* de 8 wells, y 10 ul de ADN genómico. Se considera además reacciones suficientes para control sin ADN molde y sin mix de captura. Se selló la placa con film, vortexeó y centrifugó. Luego se introdujo en una termocicladora con el siguiente protocolo: 95°C por 10 min; Rampa de 95°C a 60°C a una velocidad de -0.1°C/seg; 60°C 18-48hs.

Al terminar el programa, se sacó la placa de la termocicladora y se la colocó en hielo. Se le agregó 2 ul de mix de exonucleasas (0,2 ul de buffer Ampligasa 10X, 0,25 ul Exo I (20U/ul), 0,25 Exo III (100U/ul), 1,3 ul H2O) por well. Se selló la placa con film, vortexeó y centrifugó. Se llevó la placa a 37°C por 45 min, 95°C por 2 min. Las exonucleasas digieren el ADN lineal de la muestra, manteniendo intactas las sondas circularizadas durante la reacción de captura.

Reacción de PCR para el agregado de índices a cada muestra: Siguiendo la digestión, se procedió a amplificar las sondas con primers que incluyen los *barcodes* (índices) de secuenciación. Esto linealiza los fragmentos de ADN capturados y ya los vuelve listos para secuenciar en un equipo Illumina, además de permitir identificar a cada muestra por separado. La reacción se realizó según se muestra en la Tabla 6.

	Barcoding Master Mix x1 (ul)
5X Kapa FIDELITY Buffer0	5,00
H2O (total para 20 ul)	11,5
Kapa dNTPs 10mM	0,75
SybrGreen 10X (final 0,5X)	1,25
Barcode P5 10uM (final 200 nM)	0,5
Barcode P7 10uM (final 200 nM)	0,5
Kapa HiFi HotStart DNAPol 1U/ul	0,5
ADN molde (paso anterior)	5,00
Ciclado 95°C x 3 min; {98°C x 20 seg, 65°C x 15 seg, 72°C x 40 seg} x 26 ciclos; hold a 4°C	

Tabla 6: Reacción de PCR para el agregado de índices y adaptadores de secuenciación Illumina por muestra.

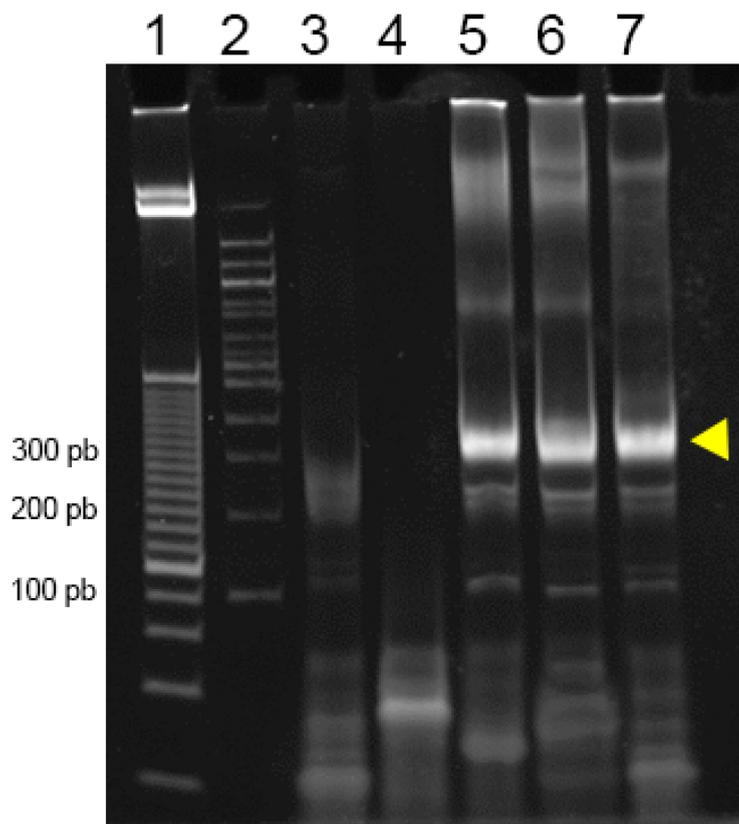


Figura 17: PAGE de ADN para el resultado de la puesta a punto de captura de ADN genómico de línea celular control. Calles: 1 y 2) Ladder 25 pb y 100 pb; 3) PCR NTC; 4) Barcode NTC; 5, 6 y 7) réplicas ADN genómico. Con flecha amarilla se indica la banda esperada de 300pb de ADN capturado y con barcodes de secuenciación.

Para constatar la amplificación se analizó los productos de PCR por PAGE, esperando ver una banda a 300 pb de producto de amplificación (Fig. 17). Por último se debe purificar el producto de secuenciación para eliminar los restos de primers, dNTPs y polimerasa previo a

ingresar al secuenciador. Para ello se toman 10ul de cada reacción y se los mezcló en grupos de a 4 ó 5, que al ya contar con *barcodes* de identificación se pueden agrupar. Se purificaron utilizando el protocolo de limpieza por beads magnéticas anteriormente descrito utilizando 0,9X volúmenes de beads magnéticas. El ADN se eluyó de los pellets magnéticos con 15 ul de TE pH 8.

Secuenciación masiva: La puesta a punta con ADN control fue secuenciada en un equipo Illumina MiSeq a 300.000 lecturas por réplica. Combinando las 3 réplicas, obtuvimos 1133932 lecturas individuales 84.48% cobertura horizontal del panel diseñado y 420X profundidad promedio por base. Posteriormente, la muestra de pacientes fue secuenciada en un equipo Illumina NovaSeq.

Enrolamiento y selección de pacientes

El trabajo fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Se obtuvo para cada caso/paciente el consentimiento informado de los padres y, en el caso que corresponda, el asentimiento de los pacientes incluidos en el estudio. Se contó con la colaboración adicional del Hospital Garrahan, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba), Hospital Nacional Posadas, Hospital Italiano, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde y Hospital Militar Central Cirujano Mayor Dr. Cosme Argerich. Además, el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Michigan aprobó el uso y análisis de muestras de ADN en forma anónima.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados con deficiencia para hormonas hipofisarias de acuerdo a criterios descritos previamente e internacionalmente aceptados en los departamentos de endocrinología de todos los hospitales. Brevemente, los pacientes fueron diagnosticados con deficiencia para hormona de crecimiento (GHD por Growth Hormone Deficiency) en base al retardo en la velocidad de crecimiento y pico de GH menor a 4.8 ul/L luego de tests de estimulación secuenciales con arginina/clonidina. La deficiencia de hormona estimulante de la tiroides (TSH), fue diagnosticada en individuos con tiroxina libre <1.0ng/dl con niveles normales o bajos de TSH, TSH≤10 mU/L en pacientes menores a 2 meses de edad y ≤6.5 mU/L en niños mayores. La deficiencia en ACTH fue diagnosticada en base a niveles bajos de cortisol en suero, <30.3 nmol/L en pacientes menores a 2 meses de vida, <58 nmol/L en pacientes entre los 2 y 6 meses, y <165 nmol/L en niños mayores (Ballerini et al. 2010). La deficiencia en prolactina (PRL) fue considerada en individuos con niveles séricos menores al centil 2.5 según sexo y edad. La diabetes insípida central fue diagnosticada mediante poliuria asociada a concentración urinaria:plasmática menor a 1.5 y osmolaridad plasmática mayor a 300 mosm/L. La deficiencia en gonadotropinas fue diagnosticada en infantes masculinos entre 15 días y 6 meses de edad cuando los niveles séricos de hormona luteinizante (LH) y testosterona se encuentran debajo del quinto centil, <0.8 IU/L y <30 ng/dl, respectivamente. En infantes femeninas de 15 días a 2 años, se asume la deficiencia de gonadotropinas cuando los niveles de hormona folículo-estimulante (FSH) son menores a <1.0 IU/L (Braslavsky et al. 2015). En pacientes mayores, se define la deficiencia de gonadotropinas como retrasado o ausente desarrollo puberal con niveles bajos de testosterona sérica (< 3.47 nmol/L) asociado a niveles bajos o normales de LH y FSH. La deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD por combined pituitary hormone deficiency) se define como la presencia de

deficiencias hormonales afectando al menos dos tipos de células productoras de hormonas. Se tomaron imágenes de resonancia magnética (MRI) del cerebro y el área hipotálamo-hipófisis en todos los pacientes.

Se extrajo sangre periférica de **265 pacientes** enrolados en el estudio, diagnosticados con IGHD o CPHD y 193 familiares directos, pertenecientes a 263 familias no relacionadas. Se estudió según la disponibilidad los probando sólo, dúos o tríos.

Aislamiento de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico a partir de sangre periférica mediante Puregene Blood kit (QIAGEN) según el protocolo del fabricante. Se cuantificó mediante QuantiFluor dsDNA System (Promega) y la concentración de ADN se normalizó a 50 ng/ul para cada ensayo de smMIPS. La pureza de la extracción se determinó por la relación de absorbancias 260 nm/280 nm. Si la razón obtenida fue entre 1.8 y 2.1 las muestras de ADN fueron incluidas para el procesamiento en los siguientes pasos.

WES y WGS

Para un grupo reducido de casos que no pudieron ser diagnosticados con las MIPS, se decidió realizar secuenciación de exoma completo y/o genoma completo (ver sección 1C - Resultados). En estos casos el ADN se extrajo de manera equivalente a lo previamente descrito. Para WES las regiones exónicas fueron capturadas con el kit “Exoma Research Panel” (IDT). La preparación de las bibliotecas tanto del exoma como el genoma fueron realizadas por el centro de secuenciación de la Universidad de Michigan y fueron secuenciados en un equipo NovaSeq (S4) de 300 ciclos.

Pipeline Bioinformático de procesamiento y análisis de datos

Las regiones genómicas seleccionadas fueron capturadas como mencionado previamente. La secuenciación de cada paciente y familiar fue mapeado contra el genoma de referencia humano GRCh37 mediante el algoritmo desarrollado por el Laboratorio Kitzman *mimips* (disponible en <https://github.com/kitzmanlab/mimips>). El programa haplotypcaller (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) de GATK fue utilizado para realizar el llamado de variantes.

Priorización de Variantes: El archivo resultante con las variantes (VCF) fue anotado con las bases de datos dbSNP, gnomAD y ClinVar, además de varios predictores de patogenicidad, como Polyphen2 (Adzhubei et al. 2010; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (Vaser et al. 2015; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), CADD (Rentzsch et al. 2018; <https://cadd.gs.washington.edu/>) y REVEL (Ioannidis et al. 2016; <https://sites.google.com/site/revelgenomics/about>) los cuales se utilizaron para predecir la implicancia de la variante en la función proteica, y SpliceAI (Zeng and Li 2021), el cual se utilizó para evaluar posibles alteraciones del splicing. El filtrado de variantes y priorización se realizó mediante la plataforma (<https://www.bitgenia.com/b-platform/>). Las variantes candidatas fueron seleccionadas en base a reportes de patogenicidad previos, variantes de impacto moderado o alto (missense, ganancia de codón stop, indels), baja o nula frecuencia alélica en poblaciones control y efecto dañino predicho. Como individuos control usamos la base de datos gnomAD (Karczewski et al. 2020) y la base de datos propia de mi director Dr. Martí con más de 100 controles argentinos (pacientes con enfermedades

no endocrinas) derivado del proyecto 100 Exomas (<http://apps.bitgenia.com/100exomas>). Finalmente, evaluamos la patogenicidad de las variantes mediante las guías de interpretación de la American College of Medical Genetics (ACMG) (Richards et al. 2015). Se utilizó la anotación automática de InterVar (Li and Wang 2017) para determinar la interpretación por ACMG que luego fue revisada manualmente.

Modelado Proteico: Se realizó un análisis de la estructura proteica *in silico* en el caso de encontrarse disponibles estructuras cristalizadas para la región en donde se encontraban las variantes. Las estructuras para los dominios LIM y Homeobox de LHX4 (PDB 6CME y 5HOD respectivamente) fueron descargados de la base de datos PDB. Se modeló el dominio homeobox de LHX3a a partir de la estructura del dominio homeobox de LHX4 utilizando Modeller (Version 9.24 <https://salilab.org/modeller/>). La visualización de las mutaciones se realizó mediante el programa Maestro (Versión 2019-4: Maestro, Schrödinger, LLC <https://www.schrodinger.com/maestro>). El cambio de aminoácido se visualiza utilizando el rotámetro que mejor mantiene la orientación del aminoácido original en la estructura cristalográfica.

Conservación Proteica: Las secuencias de las proteínas en formato FASTA de diferentes especies fueron descargadas del repositorio del NCBI y se realizó un alineamiento múltiple utilizando el software Clustal Omega [herramienta online del The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>].

1C - Resultados

Resumen clínico de los pacientes incluidos en el estudio

La Tabla 7 presenta el resumen clínico de los casos analizados con el panel de MIPS diseñado en este trabajo de tesis (Panel 2019). En la descripción de variantes encontradas, descrito más adelante, se agregan también los pacientes secuenciados con el panel de MIPS diseñado 2016 (Pérez Millán et al. 2018) mencionado en la sección de métodos. La tabla de resumen clínico de estos últimos pacientes se encuentra en la Tabla Sup 1.

Es importante destacar que todos los casos corresponden a pacientes argentinos, una población relativamente poco estudiada en el contexto mundial a lo que refiere en líneas generales a diversidad genética, y en lo particular a enfermedades de la hipófisis, siendo formada por poblaciones nativas amerindias, europeas y africanas (Homburger et al. 2015) (Muzzio M et al. 2018) (Luisi et al. 2020). De la tabla se observa que la mayor parte de los casos son esporádicos, es decir, que no presentan familiares con la patología, lo que podría indicar una causa genética generalmente autosómica recesiva, de novo, ó autosómica dominante con penetrancia incompleta. El diagnóstico de estos pacientes generalmente se realiza durante la infancia, con un desvío estándar grande, lo que puede indicar una cierta dificultad de realizar el diagnóstico, tanto por las pruebas bioquímicas como una dificultad en el acceso a los servicios médicos en casos de pacientes diagnosticados en la adolescencia tardía. En el estudio se reclutaron tanto pacientes masculinos como femeninos, con una tendencia desviada hacia los masculinos (61%). Más de la mitad de los pacientes poseen anomalías a nivel de la glándula hipofisaria (63/95) y la deficiencia hormonal más común presentada es de GH (80%), siguiendo luego TSH (58%) y ACTH (48%).

Muestras	180	Resonancia magnética	
Casos	95	Adenohipófisis	
Esporádicos	93	Hipoplasia	60
Familiares	2	Ausencia	3
Edad Diagnóstico	8,9 ± 8,9 años	Normal	7
Género		Neurohipofisitis	
Masculino	58 (61%)	Ectópica	42
Femenino	37 (39%)	Ausencia	7
Diagnostico principal		Normal	14
IGHD	26 (27%)	Tallo	
CPHD	65 (68%)	Ausencia	24
Otros		Delgado	11
Displasia Septo óptica	8	Interrumpido	5
Holoprosencefalia	2	Normal	18
Deficiencia Hormonal		Doble	1
GH	76 (80%)	Urogenital	
ACTH	46 (48%)	Micropene	6
TSH	55 (58%)	Criptocordismo	6
Gonadotropinas (LH, FSH)	12 (13%)	Hipogonadismo	3
PRL	2 (2%)	Retraso puberal	2
		Pubertad precoz	1

Table 7: Resumen clínico de los pacientes secuenciados con el panel de smMIPs diseñado en este trabajo de tesis.

Resultados generales de secuenciación

Se secuenció por tecnología NGS el ADN genómico de pacientes y sus familiares directos (usualmente padre y madre) con nuestro panel de captura personalizado de smMIPS para 104 genes relacionados a HC, según lo descrito en materiales y métodos de este capítulo. Las lecturas fueron separadas por muestra de manera bioinformática (utilizando los índices marcadores correspondientes) y mapeadas contra el genoma de referencia humano versión hg38. De la totalidad de bases individuales blanco de la secuenciación, el 82,88% fue secuenciado con una profundidad media igual ó mayor a 10X por muestra (Fig. 18 y 19).

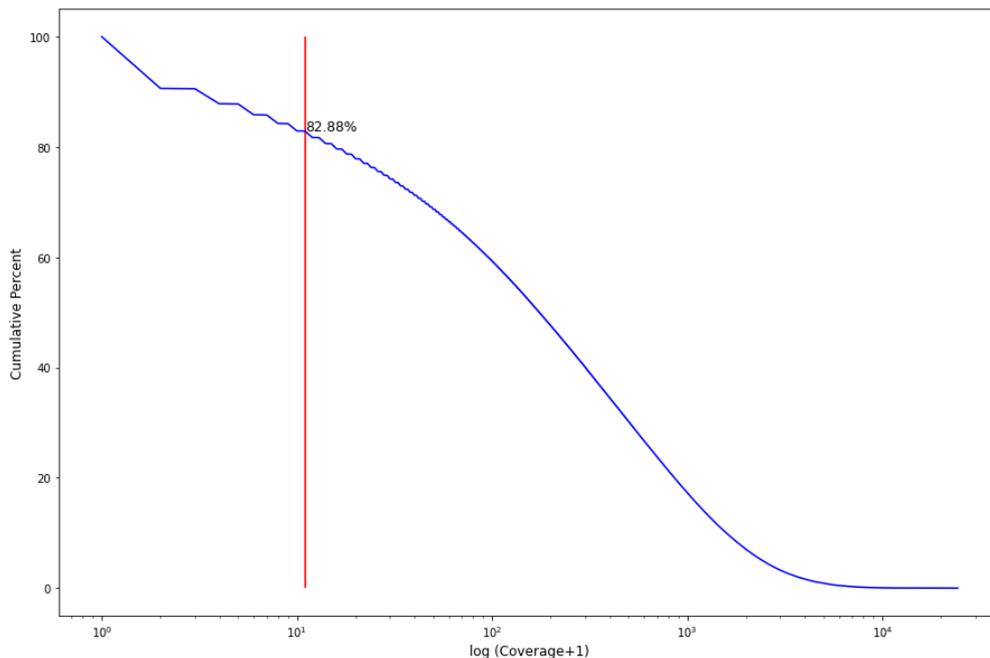


Figura 18: Porcentaje acumulado en función de la cobertura promedio por base. En el eje de de las ordenadas se grafica el logaritmo de la cobertura media por base +1, para incluir las bases con cobertura nula. La barra roja indica el punto de corte de una cobertura igual o mayor a 10X.

Pasando a un análisis individual por muestra, cada una se secuenció en promedio 1,5 millones de lecturas individuales, y la mayoría tiene un alto nivel de profundidad media (>100X), con una media global de (540 ± 450)X (Fig. 19). La profundidad de secuenciación sigue una correlación lineal con la cantidad de lecturas totales secuenciadas en cada muestra. Existen alrededor de 24 muestras con profundidad menor a 20X. Seis de estas muestras corresponden a controles negativos de los procesos de captura (por lo que el resultado es el esperado), mientras que las 18 restantes corresponden a muestras de probandos y/o sus familiares. Estas muestras, debido a su baja calidad fueron descartadas del análisis posterior. Gráficos de profundidad por gen se encuentran en la Fig. Suplementaria 1.

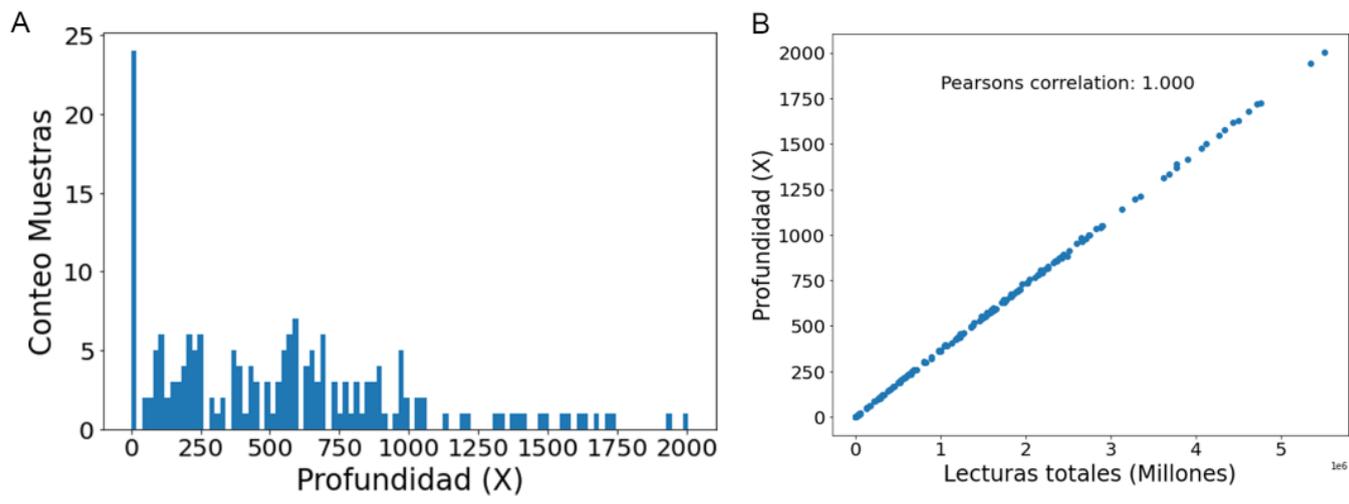


Figura 19: Análisis de la profundidad promedio por muestras obtenida. A) Histograma de distribución de la profundidad obtenida para el conjunto de las muestras. B) Relación entre la cantidad de lecturas totales por muestra y la profundidad media.

Analizando la cobertura horizontal, es decir, el porcentaje de las bases blanco a ser capturadas y secuenciadas por al menos una lectura, podemos observar en la Fig. 20-A, que la mayoría de las muestras tienen coberturas mayores al 90%. Al eliminar luego del análisis a las 24 muestras con profundidad menor a 20X, la media de cobertura horizontal es de $(96 \pm 1,8)\%$, por lo que también se puede expresar en que entre 94 y 98 bases de cada 100 incluidas en el panel de genes fueron debidamente secuenciadas. Al igual que con la profundidad, a mayor número de lecturas por muestra, mayor es el valor de cobertura horizontal, siguiendo en este caso una tendencia sigmoidea (Fig. 20-B). A partir de esta figura se puede concluir que un mínimo de 10^5 lecturas es suficiente para obtener una buena cobertura horizontal.

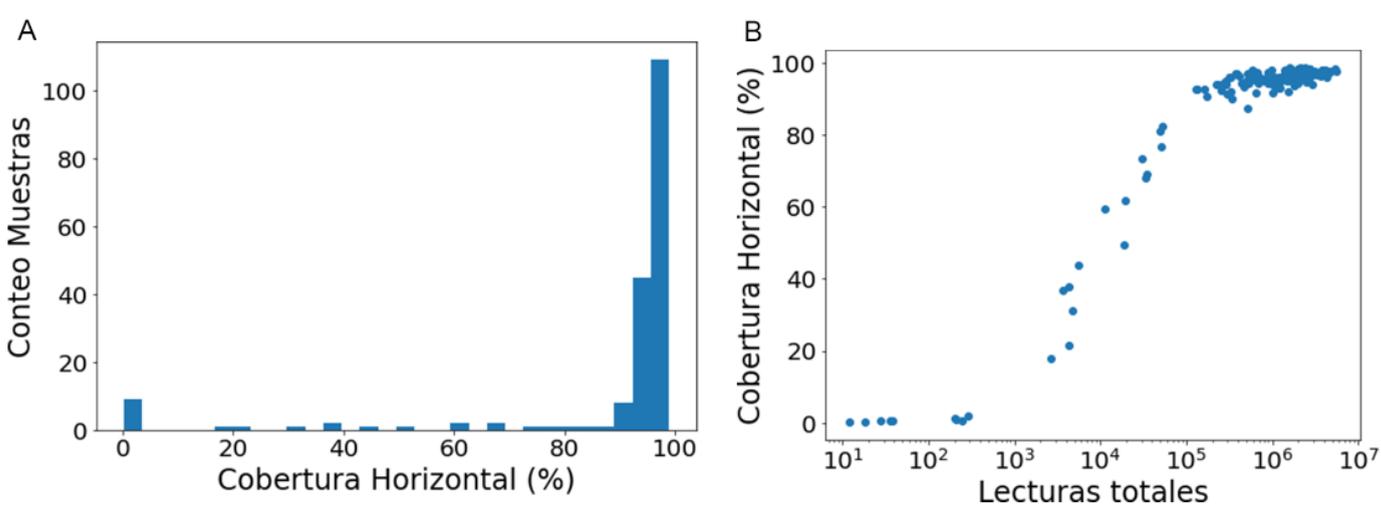


Figura 20: Análisis de la cobertura horizontal obtenida. A) Histograma de distribución de la cobertura horizontal obtenida para el conjunto de las muestras. B) Relación entre la cantidad de lecturas totales por muestra y la cobertura horizontal.

Otro parámetro de calidad que se puede analizar, es el porcentaje de lecturas que correctamente fueron mapeadas contra el genoma de referencia utilizado. Este número permite establecer si la muestra se encontraba en buenas condiciones, ya que la presencia de lecturas que no mapean contra el genoma humano de referencia utilizado puede indicar la presencia de contaminaciones en la muestra, ó una incorrecta preparación en la captura de los fragmentos blanco en la biblioteca de MIPS. En este ensayo todas las muestras presentan un alto porcentaje de mapeo contra al genoma de referencia humano (Fig. 21-A), con una media de $(99,94 \pm 0.02)\%$.

Por otro lado, una forma de evaluar de que no hubo errores de muestreo del ADN y, en particular, que no estemos secuenciando muestras repetidas, ya sea por error ó contaminación inter-muestral, es analizar la proporción de variantes compartidas entre muestras. Para ello, se analizaron todos los pares de muestras posibles para muestras con 50 o más SNPs identificados. En este caso vemos que casi todos los pares de muestras secuenciadas comparten entre 0 y la mitad de variantes (Fig. 21-B), representando relaciones tanto familiares (más cerca de 0,5 en proporción de SNPs compartidos) ó muestras no relacionadas (con valores menores). Existe sólo una pareja de muestras con valores altos de SNPs compartidos (0,85). Al revisar la procedencia de estas muestras detectamos que ambos ADN corresponden a una pareja de hermanos gemelos, explicándose así el alto número de SNPs compartidos.

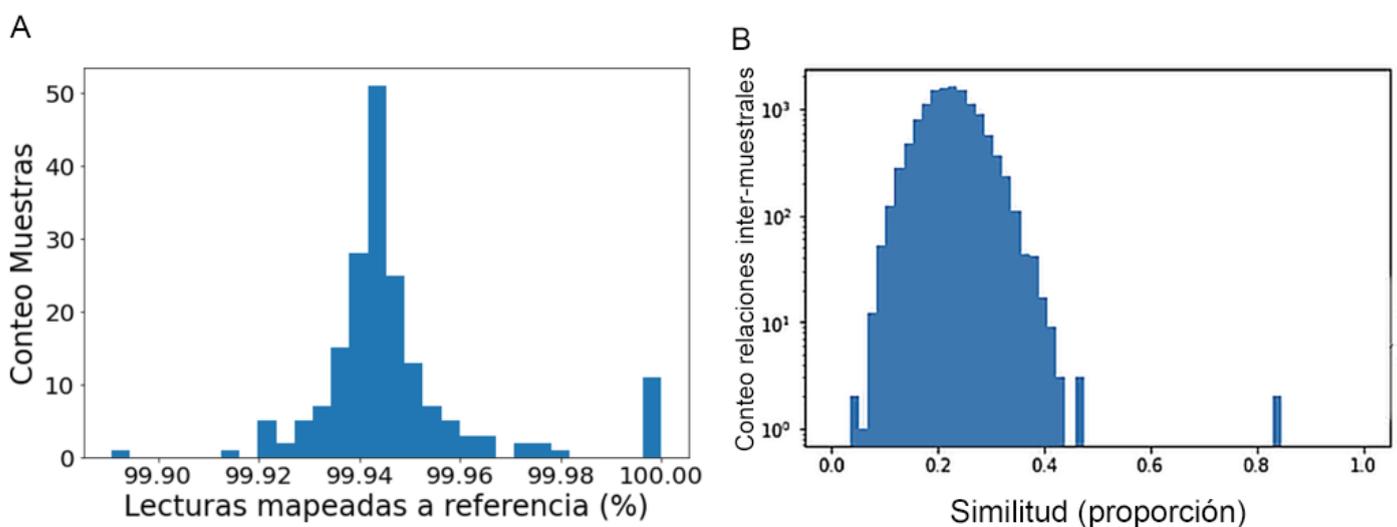


Figura 21: Calidad general de la secuenciación. A) Distribución del porcentaje de lecturas individuales que fueron mapeadas correctamente al genoma humano de referencia por cada muestra. B) Histograma de similitud entre muestras para muestras con más de 50 SNPs detectados.

Variantes principales encontradas

En esta sección se analizará en conjunto la secuenciación de los pacientes con ambos paneles de MIPS, correspondientes a los diseños del 2016 y el realizado en 2019 (panel diseñado en este trabajo de tesis). El conjunto incluye 265 pacientes y 193 familiares directos, siendo 66 trios (padre-Madre-Probando), 55 duos y 144 probandos solos. Realizando filtros estrictos - variantes de baja frecuencia poblacional, variantes de efectos

moderados o altos en la estructura proteica, cobertura mayor a 20 lecturas, calidad de genotipo GQ>99, con predicciones VUS, LP o P, sin reportes benignos o posiblemente benignos en ClinVar - se obtuvieron 205 variantes en 149 probandos individuales (56%) (Fig. 22). Es importante notar que la mayor proporción de estas variantes corresponden a Variantes de Significado Incierto (VUS; variants of uncertain significance), por lo que la verdadera proporción de casos resueltos, o sea, que la variante encontrada explique realmente el fenotipo observado, puede ser menor. Pasaremos a detallar las variantes más relevantes analizadas, con una alta probabilidad a explicar la patología y por lo tanto de resultar en un diagnóstico molecular (Tabla 8).

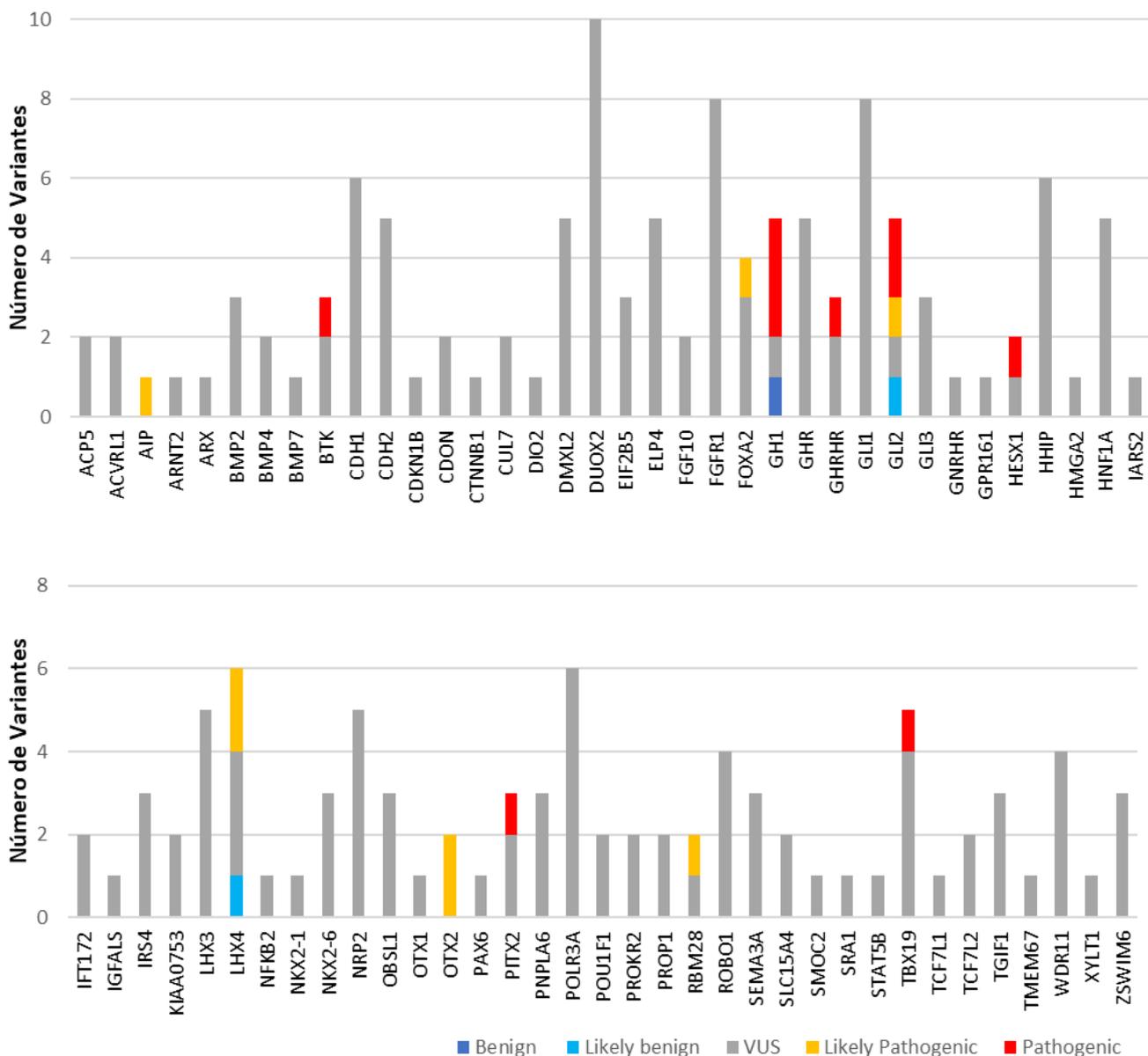


Figura 22: Número de variantes candidatas a explicar la patología identificadas por gen. Las variantes se encuentran clasificadas por significancia según ACMG. Se indican variantes totales, aún si se encuentran en un mismo paciente.

Case	1	2	3	4	5	
Edad al diagnostico (años)	1 mes	1	6	3	2	
Genero	M	F	F	M	M	
Deficiencias Hormonales	GH, TSH, ACTH, LH, FSH	GH	GH	GH, TSH	GH, TSH, ACTH	
Altura SDS	-0.21	-3.51	-3.07		-0.1	
MRI	NH: Ectopica Hipoplasia nervio optico	Normal	AH: Hipoplasia	NH: Hipoplasia	AH: Hipoplasia Hipoplasia de quiasma óptico	
Malformaciones y características asociadas	Micrognatia, puente nasal hundido. Micropene. Criptocordismo Hipogluceemia neonatal e ictericia	Puente nasal hundido, Frente prominente.	Hipogonadismo	Puente nasal hundido, Frente prominente	SOD	
Gen	LHX3	LHX3	LHX3	LHX3	LHX4	LHX4
Posición (GRCh37)	9:139090816G>A	9:139090630G>T	9:139090630G>T	9:139091692C>T	1:180235578G>T	1:180217434G>A
Transcripto	ENST00000371746	ENST00000371746	ENST00000371746	ENST00000371746	ENST00000263726	ENST00000263726
Variante	c.559C>T	c.658C>A	c.658C>A	c.301G>A	c.300G>T	c.91G>A
Proteína	p.Pro187Ser	p.Leu220Met	p.Leu220Met	p.Gly101Ser	p.Gln100His	p.Ala31Thr
Tipo mutación	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense
Genotipo	Heterozygous	Heterozygous	Heterozygous	Heterocigota	Heterozygous	Heterocitgota
dbSNP	-	-	-	-	rs1156273617	rs145933198
Polyphen	Probably damaging	Benign	Benign	Probably damaging	Benign	Probably damaging
SIFT	Damaging	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Damaging	Tolerated
Mutation Taster	Disease_causing	Disease_causing	Disease_causing	Disease_Causing	Disease_causing	Disease_Causing
CADD	28.7	20.7	20.7	24.5	24.5	2.262576
REVEL	0.973	0.583	0.583	0.654	0.654	
Frec. alélica gnomad	Ausente	Absent	Absent	0.000004381 (0 hom)	0.00000398 (0 hom)	0.00004254 (0 hom)
Score ACMG	VUS (BP1, PM2, PP3)	VUS (BP1, PM2, PP3)	VUS (BP1, PM2, PP3)	VUS (PM1, PM2, PP3)	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, BP1)	LB (PM1, PP2, PP3, BS2, BP1)
Historia familiar	Not tested	Not tested	Not tested. Mother has short stature	Not tested	Not tested	Not tested

Tabla 8: Descripción clínica de pacientes con variantes relevantes identificadas. F: femenino, M: masculino, GH: hormona de crecimiento, TSH: hormona estimulante de la tiroides, ACTH: hormona adrenocorticotrófica, LH: hormona leutinizante, FSH: hormona folículo estimulante, AH: Adenohipófisis, NH: neurohipófisis, SOD: displasia septo-óptica, P: patogénica, LP: posiblemente patogénica, VUS: variante significado incierto, LB: posiblemente benigna.

Caso	6	7	8	9	10	11	
Edad al diagnóstico (años)	11	7	3 meses	7 meses	4	6	
Genero	M	F	M	F	F	M	
Deficiencias Hormonales	GH, TSH, PRL, ACTH	GH, TSH	GH, TSH, ACTH	TSH	GH	GH	
Altura SDS	-6.4	-2.06			-5.1	-4.27	
MRI	AH: Hypoplasia	Normal	NH: ectópico Agenesia septum pellucidum	Hipoplasia cuerpo calloso	AH: hipoplasia, tallo: ausente	NH: ectópica Silla Turca vacia	
Malformaciones características asociadas	y -	Ulnar valgus	Hipoplasia papila óptica. SOD Hipoglucemia neonatal, Ictericia	Hipoplasia papila óptica. SOD	Puente nasal hundido, hipoplasia de las alas nasales, surco subnasal corto, microcefalia, leve perdida de oído.	Talasemia menor	
Gen	LHX4	LHX4	LHX4	PROP1	LHX4	HESX1	HESX1
Posición (GRCh37)	1:180240974G>T	1:180235529G>A	1:180243353A>G	5:177419840G>T	1:180243427G>A	3:57233 870A>G	3:572327 89G>A
Transcripto	ENST00000263726	ENST00000263726	ENST00000263726	ENST00000308304	ENST00000263726	ENST00000 473921	ENST00000 473921
Variante Proteína	c.611G>T p.Trp204Leu	c.251G>A p.Arg84His	c.812A>G p.Asn271Ser	c.551C>A p.Ala184Asp	c.886G>A p.Gly296Arg	c.77T>C p.Ile26Thr	c.349C>T p.Gln117*
Tipo mutación	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense	Missense	Stop gained
Genotipo	Heterozygous	Heterozygous	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterozygous	Heterozygous
dbSNP	-	rs374124070	-	-	-	rs28936416	-
Polyphen	Probably damaging	Probably damaging	Benign	Benign	Probably damaging	Probably damaging	-
SIFT	Damaging, tolerated	Damaging	Tolerated	Daging	Damaging	Damaging	-
Mutation Taster	Disease_causing	Disease_causing	Disease_causing	Polymorphism	Disease_causing	Disease_causing	Disease_causing
CADD	25.3	25.6				24.6	37
REVEL	0.937	0.808				0.933	-
Frec. alélica gnomad	Absent	0.0000496 (0 hom)	Ausente	Ausente	Ausente	Absent	Absent
Score ACMG	LP (PM1,PM2, PP2,PP3)	VUS (PM1, PM2, PP2, PP3)	VUS(PM2, PP2, BP1)	VUS (PM2)	VUS(PM2, PP2, PP3, BP1)	VUS (PM2, PP3, PP5)	P (PVS1, PM2, PP3 BP1)
Historia familiar	Ausente padre sano	Presente madre sana	No testeado	No testeado	Presente en padre sano. Ausente madre	No testeado	No testeado

Tabla 8 (cont)

Caso	12	13	14	15 (16	17
Edad al diagnostico (años)	5	8	10	39	7	9
Genero	M	F	M	F	F	F
Deficiencias Hormonales	GH, TSH	GH, ADH (neonatal)	GH, ACTH, TSH,, PRL	GH, ACTH, TSH, LH, FSH	GH, ACTH, TSH	GH
Altura SDS	-6.56	-2.4		-3.9	-3.4	-5.59
MRI	Sin datos	AH: hipoplasia; Tallo: Agenesia; NH: ausente. hipoplasia hemisferio cerebelar derecho	AH: hipoplasia, Tallo: Hipoplasia, NH: Ectopica	AH: hipoplasia, Tallo ausente, NH: ectopica	AH: hipoplasia, Tallo delgado, NH: ectopica	AH: hipoplasia, Tallo: asusente, NH: ectopica
Malformaciones y características asociadas	Depressed nasal bridge, frontal bossing, myopia, micropenis, hypospadias	Miopia, astigmatismo. Diabetes insipida neonatal, retraso madurativo del habla	Hipoglucemia neonatal			Midfacial hypoplasia
Gen	GLI2	GLI2	GLI2	GLI2	GLI2	OTX2
Posición (GRCh37)	2:121747 688G>GGCCATGCCATGGCT	2:121744 178C>T	2:121712970G>A	2:121729564CG>C	2:121747963AG>A	14:57268 779C>G
Transcripto	ENST00000 361492	ENST00000 361492	ENST00000 361492	ENST00000 361492	ENST00000 361492	ENST00000 672264.2
Variante Proteína	c.4207_4220dup ATGGCTGCCATGCC p.Ser1404fs	c.2281C>T p.Leu761Phe	c.607G>A p.Ala203Thr	c.1108delG p.Ala370ProfsTer23	c.4477delG p.Val1493SerfsTer37	c.568G>C p.Ala190Pro
Tipo mutación	Frameshift	Missense	Missense	Frameshift	Frameshit	Missense
Genotipo	Heterozygous	Heterozygous	Heterozygous	Heterocigota	Heterocigota	Heterozygous
dbSNP	-	rs1435272545	rs147044066	-	-	-
Polyphen	-	Benign	Benign	-	-	Benign
SIFT	-	Damaging	Tolerated	-	-	Tolerated
Mutation Taster	-	Disease_causing	Polymorphism	-	-	Disease_causing
CADD	26.9	31	0.130283	-	-	24.5
REVEL	-	0.472		-	-	0.498
Frec. alélica gnomad	Absent	0.000004013 (0 hom)	0.0007547 (1 hom)	Ausente	Ausente	Absent
Score ACMG	P (PVS1, PM2, PP3)	VUS (BP1, PM2, PP3)	LB (PM1, BS2, BP4)	LP (PVS1, PM2)	P (PVS1, PM2, PP3)	VUS (PM2, PP2, PP3)
Historia familiar	Presente madre baja estatura	Ausente madre sana. Padre no testeado	Padre talla baja	No testeado	Hermano afectado con la variante. Padres variante ausente	No testeado

Tabla 8 (cont)

Caso	18	19	20	21	22	23	
Edad al diagnóstico (años)	13	9	5	9	-	1	
Género	M	F	M	M	M	F	
Deficiencias Hormonales	GH. ACTH, TSH	GH	GH	GH	GH	GH	
Altura SDS		-3,5	-2.9	-3.2	-	-5.01	
MRI	Ah: hipoplasia, Tallo delgado, NH: ectópica	AH: Hipoplasia	AH: Hipoplasia. Tallo delgado	Normal	Normal	AH: hipoplasia. NH: ectópica.	
Malformaciones y características asociadas	Criptocordismo, microcordismo unilateral	-	Obesidad	-	-	Clinodactilia	
Gen	OTX2	GH1	GH1	GH1	GH1	GH1	
Posición (GRCh37)	14:57271054G>A	17:61994697C>T	17:61994697C>T	17:61994697C>T	17:61995822G>A	17:61995761G>A	17:61995743G>A
Transcripto	ENST00000672264.2	ENST00000323322	ENST00000323322	ENST00000323322	ENST00000323322	ENST00000323322	ENST00000323322
Variante (cDNA)	c.125C>T	c.626G>A	c.626G>A	c.626G>A	c.55C>T	c.116C>T	c.134G>A
Proteína	p.Thr42Ile	p.Arg209His	p.Arg209His	p.Arg209His	p.Pro19Ser	p.Ala39Val	p.Arg45His
Tipo de mutación	Missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense
Genotipo	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota
dbSNP		rs137853223	rs137853223	rs137853223	rs376449159	rs151263636	rs71640274
Polyphen		benign	benign	benign	benign	pathogenic	benign
SIFT		damaging	damaging	damaging	tolerated	damaging	tolerated
Mutation Taster	disease_causing	disease_causing	disease_causing	disease_causing	polymorfism	polymorfism	polymorfism
CADD		23.6	23.6	23.6	2.88	2.88	2.42
REVEL							
Frec. alélica gnomad	Ausente	0.00003186 (0 hom)	0.00003186 (0 hom)	0.00003186 (0 hom)	0.0002 (0 hom)	0.0028	0.0001
Score ACMG	LP (PM2 strong, PM6, PP2, PP3)	P (PS3, PS4, PM2, PP2, PP3, PP5)	P (PS3, PS4, PM2, PP2, PP3, PP5)	P (PS3, PS4, PM2, PP2, PP3, PP5)	VUS (PM6, PP2, PP3)	B (BS1, BS2, PM6, PP2, PP3)	VUS (BP4, PM1, PM6, PP2)
Historia Familiar	No testeado	Caso Familiar. Padre y Abuela Afectados	Caso Familiar. Madre Afectada.	No testeado	No testeado	No testeado	No testeado

Tabla 8 (cont)

Caso	24	25	26	27
Edad al diagnóstico (años)	3 meses	1	7	7
Genero	M	M	M	M
Deficiencias Hormonales	GH, ACTH, TSH	GH, TSH	GH, TSH	GH
Altura SDS	-	-2.51	-	-
MRI	AH: hipoplasia	AH:hipoplasia, NH: ectopica	Normal	Normal
Malformaciones características asociadas	y Síndrome de Beckwith	Paladar hundido	-	-
Gen	GHRHR	POU1F1	POU1F1	PROP1
Posición (GRCh37)	7:31003741G>A	3:87322580A>G	3:87313539C>T	5:177421173C>G
Transcripto	ENST00000326139	ENST00000344265	ENST00000344265	ENST00000308304
Variante (cDNA)	c.57+1G>A	c.209T>C	c.416G>A	c.276G>C
Proteína	-	p.Leu70Ser	p.Arg139Gln	p.Gln92His
Tipo de mutación	Splice Donor Variant	Missense	Missense	Missense
Genotipo	Homocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota
dbSNP	rs2302022		rs748457352	rs761347600
Polyphen	-	Benign	Probably damaging	Probably Damaging
SIFT	-	Tolerated	Tolerated	Tolerated
Mutation Taster	disease_causing	Polymorphism	Disease_causing	Disease_causing
CADD	4.7	-		
REVEL	-			
Frecuencia Alélica gnomad	0.00001957 (0 hom)	Ausente	0.00003582 (0 hom)	0.00001193 (0 hom)
Score ACMG	P (PVS1 PM2 PP3 PP5)	VUS (PM2)	VUS (PM1, PM2, PP3)	VUS (PM1,PM2, PP3)
Historia familiar	No testeado	No testeado	No testeado. Padre baja estatura	No testeado

Tabla 8 (cont)

Como se puede observar (Fig.22 y Tabla 8), encontramos variantes en diversos genes, que necesitan ser evaluados en mayor profundidad para poder concluir una relación genotipo-fenotipo, y determinar su posible patogenicidad. En nuestro laboratorio, estamos trabajando en este gran objetivo, y para ello nos hemos seleccionado en la presente tesis un primer grupo de estos genes a evaluar mediante ensayos in-vitro. En particular, analizaremos primero variantes en genes frecuentemente asociados a HC, y luego nos centramos en los factores de transcripción LHX3/4, GLI2 y en la enzima codificada por *PNPLA6*.

Variantes encontradas en nuestra cohorte en los genes LHX3 y LHX4

Se obtuvieron múltiples variantes en los genes *LHX3* y *LHX4*, dos genes importantes en el desarrollo de la hipófisis, como se mencionó en la introducción, incluyendo 3 variantes nóveles en *LHX3* y 3 en *LHX4*. Específicamente estas son LHX3:c.559C>T, p.Pro187Ser que fue encontrada en el paciente 1 diagnosticado con CPHD, y LHX3:c.658C>A, p.Leu220Met que se encontró en dos pacientes (pacientes 2 y 3, Table 8 y Fig. 23), con IGHD o en combinación con hipogonadismo respectivamente. Estas variantes se encuentran en residuos conservados evolutivamente, están predichas como patogénicas, y se encuentran ausentes en bases de datos de población control, sugiriendo que las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones pueden ser perjudiciales a la función proteica. Por otro lado, la variante LHX3:c.301G>A, p.Gly101Ser que se encontró en un paciente con CPHD (paciente 4), a pesar de encontrarse en una posición conservada evolutivamente, se encuentra presente en base de datos poblacionales de sujetos control, aunque en baja frecuencia (Gnomad = 0.000004381).

Como la variante p.Pro187Ser se encuentra en el homeodominio, un dominio bastante estudiado de unión al ADN, se pudo realizar un modelado de la variante sobre estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X (Fig. 23 D). En la figura, se puede observar que la prolina original se encuentra en un bucle hélice-giro-hélice. La configuración especial de la prolina, y su naturaleza de imino-acido, permite que la estructura lineal de aminoácidos realice un quiebre, ayudando a que este giro se genere eficientemente. Al cambiar la prolina por otro aminoácido sin estas características, y que de hecho posee preferencia por estructuras de tipo alfa hélice, en este caso la serina, es de esperar que la estructura se desestabilice y la proteína no pueda unirse de la misma manera al ADN, lo que podría indicar un cierto efecto patogénico.

Las variantes p.Leu220Met y p.Gly101Ser, se encuentran fuera de un dominio y tienen una cierta representación en bases de datos poblacionales respectivamente, por lo que su significancia como causantes de la patología en primera instancia es incierta. La mayoría de los casos reportados en bibliografía con variantes encontradas en *LHX3* se encuentran en homocigosis o heterocigosis compuesta, habiendo sólo 2 casos con variantes heterocigotas identificados en pacientes con CPHD y con fenotipos notablemente más leves que los homocigotas (Jullien et al. 2018). Esto puede sugerir que estas variantes producen un fenotipo leve, o bien, que existen otras variantes en estos pacientes que no logramos identificar con el panel de genes que son las verdaderas causas del fenotipo observado. Estas variantes en *LHX3* serán evaluadas funcionalmente en el capítulo 2 del presente trabajo.

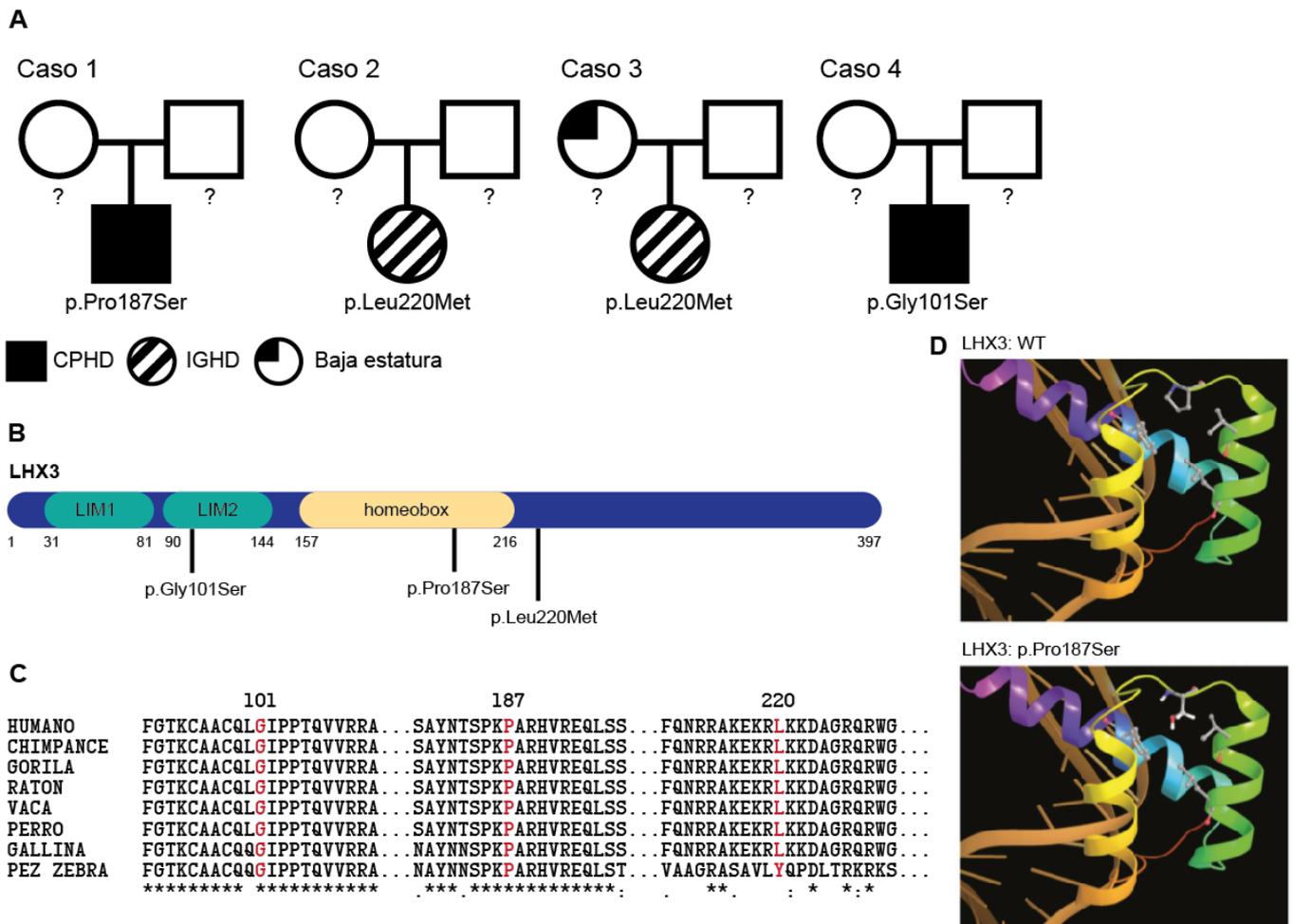


Figura 23: Descripción gráfica de las variantes encontradas en LHX3. A: Familiogramas de los cuatro casos de LHX3. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis. B: Estructura primaria de LHX3 y la posición relativa de las variantes halladas. C: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las variantes. En rojo se indica las posiciones analizadas. D: Estructura cartoon tridimensional de la proteína LHX3 en su forma WT (panel superior) y p.Pro187Ser (panel inferior). Pro187 se encuentra en un bucle helix-turn-helix.

En cuanto a las variantes en *LHX4*, encontramos seis variantes en cinco casos, siendo tres de ellas variantes noveles (Tabla 8 y Fig. 24). El paciente del caso 5 fue diagnosticado con baja estatura a los 2 años de edad y presenta deficiencias en GH, TSH y ACTH, y SOD. Presenta 2 mutaciones en heterocigosis, *LHX4*:c.91G>A, p.Ala31Thr y *LHX4*:c.300G>T, p.Gln100His, en los dominios LIM1 y LIM2 respectivamente, presuponiendo una heterocigosis compuesta. El paciente 6 presenta CPHD involucrando los ejes de somatotropos, lactotropos, tirotropos y corticotropos, y se identificó la variante *LHX4*:c.611G>T, p.Trp204Leu, una variante posiblemente patogénica en el homeodominio. Además es portador de una variante VUS c.895G>A, en *FGFR1*. El paciente 7 tiene deficiencias de GH y TSH y porta una variante VUS *LHX4*:c.251G>A, p.Arg84His en heterocigosis localizada en el dominio LIM1, heredada de la madre sana, además heredó del padre una variante posiblemente benigna en el gen *GLI2* (c.3485A>G, p.Lys1162Arg). Los pacientes 8 y 9, con CPHD y deficiencia de TSH aislada respectivamente, son portadores de variantes en *LHX4* por fuera de los dominios establecidos. El paciente 8 posee la variante *LHX4*:c.812A>G, p.Asn271Ser en combinación con una variante en

heterocigosis en el gen *PROP1* (c.551C>A, p.Ala184Asp), ambas ausentes en bases de datos poblacionales. La paciente 9 tiene la variante en heterocigosis LHX4:c.886G>A, p.Gly296Arg, también ausente en bases de datos.

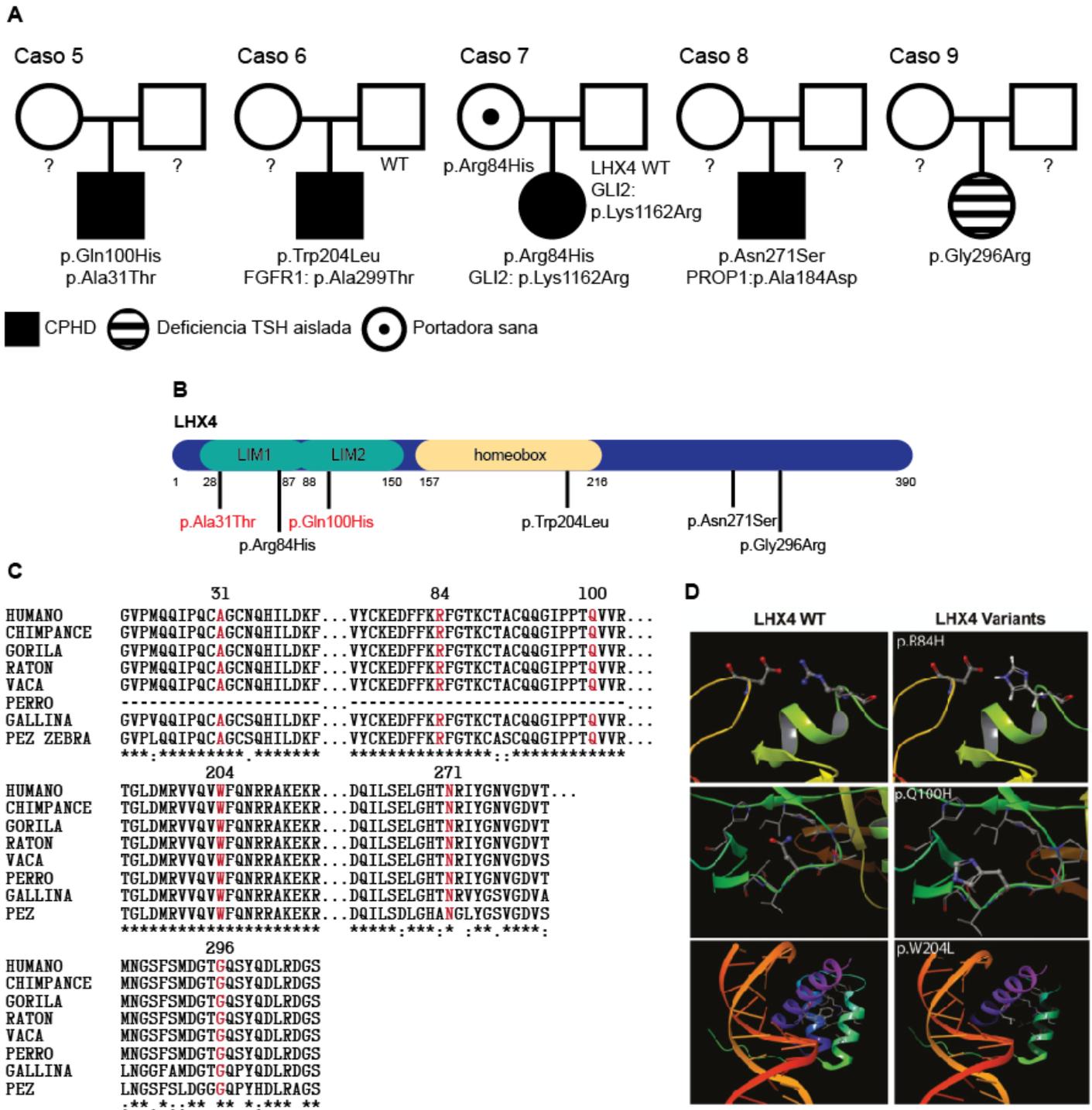


Figura 24: Descripción gráfica de las variantes encontradas en LHX4. A: Familiogramas de los cinco casos de LHX4. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis, WT indica que no se detectó la mutación. B: Estructura primaria de LHX4 y la posición relativa de las variantes halladas. En rojo variantes encontradas en un mismo individuo. C: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las variantes. En rojo se indica las posiciones analizadas. D: Estructura cartoon tridimensional de la proteína LHX4 en su forma WT (izquierda) y las variantes (derecha).

Los análisis de alineamiento múltiple de secuencia en LHX4 indican que las 6 variantes se encuentran altamente conservadas en la escala evolutiva (Fig. 24-C), por lo que podrían tener una papel importante en la función proteica. Por otro lado, el modelado de los dominios LIM y homeodominio, sugieren que las variantes p.Arg84His y p.Gln100His podrían afectar interacciones entre aminoácidos, afectando a la conformación de LHX4. Por último, el triptófano de la posición 204 es parte de un núcleo hidrofóbico que es esencial para la formación de la hélice del homeodominio, y la leucina de menor tamaño en esta posición podría desestabilizar la estructura (Fig 24-D). Algunas de estas variantes serán puestas a prueba en cuanto a su funcionalidad en el siguiente capítulo.

Variantes génicas encontradas en *HESX1*

La secuenciación y análisis también permitió identificar dos variantes de relevancia en el gen *HESX1* (Table 8, Fig Suplementaria 3-A). En la literatura se encuentran numerosas variantes homocigotas (Carvalho et al. 2003) (Fang et al. 2016) y heterocigotas (Thomas 2001) (Brickman et al. 2001) en el gen *HESX1* reportadas en casos con IGHD, CPHD y, ocasionalmente, SOD y malformaciones de la hipófisis. La paciente del caso 10 presenta IGHD, algunas malformaciones faciales y la variante heterocigota *HESX1*:c.77T>C,p.Ile26Thr. Esta misma variante fue previamente reportada por Carvalho et al. 2003 en homocigosis en una paciente con hipopituitarismo progresivo, hija de padres consanguíneos. La variante se encuentra en el dominio represor de homología con Engrailed (eh1), conllevando una disminución en el reclutamiento del *mammalian Groucho homolog/Transducin-like enhancer of split-1* (Gro/TLE1) y entonces una pérdida parcial de la represión de este factor de transcripción. En el mismo trabajo identificaron la presencia de la variante en los padres sanos y en un control poblacional de Brasil, lo que indicaría un efecto fundador de la variante en Latinoamérica, a pesar de no encontrarse en la base de datos GnomAD. El encontrar la variante en heterocigosis en nuestra paciente podría indicar dos posibilidades respecto a la etiología de la enfermedad, siendo la primera que la variante en heterocigosis brinda un fenotipo leve y una penetrancia incompleta, que podría explicar sólo la presencia de IGHD en la paciente, pero no así las malformaciones craneales. Alternativamente, y podría ser la más probable, existiría otra mutación en *HESX1* que no pudimos detectar mediante nuestro enfoque que completaría el genotipo en una heterocigosis compuesta. De todos modos, la cobertura de este gen por smMIPs fue de mayor a 100X en las regiones exónicas.

Por otro lado, el paciente 11 también presenta IGHD y una variante heterocigota en *HESX1* (c.349C>T, p.Gln117*), aunque en este caso se trata de una variante de codón stop prematuro. Esta variante se clasifica como patogénica según los criterios de ACMG, ya que produce el truncamiento de la proteína de manera similar a otras mutaciones nonsense previamente reportadas como patogénicas p.Leu103* y p.Arg109* (Fang et al. 2016), lo que podría explicar el fenotipo del paciente.

Variantes génicas encontradas en *GLI2*

El gen *GLI2* es el principal factor de transcripción de la vía de señalización de SHH, esencial para la proliferación de las células de la hipófisis durante su desarrollo. Los pacientes con mutaciones en *GLI2* presentan un gran rango de fenotipos clínicos, desde CPHD hasta holoprosencefalia, con severos defectos en el desarrollo de la línea media craneal. En este estudio identificamos cinco variantes de relevancia en este gen, dos de tipo missense y 3 de tipo frameshift, en cinco familias no relacionadas (Fig. 25).

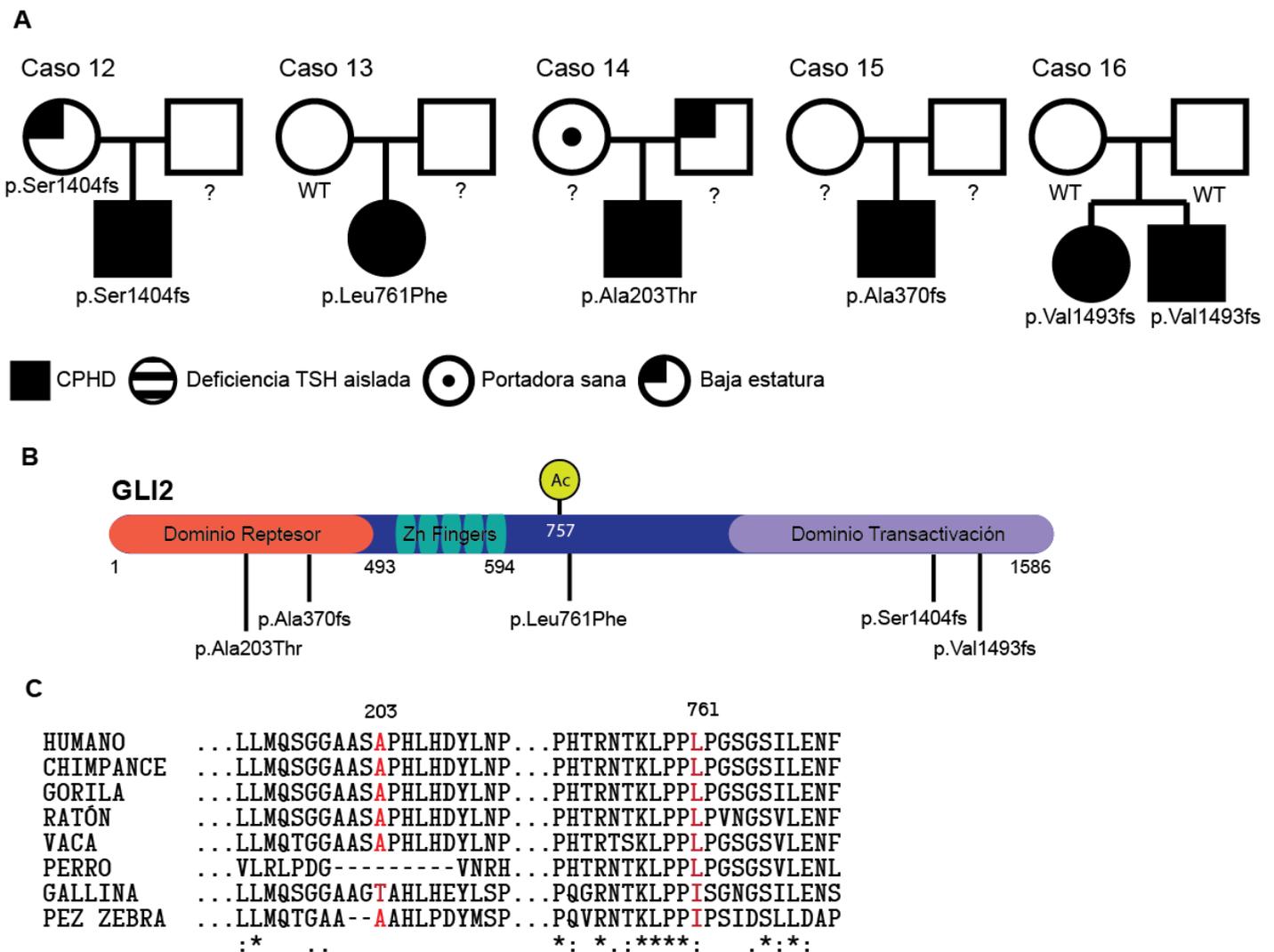


Figura 25: Descripción gráfica de las variantes encontradas en GLI2. A: Familiogramas de los cinco casos de GLI2. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis, WT indica que no se detectó la mutación. B: Estructura primaria de GLI2 y la posición relativa de las variantes halladas.. C: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las variantes missense. En rojo se indica las posiciones analizadas.

El paciente del caso 12 presenta deficiencias de GH y TSH, portando una duplicación de 14 nucleótidos en la porción 3' de *GLI2* (c.4207_4220dupATGGCTGCCATGCC), que resulta en un corrimiento del marco de lectura (p.Ser1404fsTer131). La madre, que presenta baja estatura (SDS–2.5) sin CPHD confirmado, porta la misma duplicación, que se predice patogénica y se encuentra ausente en base de datos de individuos sanos. El paciente 13 por su parte, presentó al momento del nacimiento deficiencia de ADH y posteriormente desarrolló deficiencia de GH. Es heterocigota para la mutación *missense* *GLI2*:c.2281C>T, p.Leu761Phe, que se localiza entre los dominios de unión al ADN y de transactivación. Fue previamente reportada en un paciente con displasia septo óptica y CPHD (Paulo et al. 2014) y su madre sana, y en otro individuo con paladar hendido aislado (Simioni et al. 2014), lo que podría indicar una penetrancia incompleta y/o expresividad variable. La variante se encuentra cercana al sitio de acetilación de la lisina 757, por lo que hipotetizamos que la misma podría modificar el sitio de reconocimiento por la acetil-transferasa p300, un paso de

control crítico para la regulación de la vía de señalización de SHH. Esta hipótesis será evaluada en el capítulo 2 de este trabajo. El caso 14 corresponde a un paciente con la variante heterocigota *GLI2:c.607G>A*, p.Ala203Thr y CPHD e hipoglucemia neonatal. La variante se encuentra dentro del dominio represor de *GLI2*, y ha sido reportada previamente en un paciente brasileño con CPHD (França et al. 2013). Sin embargo la variante también se encuentra presente en bases de datos de individuos sanos, llegando incluso a haber un individuo homocigota, por lo que la patogenicidad de la variante es dudosa. Por último, los pacientes 15 y 16 presentan CPHD y las variantes de corrimiento de marco de lectura *GLI2:c.1108delG*, p.Ala370ProfsTer23 y *GLI2:c.4477delG*, p.Val1493SerfsTer37, respectivamente. Ambas variantes no se encuentran en bases de datos poblacionales y eliminan el dominio de transactivación de manera completa o parcial, por lo que se presuponen patogénicas. Particularmente, el paciente 16 presenta un hermano menor con CPHD y la misma variante, no encontrándose la misma en los padres sanos.

Con estos resultados, se puede observar el alto grado de discrepancia a la hora de asignar una clasificación ACMG a cada variante en *GLI2*. A raíz de este problema, decidimos por un lado testear variantes puntuales en *GLI2*, así como también plantear la generación de un catálogo que contempla numerosas variantes asociándolas con una actividad funcional (ver capítulo 2 y 3).

Variantes en el gen *OTX2*

Pacientes con mutaciones de novo ó heterocigotas en *OTX2* manifiestan fenotipos variables con penetrancia incompleta, usualmente involucrando defectos oculares junto a IGHD, CPHD ó hipogonadismo hipogonadotrófico (HH). Encontramos en nuestra cohorte dos variantes nóveles de tipo missense en este gen: *OTX2:c.568G>C*, p.Ala190Pro ubicada en el dominio de interacción proteína-proteína OTX en el paciente 17 con IGHD, y *OTX2:c.125C>T*, p.Thr42Ile en el homeodominio N-terminal en el paciente 18 con CPHD (Fig. Suplementaria 2-D). Ninguno de los dos pacientes parecen tener fenotipos oculares, aunque el paciente 17 presenta anomalías craneofaciales. Las mutaciones se encuentran en sitios conservados de la proteína, y se encuentran ausentes en bases de datos poblacionales. Estas variantes son suficientes para explicar el fenotipo de hipopituitarismo en ambos casos.

Variantes en *GH1*

El gen *GH1* es el gen codificante para la hormona de crecimiento, producida por los somatotropos. Mutaciones patogénicas en este gen producen deficiencia aislada de hormona de crecimiento, con herencia tanto autosómica recesiva (tipo 1) como dominante (tipo 2). En nuestra cohorte encontramos cuatro variantes de tipo missense, en cinco casos no relacionados (Fig. 26). La variante *GH1:c.626G>A*, p.Arg209His fue identificada en 2 casos familiares (19 y 20), y un caso presuntamente esporádico (21). Esta mutación, anteriormente denominada o referida como p.Arg183His (Miyata et al. 1997) (Gertner et al. 1998) (Deladoëy et al. 2001) (Marino et al. 2003) fue reportada previamente en varios familiogramas y se demostró que interfiere de manera dominante en la secreción de la hormona por parte de los somatotropos. La aparición de esta variante en numerosos casos no relacionados podría indicar un efecto fundador regional.

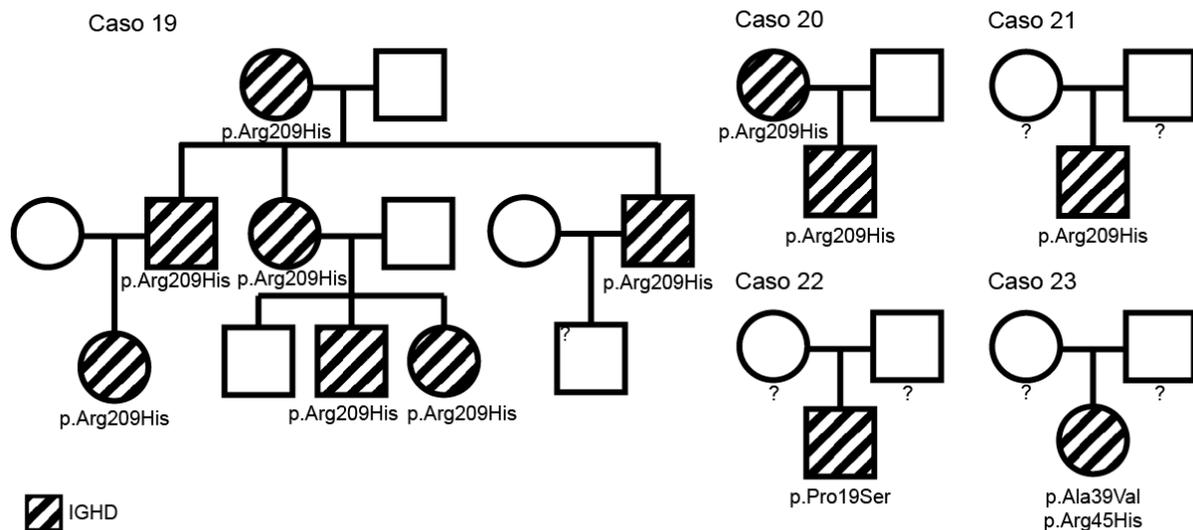


Figura 26: Familiogramas de los cinco casos con variantes en GH1. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis.

Por otro lado, se detectaron las variantes *GH1:c.55C>T*, p.Pro19Ser en el caso 22, y *GH1:c.116C>T*, p.Ala39Val y *GH1:c.134G>A*, p.Arg45His de manera conjunta en cis en el caso 23. La variante p.Pro19Ser se encuentra en los primeros aminoácidos de la hormona, que corresponden al péptido señal para su translocación al retículo endoplasmático, y posterior secreción. Según el programa bioinformático SignalP-6.0 (<https://dtu.biolib.com/SignalP-6>) para determinación de péptido señal, la variante no afectaría el reconocimiento de esta secuencia. Por el otro lado, las variantes p.Ala39Val y p.Arg45His en el paciente 23 se encuentran en el mismo alelo, por lo que descartamos una heterocigosis compuesta que explique una herencia autosómica recesiva, aunque se desconoce si puede existir algún efecto deletéreo al encontrarse ambas variantes a la vez. La información para determinar la patogenicidad en estos casos no resulta por lo tanto concluyente.

Un caso con variante homocigota en *GHRHR*

El paciente del caso 24 corresponde a un infante masculino que originalmente se lo diagnosticó con Síndrome de Beckwith-Withermann (SBW), un trastorno genético asociado a imprinting dado por alteraciones en el cromosoma 11p. En el período neonatal, el paciente presentó hipoglucemia, hepatomegalia y nefromegalia, macroglosia, fontanela anterior amplia y hernia umbilical, concordante con SBW. Sin embargo, este síndrome se caracteriza además por un sobrecrecimiento físico durante los primeros años de vida (Lapunzina Badía et al. 2006), síntoma que sin embargo este paciente no presentaba, ya que tenía una deficiencia de GH en sangre. En nuestro análisis genómico por panel de MIPS, detectamos una variante en homocigosis en el sitio donador de splicing del gen *GHRHR* (Receptor de la hormona liberadora de hormona de crecimiento) c.57+1G>A. Esta variante se encuentra ampliamente estudiada como causa de deficiencia aislada de GH (Salvatori et al. 1999) (Aguar-Oliveira et al. 1999) (Gondo et al. 2001), particularmente en pacientes de Brasil, por lo que podría indicar un efecto fundador en nuestra región.

Variantes en los factores de transcripción *POU1F1* y *PROP1*

Los genes *POU1F1* y *PROP1* codifican para factores de transcripción tempranos del desarrollo de la hipófisis. Identificamos en este trabajo dos variantes para ambos genes en cuatro casos distintos (Fig. 27). El paciente del caso 25 presenta la variante novel *POU1F1*:c.209T>C,p.Leu70Ser y deficiencias de GH y TSH, ubicado en el dominio de transactivación en la isoforma beta (que ya no posee actividad de activación transcripcional). El paciente del caso 26 también presenta deficiencia combinada de GH y TSH y la variante *POU1F1*:c.416G>A, p.Arg139Gln, ubicada en el dominio específico POU. La posición 139 se encuentra altamente conservada en la escala evolutiva. Esta variante en particular se encuentra muy poco representada en bases de datos poblacionales (GnomAD: 0.00003582). Por falta de mayor evidencia, ambas variantes permanecen como VUS.

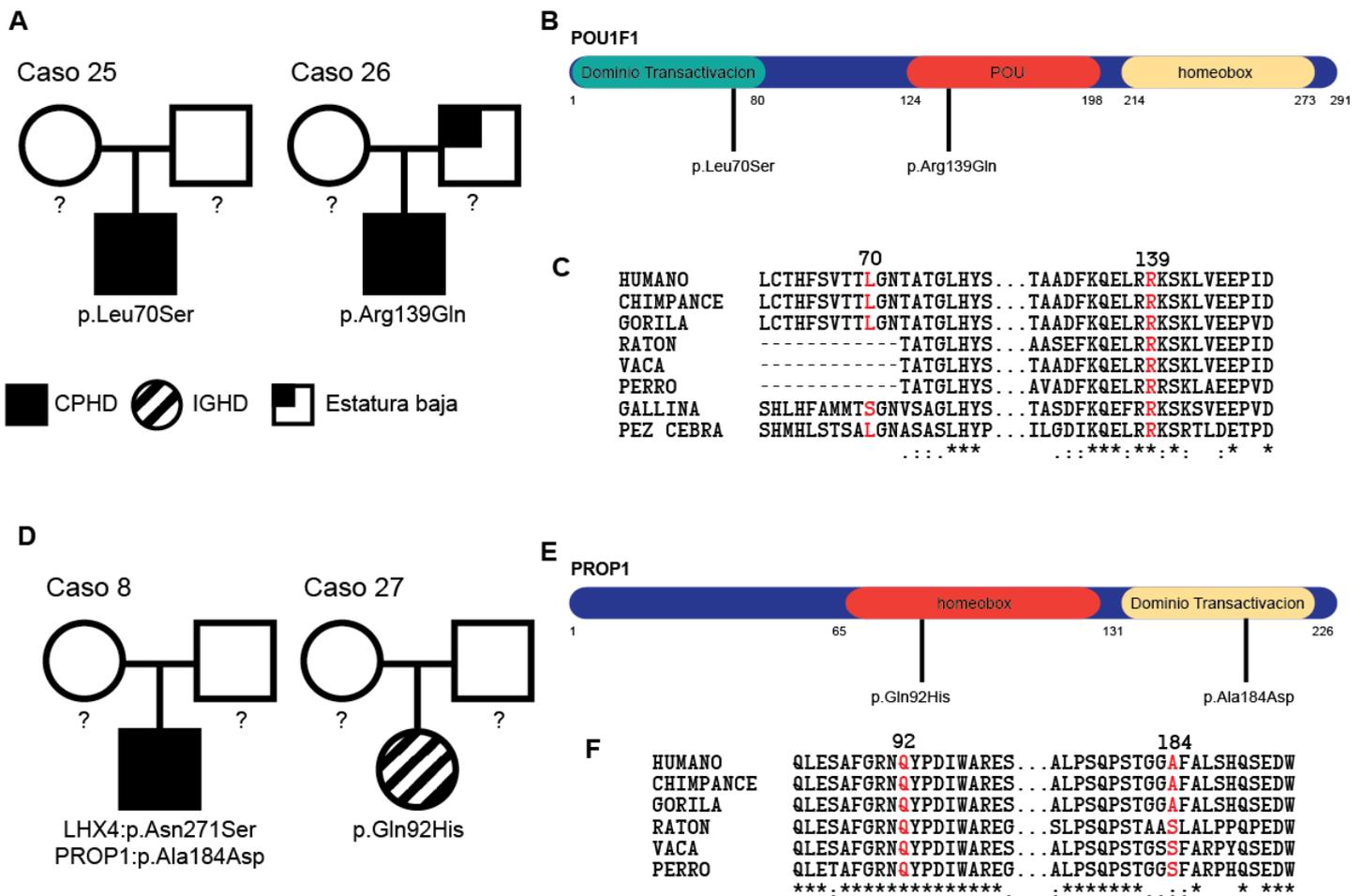


Figura 27: Descripción gráfica de las variantes encontradas en *POU1F1* y *PROP1*. A: Familiogramas de los dos casos con variantes en *POU1F1*. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis. B: Estructura primaria de *POU1F1* y la posición relativa de las variantes halladas. C: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las variantes missense para *POU1F1*. En rojo se indican las posiciones analizadas. D: Familiogramas de los dos casos con variantes en *PROP1*. E: Estructura primaria de *PROP1* y la posición relativa de las variantes halladas. F: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las variantes missense para *PROP1*. En rojo se indican las posiciones analizadas.

El paciente 8, previamente mencionado, posee la variante en *PROP1*:c.551C>A, p.Ala184Asp junto a una variante en LHX4. Esta variante se encuentra en una posición medianamente conservada en cuanto a propiedades bioquímicas del aminoácido se refiere, y no se encuentra en bases de datos poblacionales. El paciente del caso 27 por su lado tiene deficiencia aislada de GH y la variante en heterocigosis *PROP1*:c.276G>C, p.Gln92His, ubicada en una posición conservada evolutivamente y con baja frecuencia en bases de datos poblacionales (GnomAD: 0.00001193), en ausencia de individuos sanos homocigotas. Ambas variantes son promisorias a la hora de establecer su potencial patogenicidad, sin embargo, es importante notar que la deficiencia de hormonas hipofisarias debida a mutaciones en *PROP1* suele aparecer con un patrón de herencia autosómico recesivo, por lo que la presencia de estas variantes por sí solas no podría explicar el fenotipo observado.

Secuenciación de Exoma y Genoma completo

Para complementar el análisis de secuenciación por smMIPS, se decidió continuar el análisis de dos casos, un caso familiar y un caso esporádico mediante secuenciación de exoma ó genoma completo en trío (esto es secuenciando al probando y ambos progenitores).

Variante de splicing en *POU1F1*, autosómica dominante

El paciente 28 corresponde a un paciente masculino de 4 años de edad al diagnóstico con deficiencia aislada de GH, al parecer heredada del padre con el mismo fenotipo. La madre no presenta características clínicas compatibles con IGHD. En el análisis de smMIPS general no se encontraron variantes patogénicas asociadas, por lo que se decidió, en conjunto con los médicos responsables, expandir la búsqueda al exoma completo.

En una primera ronda de análisis, se buscaron variantes compartidas con el padre, pero no así con la madre, que presenten baja frecuencia poblacional con impacto moderado ó alto en la estructura proteica. De 25011 variantes identificadas en el paciente, el filtro arrojó 215 variantes que cumplían con estos requisitos. De este grupo de variantes, 2 se encontraban en el gen *XYLT1*, incluido en nuestro panel de genes relacionados a hipopituitarismo. Las variantes son c.2497G>T, p.(Ala833Ser), de significado incierto y, c.1742C>T, p.Pro581Leu, reportada previamente como posiblemente benigna. El gen *XYLT1*, se asocia a estatura pequeña por malformación de los huesos y cartílagos (osteocondrodisplasia), con anomalías faciales, con un patrón de herencia autosómico recesivo. Al ser ambas variantes heredadas del padre, se pueden asumir que se encuentran en cis, lo que no se condice con el patrón de herencia reportado para la enfermedad.

Haciendo una búsqueda más amplia, se decidió eliminar el filtro de impacto moderado ó alto en la secuencia proteica, centrándonos principalmente en variantes nóveles (no previamente reportadas). En este caso los filtros arrojaron 37 variantes compartidas entre padre y probando, 2 de las cuales se encontraban presentes en los genes asociados a hipopituitarismo. Una de las variantes era la previamente identificada en el gen *XYLT1*, mientras que la segunda fue una variante en *POU1F1*, uno de los principales genes involucrados en el desarrollo de la hipófisis, asociado tanto a CPHD como IGHD, como se mencionó previamente. La variante, *POU1F1*: c.150T>G, p.Ser50=, es una variante

sinónima en el exón 2, ausente en bases de datos poblacionales, y ubicada dentro de los 26 aminoácidos que se agregan dentro del dominio de transactivación en la isoforma beta, pero ausente en la isoforma alfa, con actividad promotora de la transcripción (Introducción General y Capítulo 3). Siendo un cambio sinónimo, hipotetizamos que la variante podría jugar un rol en el desbalance del splicing, aumentando la proporción de la isoforma beta represora, y que esto conduzca al efecto patogénico en el probando y padre.

Para sumar evidencia a esta hipótesis, utilizamos el programa informático SpliceAI, que evalúa para una mutación dada, si ésta podría cambiar el patrón de splicing, generando sitios crípticos aceptores o donores de splicing, ó alternativamente provocando la pérdida de estos. Sus valores van de 0 a 1, considerándose como un efecto relevante en caso de que sea mayor a 0,1. Para esta variante en POU1F1, el programa predice un efecto de ganancia de sitio aceptor (AG = 0.33) 7 nucleótidos río abajo del cambio, locus donde coincide el sitio aceptor “canónico” de la isoforma beta, por lo que contribuye a nuestra hipótesis de que la variante otorga un mayor peso al sitio aceptor de la isoforma beta por sobre el canónico para la isoforma alfa, desbalanceando el splicing alternativo del gen. Esta hipótesis será evaluada experimentalmente en el Capítulo 3.

Variantes de splicing y missense en *PNPLA6*, autosómica recesiva

El caso 29 corresponde a una paciente de 10 años a la edad del diagnóstico, se presenta con CPHD, retraso madurativo y retinitis pigmentosa. Originalmente fue incluida en el análisis por smMIPs, del cual surgió como única variante de interés, una variante no sinónima en el gen *PNPLA6* (c.3343A>C, p.Thr1115Pro, Fig. Suplementaria 4). El gen *PNPLA6* codifica para una enzima que cataliza la deesterificación de la fosfatidilcolina de membrana en ácidos grasos y glicerofosfolina (Synofzik et al. 2013). La variante poseía potencial, al ser una variante novel no previamente reportada en el dominio catalítico de la proteína, y el fenotipo de la paciente siendo coincidente con el Síndrome de Oliver-McFarlane (OMIM: #275400) causado por mutaciones en *PNPLA6*. Este síndrome se caracteriza por tricomegalia, atrofia corioretinal, deficiencia de hormonas GH, TSH y gonadotrofinas, llevando en algunos casos a retraso intelectual y baja estatura (Hufnagel et al. 2014), existiendo también casos con retinitis pigmentosa (Haimi and Gershoni-Baruch 2005). Sin embargo, todos los reportes hasta el momento de este síndrome coincidían en un modelo de herencia autosómico recesivo, ya sea en homocigosis ó heterocigosis compuesta, y esta variante fue detectada en heterocigosis, en aparente ausencia de otra variante que complete el genotipo y pueda explicar el fenotipo observado.

Se decidió entonces realizar una secuenciación de genoma completo del trío, probando y progenitores, para determinar si existía la presencia de otras variantes en *PNPLA6* dentro y fuera de la región codificante que pudieran no haber sido detectadas en la secuenciación por panel de smMIPS ó, en su defecto, variantes en otros genes que también pudieran explicar el fenotipo.

Al priorizar variantes de baja frecuencia ó noveles en el gen *PNPLA6*, se encontraron dos variantes. La variante previamente detectada missense heredada de la madre y, una variante intrónica, a 44 nucleótidos del sitio canónico aceptor de splicing del exón 30, heredada del padre. La variante, c.3428-44G>A, tiene una frecuencia poblacional de 0.00001317 en GnomAD, sin reportes de individuos sanos homocigotas y el programa SpliceAI predice una ganancia de sitio aceptor críptico intrónico. Este nuevo sitio aceptor agregaría 14 aminoácidos dentro del marco de lectura de *PNPLA6* (Fig. 28), interrumpiendo

el dominio catalítico de la proteína. Las dos variantes, podrían explicar el fenotipo de la paciente tanto por las manifestaciones clínicas asociadas al gen PNPLA6 coincidentes a la paciente, como por la segregación autosómica recesiva en heterocigosis compuesta al cada padre ser portador de una de estas dos variantes. Los ensayos funcionales relacionados a estas variantes en PNPLA6 están descritos en el siguiente capítulo de este trabajo de tesis.

Caso	28 (WES)		29 (WGS)
Edad al diagnóstico (años)	4		10
Genero	M		F
Deficiencias Hormonales	GH		GH, TSH, LH, FSH
Altura SDS	-		-1,6
MRI	AH: hipoplasia, NH: normal		Normal
Malformaciones y características asociadas	-		Retinitis pigmentosa, retraso madurativo
Gen	POU1F1	PNPLA6	PNPLA6
Posición	3:87322639A>C (GRCh37)	19:7557200A>C (GRCh38)	19:7558806G>A (GRCh38)
Transcripto	NM_001122757	NM_001166111	NM_001166111
Variante (cDNA)	c.150T>G	c.3343A>C	c.3428-44G>A
Proteína	p.Ser50Ser	p.Thr1115Pro	p.Pro1142_Ala1143ins14
Tipo de mutación	Sinónima	Missense	Sitio Aceptor Splicing Nuevo
Genotipo	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota
dbSNP	-	-	rs755079200
Polyphen	-	-	-
SIFT	-	Damaging	-
Mutation Taster	-	disease_causing	-
CADD	11.47	3.919	3.970
REVEL	-	-	-
Splice AI	AG:0.33	-	AG=0.98
Frecuencia Alélica gnomad	0	0	0.00001317 (0 hom)
Score ACMG	LB (VUS ajustado a segregación)	VUS	VUS
Historia familiar	Padre IGHD con la variante Madre sana variante ausente.	Presente en la madre sana Ausente en padre	Presente en el padre sano Ausente en madre

Tabla 9: Descripción clínica de pacientes a los cuales se les realizó secuenciación de exoma completo (WES) ó genoma completo (WGS) y variantes relevantes halladas. F: femenino, M: masculino, GH: hormona de crecimiento, TSH: hormona estimulante de la tiroides, ACTH: hormona adrenocorticotrópica, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante, AH: Adenohipófisis, NH: neurohipófisis, SOD: displasia septo-óptica, P: patogénica, LP: posiblemente patogénica, VUS: variante significado incierto, LB: posiblemente benigna, AG: ganancia de aceptor de splicing. IGHD: deficiencia aislada de hormona de crecimiento

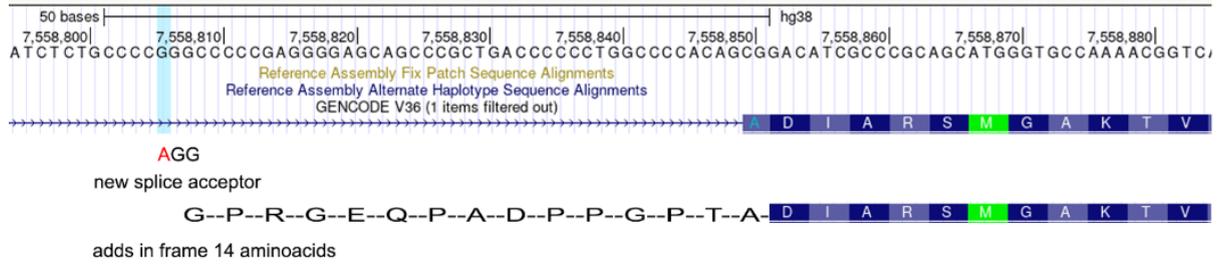


Figura 28: La transversión G>A produce un nuevo sitio de splicing intrónico, agrega 14 codones en marco de lectura en la secuencia de PNPLA6.

Capítulo 2

Ensayos funcionales

2A - Materiales y Métodos

Cultivo Celular

NIH/3T3-CG: Las células fueron crecidas en medio DMEM alta glucosa (Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino, 2mM L-Glutamina, 1X Aminoácidos No Esenciales (Gibco), 1nM Piruvato (Gibco), 1X PenStrep (Gibco). La incubación se realizó en estufas de cultivo a 37°C y 4% CO₂.

HEK 293T: Las células fueron crecidas en medio DMEM alta glucosa (Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino (Dipia), 2mM L-Glutamina (Gibco), 1mM Piruvato (Gibco), 1X PenStrep (Gibco) ó 1X Anti-anti (Gibco). La incubación se realizó en estufas de cultivo a 37°C y 4% CO₂.

Generación de una línea reportera de GLI2

Para generar una línea reportera de la función de GLI2 partimos de la línea celular NIH/3T3-CG, amablemente otorgada por el Dr. Rajat Rohatgi ([Pusapati et al. 2018](#)). Esta línea celular posee una construcción establemente transfectada con un 8 sitios de unión a GLI repetido 8 veces (5'-GACCACCCA-3') río arriba del gen reportero GFP, y resistencias a Blasticidina y Zeocina. La línea 3T3 al ser cultivada al 100% de confluencia y hambreada (medio sin suero), desarrolla por célula un único cilio, mediante el cual puede sensor SHH y por ende expresar GFP.

KO de Gli2 endógeno en la línea celular NIH/3T3 mediante Crispr-Cas9:

1. Clonado de plásmido

Se utilizó el backbone pSpCas9(BB)-2A-Puro(px459)V2.0, regalo de Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988 ; <http://n2t.net/addgene:62988> ; RRID:Addgene_62988) ([Ran et al. 2013](#)). El plásmido cuenta con el cDNA de Cas9 bajo el promotor de -actina de gallina, un cassette de resistencia a Puomicina y un sitio diseñado como *scaffold* para incorporar el sgrRNA (*single guide RNA*) bajo el promotor U6 (Fig. 29).

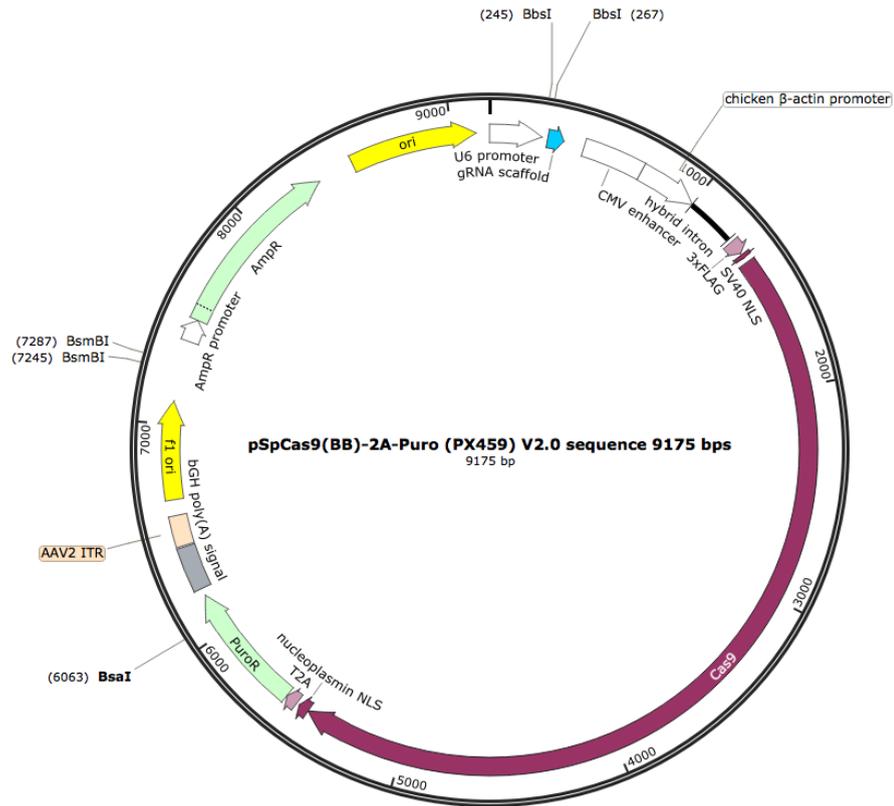


Figura 29: Plásmido de expresión del sistema Crispr-Cas9. Contiene el cDNA de la proteína Cas9 bajo expresión del promotor fuerte CMV y expresión de resistencia a Puromicina. Con la enzima de restricción BbsI se puede abrir el plásmido para insertar un aligonucleótido con la secuencia de interés para formar el sgRNA, el cual será transcrito bajo la influencia del promotor U6.

Se utilizaron sgRNA previamente publicados con blancos en 3 exones distintos del gen Gli2 de ratón y se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos indicados en la Tabla 10.

Oligonucleótido	Secuencia	Referencia
Gli2ex11_sgRNA_F	caccgGAACCGCACTCACTCCAATG	(Doench JG et al. 2016)
Gli2ex11_sgRNA_R	aaacCATTGGAGTGAGTGCGGTTc	
Gli2ex5_sgRNA_F	caccgGGGGACCTTCTAATGCAGAG	(Doench JG et al. 2016)
Gli2ex5_sgRNA_R	aaacCTCTGCATTAGAAGGTCCCCc	
Gli2ex2_sgRNA_F	caccgGCCGCAGCTGTAGCCGCCCA	(Hsiao CJ et al. 2018)
Gli2ex2_sgRNA_R	aaacTGGGCGGCTACAGCTGCGGCc	

Tabla 10: single guide RNA utilizados para knock-out de Gli2.

Los oligos forward y reverse se fosforilaron en el extremo 5' y se hibridaron. Para ello se combinó en un tubo de pcr 6,5 ul de agua, 1 ul del oligo forward (100 uM), 1 ul de oligo reverse (100 uM), 1ul de bufer 10X T4 ligasa con ATP y 0,5 ul de T4 PNK (NEB). La reacción se llevó a 37°C por 30 min, luego a 95°C por 5 minutos, y lentamente se bajó la temperatura a 25°C a una razón de 5°C/min.

Paralelamente, se digirió 1ug del backbone del plásmido SpCas9(BB)-2A-Puro (px459)V2.0 con la enzima BbsI y se purificó por gel el plásmido linealizado (QIAquick Gel Extraction Kit).

Se ligó entonces el plásmido con los oligos utilizando 50 ng de plásmido linealizado, 1,25 ul de oligos fosforilados y alineados (dilución 1:250), 5 ul 2X Quikligation Buffer (NEB), 1ul Quick Ligase (NEB), y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se transformaron bacterias competentes con 5 ul de la reacción anterior y se purificó plásmido de las colonias resultantes. Se chequeó la correcta inserción de los oligos por secuenciación Sanger.

2. Curva de muerte por Puromicina

Se sembró una placa multiwell de 24 pocillos con 1×10^5 células 3T3 en cada uno y se dejó crecer hasta confluencia en medio apropiado. A partir de ese momento, se le agregó al medio de cultivo usual Puromicina a diferentes concentraciones, de 0 a 5ug/ml, en intervalos de 0.5ug/ml. Se utilizaron 2 pocillos por concentración para estimar la curva. Durante 6 días se mantuvieron las condiciones de cultivo, reemplazando el medio con la respectiva cantidad de puromicina cada 2 días. Se estimó la confluencia de células durante cada día de duración del tratamiento.

3. Transfección

Se plaquearon 1×10^5 células por pocillo en una placa *multiwell* de 24 pocillos. Al día siguiente, se transfectó por duplicado cada construcción del plásmido de Cas9 con las distintas guías con blanco en los 3 exones, cada uno por duplicado. La mezcla de transfección fue la siguiente: 100ul de medio Opti-MEM (Gibco), 1ug de plásmido purificado y 3ul ViaFect™ Transfection Reagent (Promega). Se incubó la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente y luego se incorporó 50ul de la mezcla a cada pocillo.

Al día siguiente, uno de los pocillos transfectados para cada plásmido se incubó en medio completo y 2ug/mL de puromicina durante 2 días. El otro well, se dejó intacto como control.

Se permitió al pool de células transfectadas y seleccionadas con puromicina, dividirse en medio completo sin selección posteriormente para los siguientes pasos.

4. Análisis por TIDE

La extracción de ADN genómico de las células NIH/3T3-GC original y pool de células transfectadas con las construcciones de Crispr-Cas9 y seleccionadas con Puromicina, se realizó a partir de 2 millones de células usando el kit Quiagen Puregene Cell Kit, según indicaciones del fabricante.

Se amplificaron las regiones a secuenciar (exones 2, 5 y 11 de Gli2) con los siguientes primers indicados en la Tabla 11.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm
Gli2ex11_F	GCATGCACGCTCCTGTATTT	59.27°C
Gli2ex11_R	TGTGGGCAGACCATTCCCTA	60.55°C
Gli2ex5_F	GACAGTAGATTCTGATGGCTCCT	59.36°C
Gli2ex5_R	CTGCATCCCGCTACCCTAGT	61.32°C
Gli2ex2_F	AAGCAGACCCGTCGTTTCTC	60.32°C
Gli2ex2_R	TTACAGCCAGCAGGCATTGG	60.97°C

Tabla 11: Primers para amplificación de exones de Gli2 a partir de ADN genómico de células murinas.

Para amplificar los exones 2 y 5 de Gli2 se mezcló 12,2 ul de agua, 5 ul GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 4ul mezcla de dNTP (2,5mM c/u), 1,25 ul de cada primer (10 uM), 0,2 ul GoTaq® DNA Polimerasa (5u/μl), y la amplificación se realizó con un programa de 2min a 95°C, 30 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C, 1 min a 72°C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. La amplificación del exón 11 se realizó de manera similar, agregando 5% de DMSO a la muestra y reduciendo el tiempo de extensión a 30 segundos. Se corroboró la correcta amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,2%*m/v*.

Luego de la amplificación, los fragmentos de los exones 2, 5 y 11 de Gli2 fueron purificados mediante PCR Purification Kit (QIAGEN) y secuenciados por tecnología de Sanger utilizando respectivamente ambos primer forward y reverse de cada amplicón.

El patrón de picos de cada electroferograma obtenido fue analizado con la herramienta TIDE (Tracking of Indels by Decomposition ([Brinkman et al. 2018](#))), que compara la secuencia de ADN original y del ADN de las células que fueron procesadas por Crispr-Cas9, para estimar la eficiencia de generación de indels en la región.

5. Obtención de clones individuales

Cada pool de células transfectadas con una construcción de Crispr-Cas9 con blanco en uno de los exones de Gli2, fue disgregado con tripsina y se contabilizaron las células en cámara de Newbawer. Se realizaron diluciones seriadas al límite para conseguir tener aproximadamente 1 célula cada 50 ul de medio total. Luego, se sembró para cada pool, una placa de 96 wells con 50 ul de la dilución límite. Se incubaron las placas durante 5/7 días a 37°C y se observó al microscopio la presencia de colonias individuales en cada pocillo. Se descartaron pocillos con cero o más de una colonia.

Los clones individuales fueron luego transferidos a una placa de 24 pocillos para seguir permitiendo su expansión. Se seleccionaron posteriormente clones con

sensibilidad a puromicina (células sin integración estable del plásmido de Crispr-Cas9).

6. Secuenciación

Se replicó cada clon obtenido en placas de 96 pocillos y se las dejó crecer hasta confluencia. Se retiró el medio y se agregó 100 ul de PBS a cada pocillo y 20 ul de QuickExtract DNA solution (Lucigen). Se mezcló por pipeteo y se transfirieron 20ul del lisado a una placa *multiwell* de PCR. Se mecló por vortex por 15 segundos y se incubó en una termocicladora a 65°C por 15 minutos. Se repitió la mezcla por vortex y se realizó una segunda incubación a 68°C por 15 minutos, seguida de una incubación a 98°C por 10 minutos.

Posterior a la extracción, se utilizó 1ul del lisado para amplificar las regiones de los exones 2, 5 y 11 de Gli2 según se indicó en el punto 4.

Los amplicones fueron secuenciados en un equipo MiSeq (Illumina). Las lecturas luego fueron mapeadas frente al genoma de referencia de Ratón (mm9) y se revisaron los archivos BAM obtenidos con el programa IGV para determinar la presencia de mutaciones en las regiones indicadas.

Activación de la vía SHH en células y NIH/3T3-CG y NIH/3T3-CG Gli2 KO:

Las células fueron incubadas en placas multiwell de 24 pocillos hasta llegar a 100% de confluencia. Generalmente esto se logra luego a las 24 hs en caso de sembrar 1×10^5 células por pocillo o en 48hs si se siembran 4×10^4 células. En ese momento, el medio fue retirado y las células se lavaron una vez con PBS estéril y posteriormente fueron incubadas en medio OPTI-MEM (Gibco) sin complementar por 24 hs. Durante esta incubación para activar la vía SHH se le agregó al medio SAG (Agonista de Smo, CAS 364590-63-6) a una concentración final de 200mM. Al final de la incubación en medio pobre, se retiró el medio, se lavó cada pocillo con PBS esteril y se procedió con alguno de los siguientes ensayos:

1. Estimación de la expresión de GFP

Las células fueron disgregadas con 100ul de tripsina 1X por pocillo e incubadas a 37°C por 1 minuto. Se inhibió la acción de la tripsina agregando a cada pocillo 100 ul de medio completo y se resuspendieron las células por pipeteo. Cada pocillo fue trasladado a un tubo de microcentrifuga de 1,5ml y las células fueron centrifugadas a 2000g por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en PBS complementado con DAPI (2ul DAPI cada 250 ul PBS) y transferidas a un tubo de citometría.

Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Bio-Rad ZE5 #2 Cell Analyzer. Se cuantificaron aproximadamente 10000 eventos por tubo. Se descartaron los eventos positivos para DAPI (células muertas) y se cuantificó los niveles de fluorescencia verde por GFP.

Los datos fueron analizados en FlowJo versión 10. Se tomó la fluorescencia de GFP en células en ausencia de SAG como la fluorescencia basal (negativo) y se creó un umbral poligonal para generar un *gate* de células GFP positivas (Fig. 30 - B).

La activación de GFP se cuantificó como:

$$\text{Activación} = \text{FluorescenciaMediaGFP}_{\text{Gate GFP}^+} * \% \text{Células}_{\text{GateGFP}^+}$$

Donde GateGFP+ indica la subpoblación de células que entraron en el cuadrante GFP positive indicado en la Fig. 30.

2. Extracción de ARN para qPCR

Se obtuvo ARN total del cultivo celular utilizando RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Thermofisher), según indicado por el fabricante. Se midió la concentración de ARN por absorbancia a 260nm en un equipo Nanodrop.

a. Obtención de cDNA

Se utilizó el kit SuperScript™ II (Invitrogen) para la obtención de la primer hebra de cDNA. Para ello se mezcló 500ng de ARN en un volumen total de 10µl, 1µl de Oligo(dT)12-18 (500 µg/mL) y 1 µL dNTP Mix (10 mM c/u). Se calentó la muestra a 65°C por 5 minutos para desnaturalizar estructuras secundarias del ARN y rápidamente se enfrió en hielo. Luego de un spin a los tubos, se agregó 4ul de 5X First-Strand Buffer y 2 ul de DTT 0,1 M. Se incubaron los tubos a 42°C por 2 minutos y se agregó luego 1ul (200 unidades) de SuperScript™ II RT y se mezcló suavemente por pipeteo. Se incubó la reacción a 42°C por 50 min y se inactivó luego a 70°C por 15 min.

b. Evaluación de expresión de Gli2 y Gli1

Se midió la expresión de los transcritos endógenos de Gli1 y Gli2 mediante sondas TaqMan Mm00494654_m1 y Mm01293117_m1 respectivamente. Se utilizó como control de carga el gen housekeeping Hprt (Taqman Mm03024075_m1).

La reacción por tubo se realizó mezclando 10ul de Taqman Universal PCR MasterMix (ThermoFisher 4304437), 8 ul de agua, 1ul de sonda correspondiente y 1ul de la reacción de cDNA.

El Ct se midió por triplicado para cada muestra en un equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, con umbrales automáticos para cada gen. Se calculó luego el ddCt respecto a la expresión de Hprt y la condición sin tratar.

Detección de splicing alternativo en cDNA de pacientes

Para confirmar el efecto de ganancia de sitio aceptor de splicing de la variante c.3428-44G>A en *PNPLA6*, se obtuvo ARN a partir de sangre periférica de la probando y de sus padres, y se sintetizó la primer hebra de cDNA como se detalló en los párrafos anteriores. A partir del cDNA se realizó una PCR con primers complementarios a los exones 29 y 31 de *PNPLA6* (Tabla 14), utilizando una Pfu Polimera (PBL) y el protocolo 98°C 2min, {98°C 30seg, 60°C 30 seg, 68°C 30 seg}x35, 68°C x 5 min. Los productos de amplificación resultantes fueron analizados en un gel de agarosa 1,5%.

	Secuencia	Longitud	Tm
PNPLA6_ex29fw	CACCTACTCATGGATGGCGG	20	60.25
PNPLA6_ex31rv	GCCGGTCTGTGAGCATTTC	20	59.83

Tabla 12: Primers para PCR del ARNm de PNPLA6, regiones flanqueantes a la mutación intrónica de ganancia de sitio aceptor de splicing.

METODOLOGÍA GENERAL:

Plásmidos:

Se utilizaron los siguientes plásmidos en los experimentos descritos en el capítulo 2:

- pCS2-MT GLI2 FL: plásmido de expresión de la versión *full-length* de GLI2, con 6 repeticiones el *tag* MYC en el extremo N-terminal donado por Erich Roessler (Addgene plasmid # 17648 ; <http://n2t.net/addgene:17648> ; RRID:Addgene_17648) (Roessler et al., 2005)
- pSG5-HA-p300: Plásmido de expresión de la acetil transferasa p300 con tag HA, donado por Elizabeth Wilson (Addgene plasmid # 89094 ; <http://n2t.net/addgene:89094> ; RRID:Addgene_89094) (Askew et al., 2010)
- pCI flag PCAF: Plásmido de expresión de la acetil transferasa pCAF con tag Flag, donado por Yoshihiro Nakatani (Addgene plasmid # 8941 ; <http://n2t.net/addgene:8941> ; RRID:Addgene_8941)
- pGL3b-8XGliBS:EGFP: Plásmido reportero con 8 sitios de unión a Gli río arriba de eGFP, donado por James Chen (Addgene plasmid # 84602 ; <http://n2t.net/addgene:84602> ; RRID:Addgene_84602) (Hyman et al., 2009)
- Los cDNA de Wild type de *LHX3a* humano y *LHX4* cDNAs humano fueron clonados dentro del vector de expresión pcDNA3.1/myc-His6 (Invitrogen).
- Los vectores reporteros de LHX3 y LHX4 se obtuvieron amplificando las regiones 5' proximal de los promotores del gen humano GH (-2446 to +20; +1 indica el sitio de inicio de transcripción) y del gen humano α GSU (-548 to -1) mediante PCR (Tabla 12), utilizando ADN de sujetos control y primers conteniendo los sitios de restricción para las enzimas KpnI y HindIII (Tabla 12) y clonandolos en el plasmido pGL3-luc (Promega), con el reportero Luciferasa de luciérnaga (Firefly).

Primer	Secuencia
α GSU Fw	5'-GGGGTACCCAGAGCTGTGCAGGTTTTAGGG-3'
α GSU Rv	5'-CCCAAGCTTGGGGGGCTTTTTGCAGGATGTGT-3'
GH1 Fw	5'-GGGGTACCCCGGTCAGTGTGGAAGTGCAT-3'
GH1 Rv:	5'-CCCAAGCTTGGGAGGACCCTGAGTGGTTCGG-3'

Table 13: Primers utilizados para amplificar las regiones promotoras de α GSU y GH1

Transformación de bacterias y preparación de plásmidos:

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α químico ó electrocompetentes según lo siguientes protocolos:

- Quimiocompetentes: Se descongelaron las bacterias en hielo durante 30 minutos. Se agregó 1 a 5 μ l de plásmido a transformar y se incubó en hielo otros 30 minutos. Se realizó un shock de calor a las bacterias a 42°C por 45 segundos y se transfirieron nuevamente a hielo durante 5 minutos. Se agregó luego 950 μ l de medio LB sin antibióticos y se incubaron para recuperación a 37°C por 40 minutos. Las células luego fueron centrifugadas a 2kxg por 3 minutos, se descartó el sobrenadante por inversión. Se resuspendieron las bacterias en el líquido remanente y se utilizó dicho volumen para sembrar una placa de LB agar con antibiótico correspondiente (Ampicilina 50 μ g/ml)
- Electrocompetentes: Se descongelaron las bacterias en hielo durante 30 minutos. Se agregó 1 a 2 μ l de plásmido a transformar y 10 μ l de Glicerol 10% a cada tubo. Se transfirieron las bacterias a una cubeta esteril Gene Pulser (BioRad) de electrodo de 0.1 cm. Se insertó la cubeta en un electroporador BioRad y se dió un pulso eléctrico de 1.8V por 1 segundo. A las bacterias se le agregó 1ml de medio SOC y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml para incubación a 37°C durante 40-60 min. Se utilizaron 100-200 μ l de la suspensión bacteriana para sembrar una placa de LB agar con antibiótico correspondiente (Ampicilina 50 μ g/ml, Kanamicina 50 μ g/ml)

Las colonias resultantes, luego fueron picadas y amplificadas en medio LB con el antibiótico correspondiente al plásmido utilizado en un volumen apropiado para realizar Miniprep (5ml), Midiprep (25ml) ó Maxiprep (100-250 ml). Se procedió a purificar los plásmidos siguiendo las instrucciones de los kits QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) ó QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Quiagen).

Mutagénesis sitio dirigida

Se mutó el plásmido pCS2-MT GLI2 FL de manera sitio dirigida con los kits comerciales QuikChange II XL (Agilent) para las mutaciones p.A203T y p.L761F y el kit Q5-Site directed mutagenesis kit (NEB) para la mutación p.1404Lfs y los primers detallados en la Tabla 13. Se utilizó el mismo kit para generar las variantes de hLHX3a (Leu220Met and Pro187Ser) y LHX4 (Gln100His, Trp204Leu and Arg84His).

Brevemente, el kit de Agilent utiliza primers que hibridan con la región a mutar y que contienen un mismatch de bases en el medio de su secuencia. Los primers son utilizados para amplificar el plásmido original y al resultado de la pcr se lo trata con la enzima de restricción DpnI, el cual degrada el plásmido WT, pero no así el nuevo plásmido amplificado. El producto final es transformado en bacterias DH5 α como previamente detallado, las cuales se encargan de circularizar el producto de amplificación por recombinación homóloga, obteniendo el plásmido final con la mutación deseada.

Por otro lado, el kit de NEB, utiliza primers que hibridan por fuera del sitio a mutar y contiene las bases que intervienen en la mutación en los extremos 5' de uno o ambos primers. Se realiza la amplificación de la misma manera que anteriormente del plásmido a mutar y luego el producto de amplificación es incubado en una mezcla de kinasa, ligasa y DpnI. La kinasa fosforila los extremos de la amplificación y la ligasa lo circulariza. La DpnI cumple el mismo rol que el kit de Agilent. Los plásmidos mutados son utilizados para transformar bacterias DH5 α .

Luego del paso de transformación, se purificó plásmido de colonias individuales y se secuenció por Sanger para confirmar la presencia de la mutación deseada.

Mutación	Primer	Secuencia	Longitud	Tm
LHX3: p.P187L	P187L_Fw	gtggcgcgccgacttggcgagg	23	79.89°C
	P187L_Rv	cctcgcccaagtggcgcgccac	23	79.89°C
LHX3: p.L220M	L220M_Fw	cggcgtccttctcatccttctccttggc	31	80.31°C
	L220M_Rv	gccaaggagaagaggatgaagaaggacgccg	31	80.31°C
LHX4: p.R84H	R84H_Fw	tgcatttgtgccgaagtgctgaagaagtctcc	35	79.27°C
	R84H_Rv	ggaggacttctcaagcacttcggcacaaaatgca	35	79.27°C
LHX4: p.Q100H	Q100H_Fw	cttgcgaccacatgggtgggggg	25	78.38°C
	Q100H_Rv	cccccaacctatgtggtccgcaag	25	78.38°C
LHX4: p.W204L	W204L_Fw	gagggctgtacaggtttgttcagaacagaagg	35	79.27°C
	W204L_Rv	ccctctgttctgaacaaaacctgtacgacctc	35	79.27°C
GLI2: p.A203T	A203T_Fw	ggagatggggtgtgctggcagcgcc	25	80,02°C
	A203T_Rv	ggcgctgccagcacacctctcc	25	80,02°C
GLI2: p.L761F	L761F_Fw	ccactcccgggaaggaggcagcttg	27	80,13°C
	L761F_Rv	caagctgcctccctcccgggaagtgg	27	80,13°C
GLI2: p.1404Lfs	Gli24207_4220dup_F	ccatgccGTCCAGTCAGGAAACAGCAGAGG	30	69°C
	Gli24207_4220dup_R	cagccatGGCATGGCAGCCATGGCA	25	72°C

Tabla 14: Primers para mutagenesis sitio dirigida del plásmido pCS2-MT GLI2 FL.

Transfección con plásmidos de expresión y ensayos de gen reportero

Los plásmidos de expresión de GLI2, LHX3/4 y reporteros se transfectaron en células NIH3T3-CG Gli2KO ó HEK293T con el reactivo de transfección Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Ensayo de Luciferasa:** Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de 1.5×10^4 células/pocillo. Luego de 24 hs, las células fueron co-transfectadas con 30 ng de los reporteros de luciferasa Firefly bajo los promotores de α GSU humana (blanco de LHX3) ó GH humana (blanco de LHX4), 15 ng de plásmido de expresión de luciferasa de Renilla (pRL-SV40, Promega) y 15 ng de vector vacío pcDNA 3.1 (EV por empty vector), o vectores de expresión LHX3a/LHX4 WT or mutantes por pocillo. Para imitar una condición similar a una heterocigosis, una combinación de 7.5 ng de cada plásmido (EV, WT o mutantes) fue utilizado. A las 48 hs luego de la transfección, los lisados celulares se evaluaron para determinar actividad de luciferasa usando el kit de reactivos Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) en un luminómetro GloMax (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de la luciferasa Firefly fue normalizada con la actividad de la luciferasa Renilla correspondiente a cada pocillo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un nivel.
- **Medición GFP reportero:** Se transfectó 500 ng de plásmido de expresión de GLI2 WT ó mutantes en caso de usarse células NIH/3T3-CG wt ó Gli2 KO, en placas de 24 pocillos, habiendo sembrado el día anterior 50000 células. Para células HEK se sembraron 100000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y al día siguiente se transfectó con 200 ng de plásmido de expresión de GLI2 WT ó p.L761F, 200ng de plásmido de expresión de p300 ó pCAF, y 100ng de plásmido reportero 8xGliBS-GFP. La medición de GFP reportero se realizó como previamente indicado.

Immunoprecipitación y Western Blot

Para los experimentos de inmunoprecipitación, se sembraron 1 millón de células en pocillos de placas de 6 pocillos. Al día siguiente se transfectaron con 3 ug de plásmido de expresión de GLI2 WT ó p.L761F, y 3 ug de plásmido de expresión de p300 ó pCAF.

Luego de 48hs de la transfección de células HEK293T con los plásmidos de expresión de GLI2 y las acetil-transferasas, ó *LHX3/4*, se extrajeron proteínas totales con buffer RIPA (Tris HCl pH 8 50mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%) complementado con 1X inhibidores de proteasas (Thermo Scientific™ Pierce™) y 1mM PMSF (Active Motif) mediante *scrapping* a 0°C. Los lisados fueron centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C y se determinó la concentración proteica por ensayo de Bradford.

Para la inmunoprecipitación, se partió de 500 ug de proteína se le agregó buffer suficiente para llegar a 100 ul y 1.5 ul de anticuerpo anti myc (9B11 - Cell Signalling). Se dejó incubar a 4°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se lavaron 25ul de beads magnéticas conjugadas con proteína G (SureBeads™ Protein G Magnetic Beads, BioRad) dos veces con 300ul de buffer de lisis y se separó el sobrenadante en rack magnético. Se agregó luego la mezcla de proteína con anticuerpo a las beads lavadas y se incubó 1 hora a 4°C en agitación. Se separó el sobrenadante en rack magnético y se lavaron las beads 3 veces con 300 ul de buffer de lisis. Finalmente se recuperó la proteína unida a las beads con 20ul de cracking buffer a 95-100°C por 10 minutos.

Los resultados de la inmunoprecipitación fueron analizados por SDS-PAGE en un gel al 6% de acrilamida y transferencia a membrana de nitrocelulosa. Las proteínas LHX3/4 fueron separadas en un SDS-PAGE al 10%. Luego del bloqueo con 5% de leche descremada en

polvo en PBST (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10mM, K₂HPO₄ 1,8 mM, pH 7,4 y 0,5% Tween 20), se incubaron las membranas con anticuerpo anti myc-tag (9B11 - Cell Signalling) ó anticuerpo anti lisina acetilada (ab190479 - Abcam) a 4°C en agitación toda la noche. Como control de carga para LHX3/4 se utilizó anticuerpo contra GADPH (6C5; sc-32233 Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente se lavó las membranas con PBST y se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes: Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076 (Cell Signaling) ó Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074 (Cell Signaling). Se detectaron las bandas por quimioluminiscencia usando el reactivo Clarity Western ECL Substrate, #1705061 (BioRad). Se obtuvieron las imágenes en un equipo G:Box (Syngene) y se analizaron con el software ImageJ (NIH).

Inmunofluorescencia

Se crecieron células HEK293T sobre cubreobjetos circulares de vidrio y se transfectaron los plásmidos de expresión de LHX3/4 4 o mutantes. Subsecuentemente las células se fijaron y permeabilizaron con metanol frío. Se lavaron las células con PBS con 1%BSA por 30 minutos y se incubaron *overnight* con el anticuerpo primario anti-Myc tag antibody (1/100) a 4°C. Los cubreobjetos fueron incubados con anticuerpo anti-rabbit Alexa 647 (#4414, Cell Signaling). Se llevó a cabo los controles negativos incubando los cubreobjetos correspondientes con PBS 1% BSA en lugar del anticuerpo primario. Los núcleos fueron teñidos con DAPI 2 µg/ml (Sigma Aldrich). Se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio y se tomaron fotos de las células en un microscopio de Olympus DSU IX83 Spinning Disk.

Ensayo de actividad NTE para PNPLA6

El ensayo enzimático para NTE (neuropathy target esterase) se realizó como se describe en [\(Kropp and Richardson 2003\)](#). La actividad de NTE se define como la diferencia en la hidrólisis del fenil-valerato inhibida por paraoxon (inhibe la actividad *background* de esterasas) y, paraoxon + mipafox (inhibe la actividad esterasa de NTE y del *background*). Se mide la absorbancia a 486 nm a tiempo final con lector de microplacas. Se determina la concentración de proteínas NTE por SDS-PAGE y Coomassie. La intensidad de las bandas se convierte a una concentración con una curva estándar de BSA en el mismo gel. La actividad específica de NTE se define como 1 µmol de fenol producido por minuto por miligramo de proteína.

2B -Resultados

1. Análisis funcional de variantes en LHX3 y LHX4

De las tres variantes que identificamos en LHX3, dos variantes n6veles se encontraron en 3 casos no relacionados: c.559C>T, p.Pro187Ser en un paciente y c.658C>A, p.Leu220Met fue encontrada en dos probandos con IGHD como 6nica manifestaci3n 6 en combinaci3n con hipogonadismo.

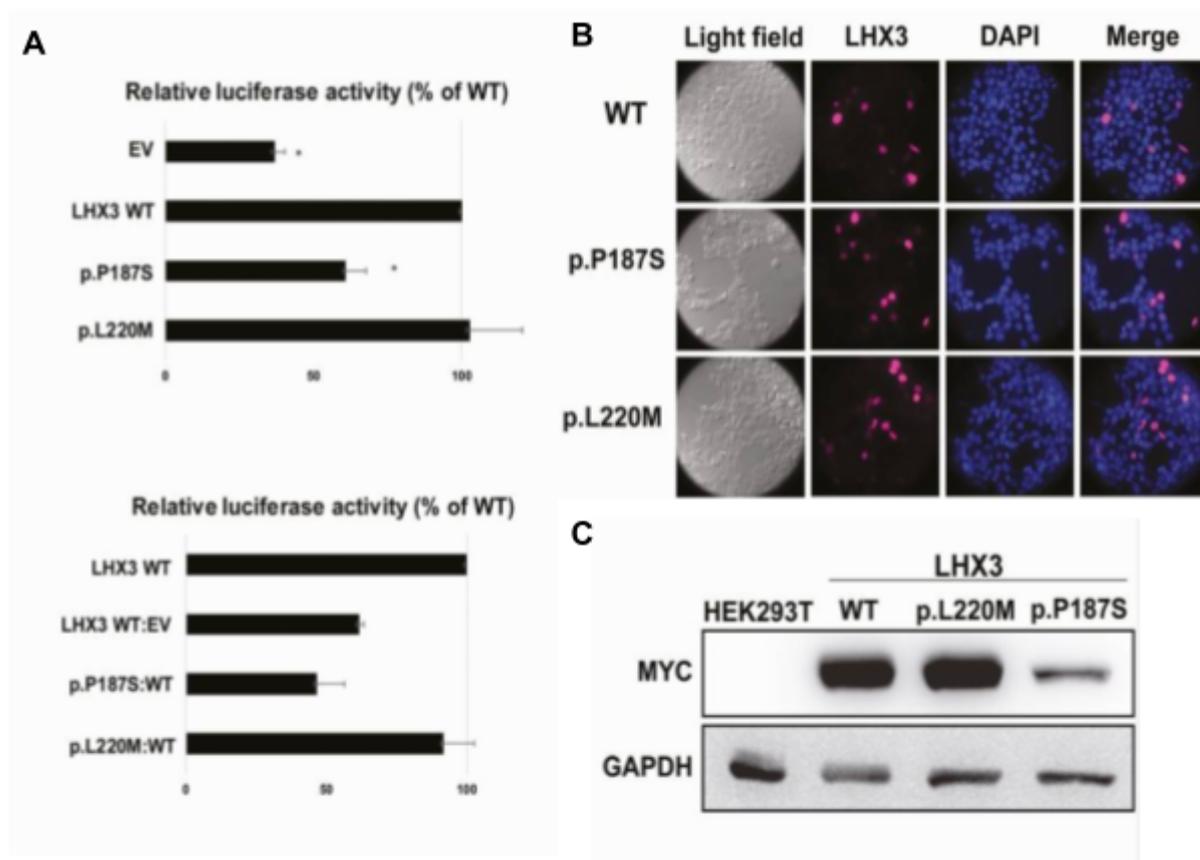


Figura 30: Análisis funcional de variantes identificadas en LHX3. A) Ensayo de reportero de luciferasa Firefly normalizado a luciferasa Renilla y escalados a los niveles de expresi3n de LHX3WT (100%) para cada variante de manera individual (arriba) 6 en combinaci3n equimolar de los plásmidos de las variantes junto a plásmido WT en imitaci3n de un estado heterocigota (abajo). Los resultados se muestran como media + DS (n=3 experimentos en triplicado cada uno); * = p<0.05. B) Inmunofluorescencia para determinar localizaci3n de LHX3 en células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresi3n correspondientes. C) Western Blot representativo de extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresi3n de LHX3 acoplado al tag molecular Myc. GAPDH se utiliz3 como control de carga del experimento.

Se realizaron ensayos funcionales mediante la transfecci3n de las versiones WT o mutantes de LHX3 en combinaci3n con un plásmido reportero de luciferasa r3o abajo del promotor de α GSU. Este ensayo sugiere que la variante p.Pro187Ser es da6ina, mientras que la variante p.Leu220Met podr3a ser tolerada. La variante p.Pro187Ser perjudica de manera significativa la activaci3n del gen reportero de luciferasa, mientras que p.Leu220Met mantiene actividad equiparable al WT en esta construcci3n (Fig. 30-A). La co-transfecci3n de los plásmidos de expresi3n de las variantes junto a plásmido WT excluye efectos dominantes negativos de estas variantes. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, confirmamos que las variantes

de LHX3 traslocan de manera normal al núcleo (Fig. 30-B). A su vez, al analizar los niveles de expresión proteicos de las variantes mediante Western Blot, se observa la presencia de la banda del tamaño correspondiente a LHX3 para WT y variantes (Fig. 30-C), sin embargo, la banda correspondiente a p.Pro187Ser se encontró en múltiples réplicas con una intensidad menor, sugiriendo una estabilidad reducida de la proteína (se transfectaron niveles equivalentes de plásmidos de expresión en todos los casos).

Respecto a las variantes identificadas en LHX4, se testearon funcionalmente las variantes c.300G>T, p.Gln100His; c.611G>T,p.Trp204Leu y c.251G>A,p.Arg84His, todas encontradas en heterocigosis en pacientes no relacionados.

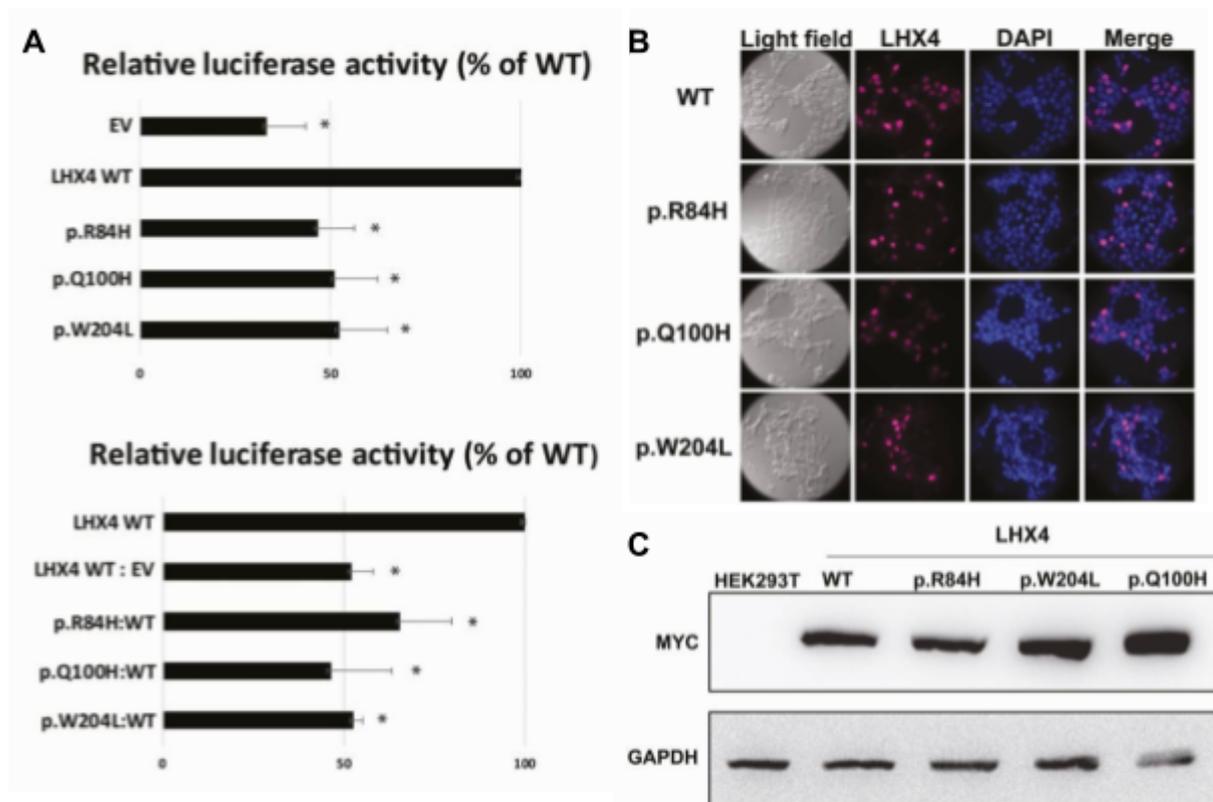


Figura 31: Análisis funcional de variantes identificadas en LHX4. A) Ensayo de reportero de luciferasa Firefly normalizado a luciferasa Renilla y escalados a los niveles de expresión de LHX4WT (100%) para cada variante de manera individual (arriba) ó en combinación equimolar de los plásmidos de las variantes junto a plásmido WT en imitación de un estado heterocigota (abajo). Los resultados se muestran como media + DS (n=3 experimentos en triplicado cada uno); * = p<0.05. B) Inmunofluorescencia para determinar localización de LHX4 en células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión correspondientes. C) Western Blot representativo de extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión de LHX4 acoplado al tag molecular Myc. GAPDH se utilizó como control de carga del experimento.

Testeamos la habilidad de las variantes en LHX4 de activar el promotor proximal del gen *GH1* en una construcción reportera de este promotor río arriba del gen de la luciferasa Firefly. Las tres variantes p.Arg84His, p.Gln100His, and p.Trp204Leu tienen una actividad reducida en respecto a la versión WT en su habilidad de promover la expresión de luciferasa (Fig. 31-A). De manera similar a lo realizado para LHX3, evaluamos la

transactivación del reportero GH1 con una mezcla equimolar de los plásmidos de expresión para LHX4 WT y mutantes. Estos estados símil heterocigosis poseen una actividad media a una dosis doble de LHX4, y equivalente a una dosis de LHX4 WT y una dosis de vector vacío (Fig. 31-A), por lo que excluimos un efecto de dominancia negativa por parte de estas variantes.

Tanto la proteína LHX4 WT como las variantes tienen una localización similar en el núcleo de las células HEK293T (Fig. 31-B). El Western blot a partir de los extractos proteicos de las células transfectadas con los plásmidos de expresión de LHX4 indica que las variantes se expresan en abundancias similares en el tamaño esperado (Fig. 31-C).

En conjunto los resultados indican que las variantes LHX3:p.Pro187Ser, LHX4:p.Gln100His, LHX4:p.Trp204Leu, y LHX4:p.Arg84His son variantes de pérdida de función (LOF loss-of-function) por haploinsuficiencia (LHX3) ó hipomórficas (LHX4), mientras que la variante LHX3:p.Leu220Met es tolerada.

2. Análisis funcional de variantes en GLI2

Generación de la línea celular reportera de GLI2

El gen GLI2 es el principal factor de transcripción activado por la vía de señalización de SHH. En presencia de este morfógeno, GLI2 que se encuentra en su forma represora y secuestrado por SuFu, se libera y viaja al núcleo para ejercer su función. Decidimos establecer una línea celular reportera estable para la actividad de GLI2, para usarla de herramienta tanto para la evaluación individual de variantes en este gen, como para la evaluación masiva de múltiples variantes en un ensayo futuro (Ver Capítulo 3).

Para esto, nos basamos en una línea celular ya establecida, NIH/3T3-CG, generosamente donada por el Dr. Rajat Rohatgi ([Pusapati et al. 2018](#)). Esta línea celular está basada en las NIH/3T3, una línea de fibroblastos murina transfectada con dos construcciones estables: el gen reportero GFP bajo un promotor inducible por los factores de transcripción de la familia GLI y la nucleasa Cas9 bajo un promotor constitutivo (Fig. 32-A). Estas células al crecer hasta confluencia y ser hambreadas (mantenidas en un medio de cultivo sin suero), desarrollan estructuras ciliares donde se depositan las moléculas de transmembrana sensora de SHH, Patch1 y la activadora de la vía de señalización Smo, por lo que se vuelven sensibles a la presencia de SHH en el medio.

Para emular la presencia de SHH en el medio, utilizamos la molécula agonista de Smo "SAG". Para validar la capacidad reportera de estas células, evaluamos la proporción de células GFP positivas por citometría de flujo (Fig. 32-B). Para calibrar el sistema, realizamos una curva de activación con diferentes concentraciones de SAG en el medio de cultivo (Fig. 32-C) a dos niveles de confluencia iniciales del experimento. Vimos que los niveles de activación de GFP son mayores a una confluencia del 100% como era de esperar, y determinamos que para los siguientes experimentos (utilizados para evaluar las variantes) usaríamos una concentración de 200 nM de SAG, que produce una respuesta alta, pero no máxima. Estos parámetros proveen un buen rango dinámico para determinar efectos de mutaciones tanto de pérdida de función como de ganancia de función. Por último, para constatar que efectivamente se está activando la vía de SHH, evaluamos la expresión tanto

de Gli1 como Gli2 en estas células, en presencia o ausencia de SAG, o en presencia de medio completo (Fig. 32-D). Coincidente con bibliografía, la activación de la vía de señalización de SHH no afecta a los niveles de Gli2, pero sí uno de sus blancos principales Gli1 (Regl et al. 2002), lo que da a entender que Gli2 en presencia de SAG se está activando post-traduccionalmente y no transcripcionalmente, participando así en entonces como activador de la expresión de su blanco Gli1.

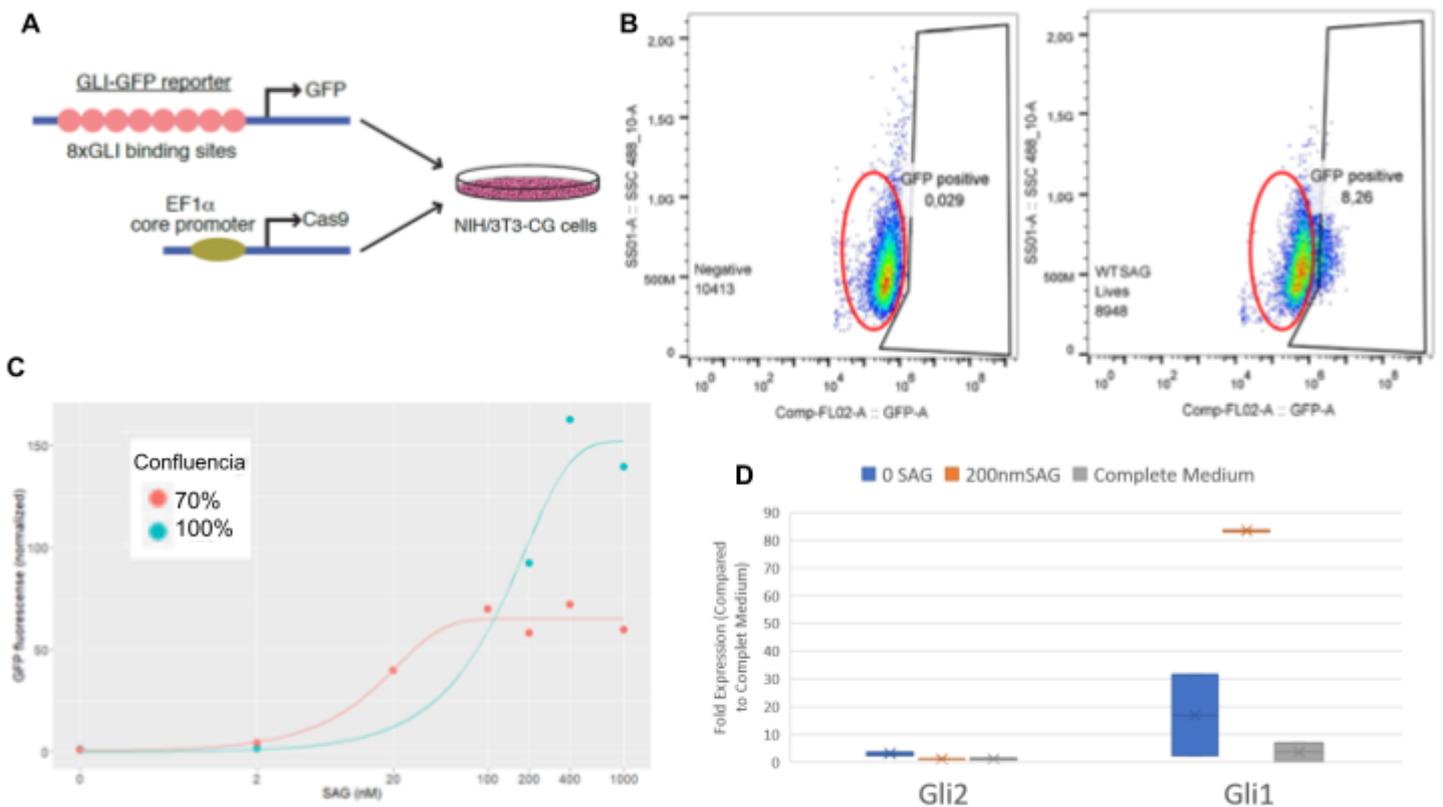


Figura 30: Caracterización de la línea NIH/3T3-CG A) Esquema de las construcciones establemente incorporadas en la línea celular NIH/3T3-CG. Imagen de Pusapati et al. 2018. B) Citometría de flujo para la medición de expresión de GFP (abscisas) en las células NIH/3T3-CG en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de SAG 200nM por 24 horas. El círculo rojo indica la región original donde se encuentran las células en ausencia de SAG, de modo de comparar el movimiento de la nube de puntos en la imagen de la derecha. Se cuantifica el porcentaje de células que entra en el *gate* de células GFP positivas. C) Fluorescencia de GFP en función de la concentración de SAG en el medio sin suero durante 24 horas (n=1 por condición). D) Boxplot de expresión génica por qPCR de los transcritos murinos de Gli2 y Gli1 (n=3).

A continuación, para utilizar a esta línea celular como reportera de la función de GLI2 humano, procedimos a deletar el gen murino endógeno mediante Crispr-Cas9. Para ello, clonamos en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro(px459)V2.0, tres ARN guías bajo el promotor U6, con blanco en los exones 2, 5 y 11 de Gli2. Las células NIH/3T3-CG fueron transfectadas con cada uno de estos plásmidos individualmente y se seleccionaron por dos días aquellas que fueron efectivamente transfectadas con puromicina durante 48 horas, y luego se permitió su crecimiento sin selección.

Al pool de células transfectadas y seleccionadas, se extrajo ADN y se amplificó por PCR la región circundante a cada exón. Estos amplicones primero fueron secuenciados por la técnica de Sanger y, el electroferograma resultante, analizado con la herramienta informática TIDE, que analiza la superposición de los picos para determinar la presencia relativa de pequeñas deleciones o inserciones (Fig. 33).

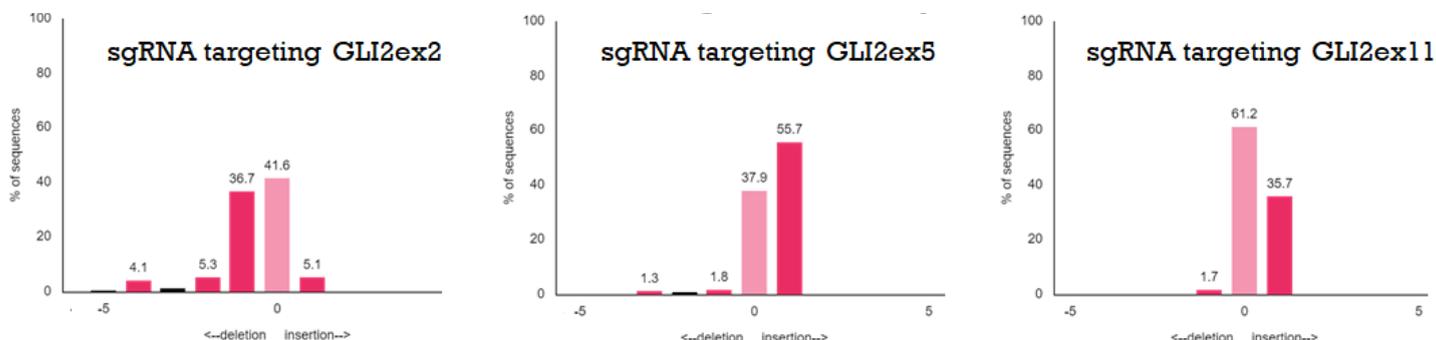


Figura 33: Presencia de deleciones o inserciones relativas en el pool de células NIH3T3-CG transfectadas con distintas guías para deleción por Crispr-Cas9. El 0 indica la presencia relativa de la secuencia WT. Números positivos indican inserciones y números negativos deleciones.

Dado que las tres guías funcionaron en mayor o menor medida, se procedió a obtener múltiples clones individuales de cada pool de células transfectadas por la técnica de dilución límite. Al momento de tener una masa considerable de células de cada clon, se extrajo ADN y se secuenció por NGS la región blanco de cada sonda de Crispr-Cas9. Se descartaron clones con alelos WT y además se descartaron clones con resistencia duradera a Puromicina (luego de 2-3 pasajes se dividieron las células en 2 placas y se trató sólo a una con Puromicina) lo que podría indicar una inserción estable del plásmido de Crispr-Cas9, que luego podría generar nuevos cortes en el cDNA de GLI2 transfectado.

Los clones restantes se testearon en función de su habilidad de activar la expresión de GFP mediante la incorporación exógena de un plásmido de expresión de GLI2 humana (Fig 34-A). En función de los resultados obtenidos, se decidió utilizar para los ensayos funcionales el clon A12 (Fig 34-A y B), el cual fue modificado en el exón 11, que presenta 3 mutaciones de corrimiento de marco de lectura, una deleción de un base, una inserción de una base y una deleción de 4pb en el gen endógeno de Gli2 murino (Fig. 34-D). Este clon no presenta expresión de GFP en condiciones con o sin SAG, pero sí, como es de esperarse, al ser transfectado con hGLI2, en este caso aumentando su activación en 3 órdenes de magnitud (Fig. 34-A y B).

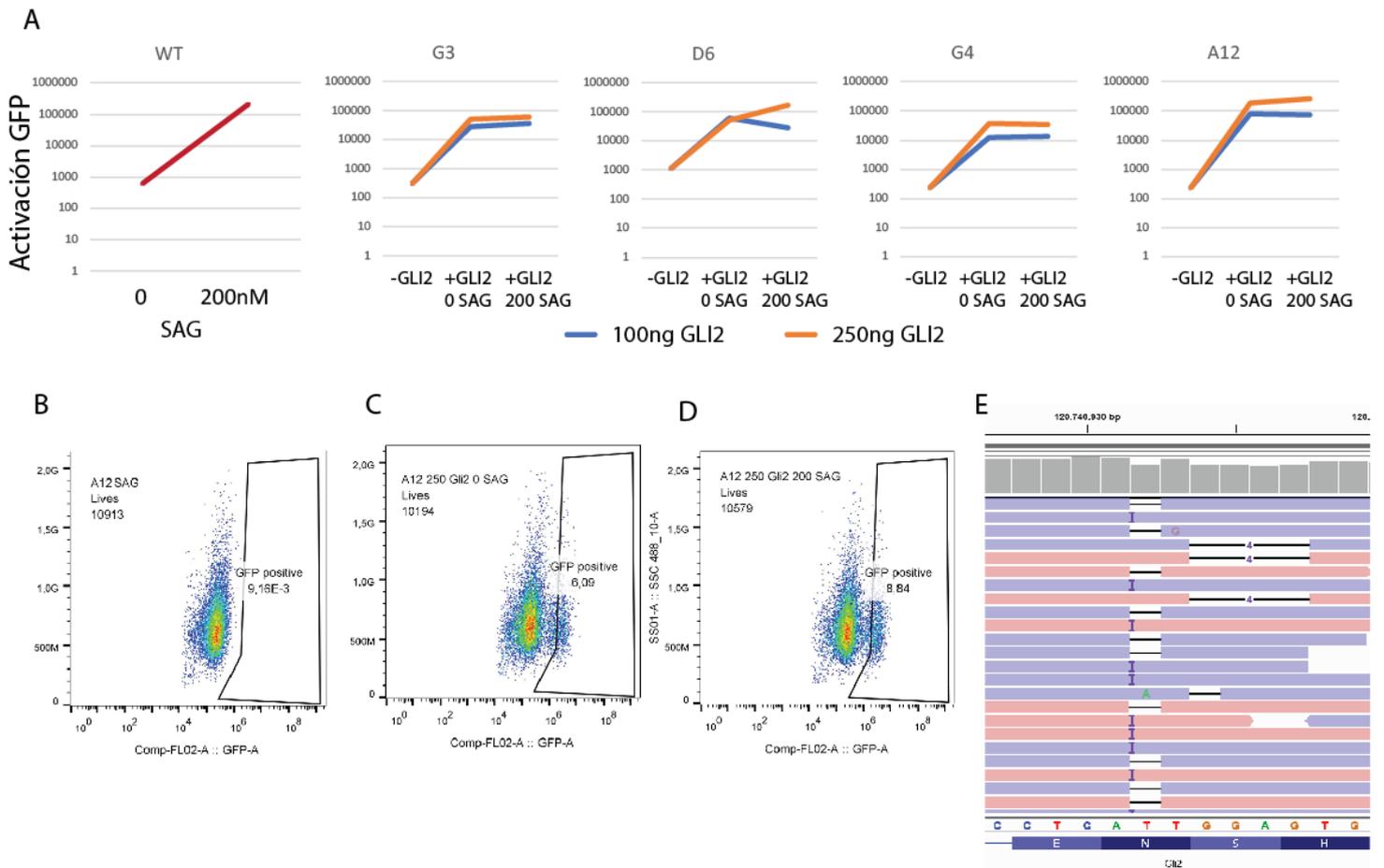


Figura 34: Características de los clones knock-out (KO) para Gli2. A) Activación de GFP de cada clon sensible a Puromicina en ausencia de GLI2 o en presencia de transfección (n=1 por condición). B) Citometría de flujo de las células del clon A12 en presencia de SAG únicamente, C) transfectado con 250ng de expresión de GLI2 sin SAG ó D) transfectadas y con SAG. E) Secuenciación NGS del exón 11 de Gli2 del clon A12, con la inserción p.N540Ffs, y las deleciones p.N540Mfs y p.H538Qfs, sin lecturas WT.

Análisis funcional de variantes en *GLI2* utilizando la línea celular reportera generada

Finalmente, procedimos a utilizar el clon A12 para estudiar el efecto de las variantes en *GLI2* encontradas en los pacientes secuenciados con smMIPS del Capítulo 1, específicamente: c.607G>A; p.Ala203Thr ubicada en el dominio represor, c.2281C>T; p.Leu761Phe ubicada en el centro de la proteína, cercana al sitio de acetilación de *GLI2*, y c.4207_4220dup; p.Ser1404fs ubicada en el sitio de transactivación produciendo un corrimiento en el marco de lectura. Las otras mutaciones de corrimiento de marco de lectura, c.1108delG y c.4477delG, no se testearon, pero se asumen patogénicas. Como control en los ensayos, además utilizamos a una variante que denominaremos mutB, reportada en [Roessler et al. 2003](#), que corresponde a la mutación c.3706C>T; p.Gln1236*, una mutación del codón stop prematuro dominante negativa.

Las células del clon A12 fueron transfectadas con plásmidos de expresión con cada una de las versiones de *GLI2* por separado, se las dejó crecer a confluencia y luego fueron

hambreadas en medio sin suero en presencia o ausencia de SAG por 24 horas. Se midió la activación de GFP para cada una por duplicado y se realizaron tres réplicas experimentales. Los resultados indicaron una pérdida de función completa de las mutaciones de codón stop prematuro (mutB) y de corrimiento de marco de lectura p.Ser1404fs (Fig. 35). Se comprobó que tanto mutB como p.Ser1404fs se expresan por sus plásmidos correspondientes mediante western blot (datos no mostrados). Sin embargo, ambas mutaciones missense, p.L761F y p.A203T producen una activación equivalente a la proteína WT, por lo que en este ensayo no se evidencia su patogenicidad. Algo curioso para agregar es que la presencia de SAG no produce una activación significativamente mayor en ningún caso, lo que sí ocurría con el GLI2 endógeno. Hipotetizamos que la producción de GLI2 por los plásmidos, satura el mecanismo de regulación que inactiva a GLI2, encontrándose siempre GLI2 en su forma activa, por lo que la presencia de SAG no contribuye en este caso a evaluar la función de GLI2.

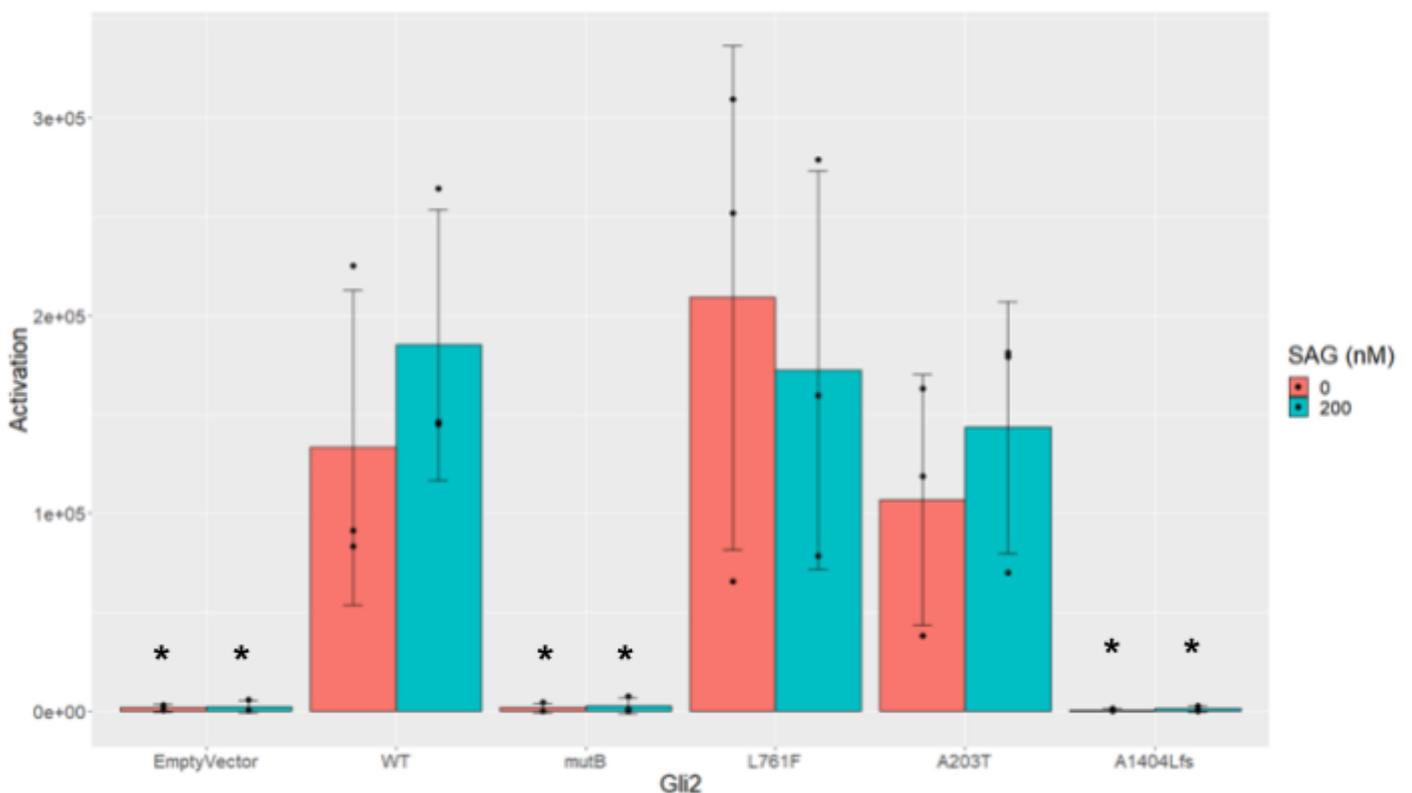


Figura 35: Media de activación de GFP en células NIH/3T3-CG Gli2KO, frente a la transfección de plásmidos de expresión de GLI2 con distintas variantes y en presencia o ausencia de SAG (n=3), *: pvalor < 0.01 respecto a Gli2WT+0SAG, ANOVA.

Siguiendo esta línea de pensamiento, es probable que las mutaciones missense, ya que ambas se encuentran por fuera del dominio de transactivación de la proteína, tengan algún efecto patológico en GLI2 pero sobre su regulación post-transcripcional y que en este ensayo no se está observando al saturar el sistema regulatorio inhibitorio, tanto en ausencia de SHH como SAG.

En un trabajo del 2013, [Coni et al.](#) demostraron que GLI2 es acetilada en la lisina 757 por medio de la acetil-transferasa P300, inhibiendo la capacidad de GLI2 de transactivar sus genes blanco. La mutación p.L761F se encuentra a tan sólo 4 aminoácidos de distancia del sitio de acetilación, por lo que hipotetizamos que esta mutación podría afectar los patrones de acetilación de GLI2, y que ello conlleve a su efecto patogénico.

Con el objetivo de testear esta hipótesis realizamos cotransfecciones en células HEK293T de plásmidos de expresión de GLI2 WT ó p.L761F junto a las acetiltransferasas P300 ó pCAF (una acetiltransferasa que no acetila a GLI2). Luego, realizamos una inmunoprecipitación de GLI2 con anticuerpos contra el tag molecular Myc, y realizamos luego un Western Blot utilizando un anticuerpo contra lisina acetilada (AcK). De este ensayo confirmamos que efectivamente GLI2 es acetilada por P300 y no así por pCAF, como indicaron en su trabajo [Coni et al.](#), y que además vimos que la mutación p.L761F disminuye los niveles de acetilación por P300 (Fig. 36). La gran dispersión de los valores de acetilación en presencia de p300 de GLI2 WT conllevan a una diferencia no del todo significativa (p -valor=0.08), pero detectable (Fig36-B).

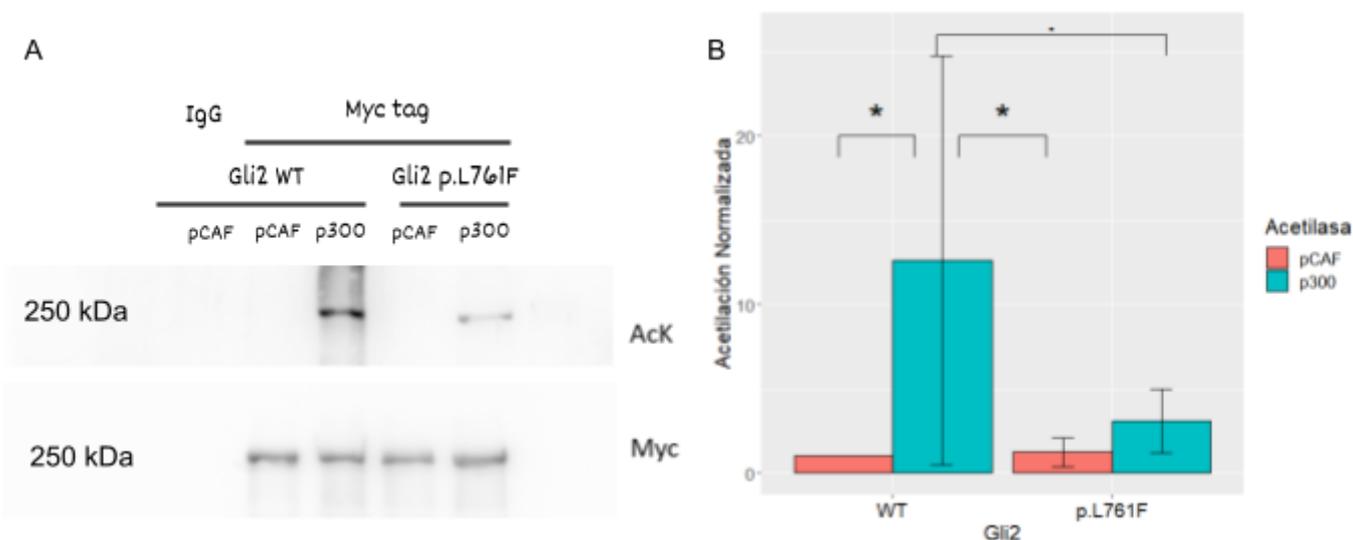


Figura 36 : Ensayo de Inmunoprecipitación de GLI2 seguido de Western Blot para detectar acetilación de lisina. A) Western blot representativo posterior a la inmunoprecipitación de tag Myc (GLI2) y revelado de la membrana con anticuerpo anti-lisina acetilada (AcK) ó Anti-Myc. B) Niveles de acetilación normalizados a Myc total y a la condición WT+pCAF. (n=4) *: p valor < 0.05, .: p valor < 0.1, ANOVA de medidas repetidas.

Por último, para evaluar si esta diferencia en la acetilación de las proteínas GLI2 conlleva a una diferencia en la actividad de las versiones WT y p.L761F, realizamos un ensayo de cotransfección del plásmido de expresión de GLI2 en cada una de sus versiones, junto a la acetiltransferasa pCAF o p300, y un plásmido reportero de la actividad de GLI mediante expresión de GFP en células HEK293T (Fig. 37). Curiosamente, contrario a lo que había reportado [Coni et al.](#), la presencia de p300 aumenta de manera leve la cantidad de GFP y por ende, la actividad de GLI2. La presencia de pCAF o p300 por sí sólo no aumentaba la fluorescencia de GFP a los niveles de GLI2 WT en ninguna réplica (datos no mostrados).

Seguendo estos resultados, parecería que la mutación p.L671F si bien no es acetilada a los niveles de la proteína WT, tiene una actividad comparable a la proteína WT tanto en presencia de p300 como en su ausencia, por lo que nuevamente a partir de estos experimentos no podemos establecer la patogenicidad de esta variante.

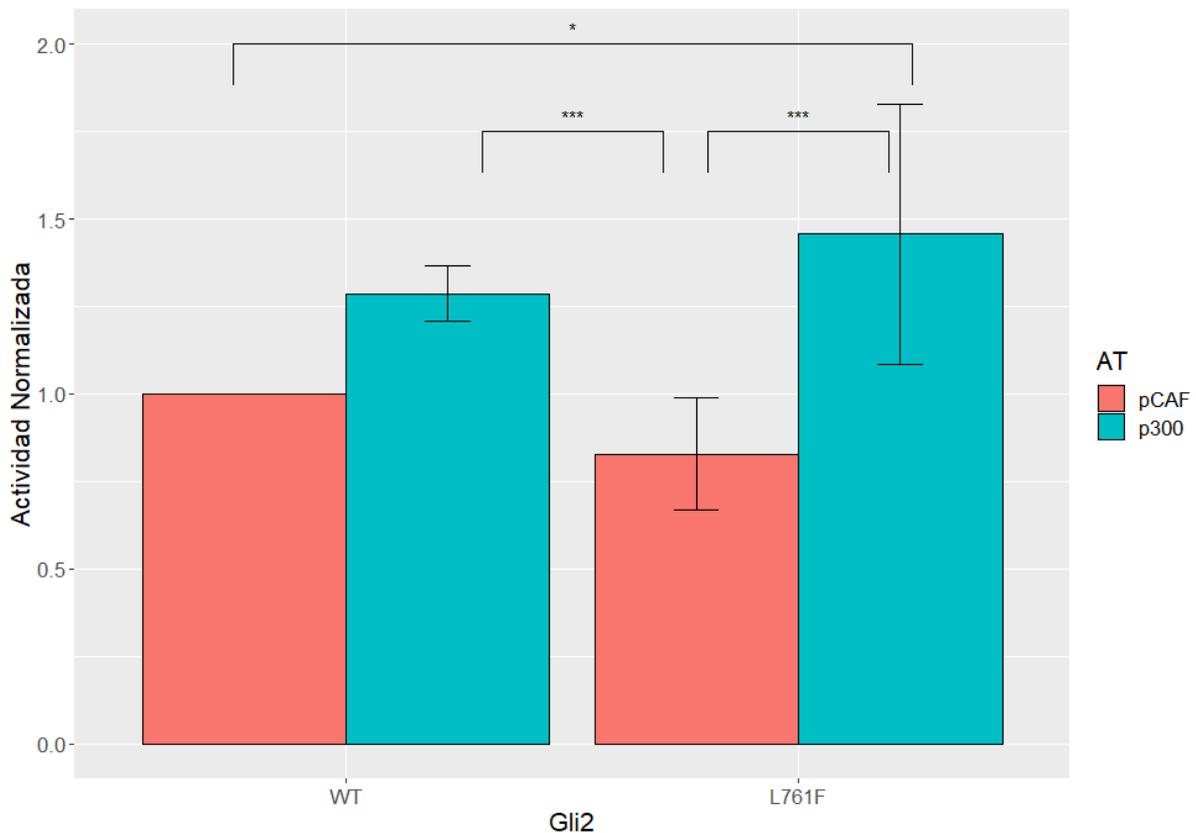


Figura 37: Actividad de GLI2 medida como fluorescencia del gen reportero GFP en presencia de p300, una acetiltransferasa que acetila GLI2 y pCAF, una acetilasa que se utiliza en este caso como control ya que no tiene sitios de reconocimiento en GLI2 para acetilación (n=3, '****' = p-valor<0.001; '*' = p-valor<0.05)

Repetimos el experimento en co-transfecciones de GLI2 y p300 en las células reporteras NIH3T3-CG Gli2 KO sin que la acetilación tenga efecto notable sobre la actividad tanto de GLI2 WT como p.L761F. Por último, en las células NIH3T3-CG con actividad Gli2 endógenos, realizamos un experimento de sobreexpresión de p300 y evaluamos si en estas condiciones la acetilación elevada tenía un efecto similar al reportado por Coni et al., pero no encontramos que este sea el caso (datos no mostrados). Los resultados de estos experimentos parecerían indicar que, si bien GLI2 es efectivamente acetilado, la acetilación por sí sola no modifica la actividad de GLI2 de trans activar un gen reportero GFP en dos líneas celulares distintas.

3. Análisis funcional de variantes en *PNPLA6*

Las variantes del paciente 29 en el gen de *PNPLA6*, c.3343A>C, p.Thr1115Pro y c.3428-44G>A, p.Pro1142_Ala1143ins14 en caso de ser patogénicas, podrían explicar el fenotipo de la paciente de manera precisa.

La evaluación de la función de la variante missense p.Thr1115Pro, fue realizada por el laboratorio del Dr Robert B Hufnagel (National Eye Institute, Bethesda, Maryland, United States), mediante un ensayo enzimático como se describe en (Kropp and Richardson 2003). Como se puede observar en la Fig. 38, la variante tiene completa pérdida de actividad, equivalente a un truncamiento por corrimiento de marco de lectura p.Arg1031Glnfs*38 (R1031Qfs*38).

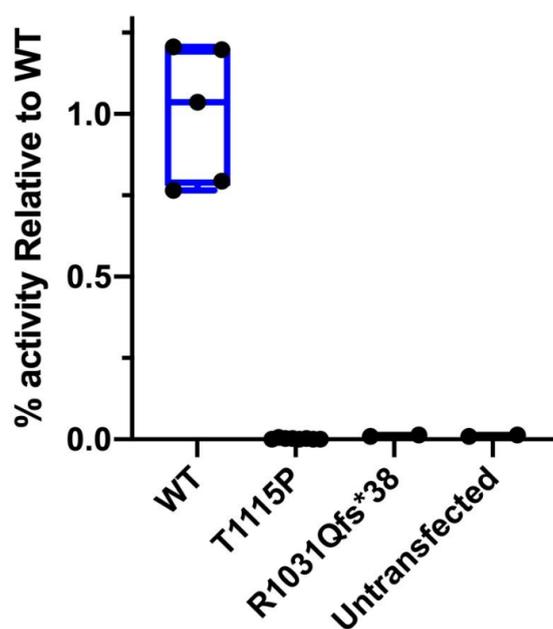
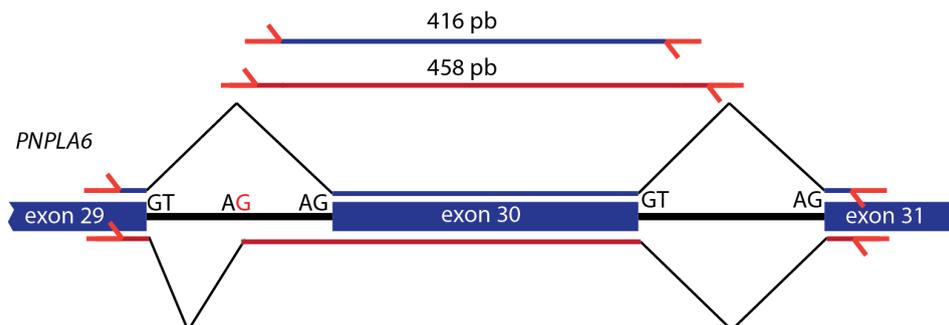


Figura 38: Ensayo enzimático para la esterasa blanco de neuropatía *PNPLA6*, realizado por el laboratorio del Dr. Hufnagel (n=5). La actividad de la neuropathy target esterasa (NTE) fue definida como la diferencia en la hidrólisis del fenil-valerato en presencia de paraoxon (inhibe actividad de esterasa basal) y la combinación de pataozon y mipafox (inhibe la actividad de esterasa basal y de NTE). Finalmente se mide la absorbancia a 486nm.

Por el otro lado, la predicción del programa SpliceAI indicaría que la variante intrónica c.3428-44G>A generaría un sitio aceptor de splicing críptico, agregando a la secuencia proteica 14 aminoácidos dentro del marco de lectura en dominio catalítico de la proteína con una probable disrupción de la actividad enzimática. Al ser *PNPLA6* expresado en sangre periférica, decidimos evaluar el efecto del splicing obteniendo ARN de la probando y los padres a partir de este tejido. El ARN se utilizó de molde para sintetizar la primer hebra de ADN copia y se realizó una PCR con primers complementarios a los exones 29 y 31 del gen de *PNPLA6* (Fig39-A).

A



B

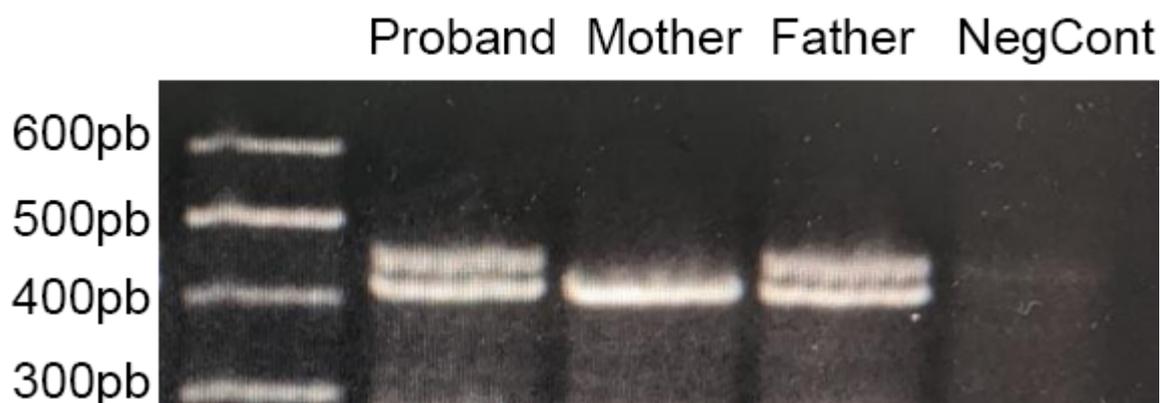


Figura 39: Confirmación del efecto de la variante de splicing en *PNPLA6*. A: Esquema de diseño de primers y tamaños esperados al amplificar el ARNm wt (azul) ó con la variante (rojo). B) Gel de agarosa para la PCR a partir de cDNA de *PNPLA6*. Calles de izquierda a derecha: Ladder 100 pb, Probando, Madre, Padre y Control Negativo de la PCR (sin cDNA molde).

Al evaluar el resultado de la amplificación (Fig 39-B), se observa un patrón de bandas distinto entre la madre y, el padre y probando. Mientras que los tres individuos presentan una banda de tamaño esperado de 416pb, tanto el probando como el padre presentan una banda adicional de mayor tamaño. Esta diferencia de tamaño es congruente con la adición de 42 nucleótidos incorporados por el nuevo sitio aceptor de splicing que generaría la variante heredada del padre. Se plantea realizar el ensayo funcional de NTE similar a la variante missense para esta inserción.

Con estos resultados, podemos concluir que las variantes encontradas en la probando ambas interrumpen la función de la proteína y, al ser heredadas en heterocigosis compuesta, la variante de missense de la madre y la variante de splicing del padre, explicarían el fenotipo de la paciente.

En este capítulo testamos tres variantes en *GLI2* (LB, VUS y P), dos variantes VUS en *LHX3*, tres en *LHX4* y 2 variantes en *PNPLA6*. De las 10 variantes analizadas, observamos efectos moleculares distinguibles de las versiones WT en 7 de los casos (70%). Se retomará la reclasificación de estas variantes por ACMG en la Discusión.

Capítulo 3

Massive Parallel Variant Effects Assays

3A - Introducción

Massive Parallel Variant Effects Assays (MAVES)

Lograr conectar los efectos fenotípicos observados a variantes genotípicas es un problema complejo, tedioso y virtualmente infinito. Las regiones del genoma humano de las cuales más entendemos son aquellas que comprenden los genes que codifican para proteínas. Sin embargo, éstos constituyen apenas una pequeña fracción del total del genoma. Como fue desarrollado en el capítulo anterior, se requieren modelos que nos permitan ensayar algún efecto de las variantes sobre el resultado proteico final, probando mutación por mutación. Aún así hay una enormidad de variantes que se encuentran en otros elementos funcionales del genoma como sitios de splicing, promotores y secuencias regulatorias, que usualmente son más difíciles de captar en los análisis genómicos, e igual de difíciles de testear sus efectos de manera empírica. A todas estas variantes se le suma luego el problema de las desviaciones al comportamiento típico mendeliano, que suele ser más la regla que la excepción, con influencia en el resultado fenotípico final debida a la interacción de varios factores tanto genéticos como ambientales. Además, muchos genes poseen funciones pleiotrópicas, participando en más de un mecanismo biológico, los cuales muchas veces desconocemos, o no tenemos en cuenta a la hora de diseñar un ensayo funcional. Toda esta complejidad es la que contribuye a la expresividad variable y penetrancia incompleta de numerosas patologías.

Con esto en mente, surgió la necesidad de interpretar y clasificar las variantes encontradas en los ensayos genómicos, existiendo guías como la del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), que divide las interpretaciones desde “patogénicas” a “benignas” pasando por el medio de una zona gris de “significancia incierta” (VUS). Por falta de evidencia, una gran parte de las variantes terminan clasificándose en esta categoría. En Clinvar, que adapta esta clasificación para la interpretación de variantes, las VUS representan la mayor proporción de las variantes reportadas, con números que se expanden de manera casi exponencial a medida que se secuencian más y más genomas y exomas en el mundo (Fig. 40).

La evidencia para determinar el impacto potencial de una variante, en líneas generales, se pueden resumir en: (1) frecuencia de la variante observada en la población afectada ó población control (segregación); (2) ensayos funcionales de laboratorio; y (3) predicciones *in-silico*. De estas categorías, la última opción es la única y más fácil de escalar para cubrir todas las posibles variantes de un gen o genoma, aunque de la misma forma, es considerada como una de las formas de evidencia más débiles (*Supporting* ó “de apoyo” en la clasificación de ACMG). A partir del año 2010 aproximadamente, se ha comenzado a desarrollar un nuevo tipo de ensayo masivo denominado Multiplexed Assays of Variant Effect (MAVEs) (Fowler et al. 2010) (Weile and Roth 2018), con la promesa de poder escalar considerablemente aquellos ensayos funcionales que son considerados de mayor poder de evidencia para poder determinar su nivel de patogenicidad.

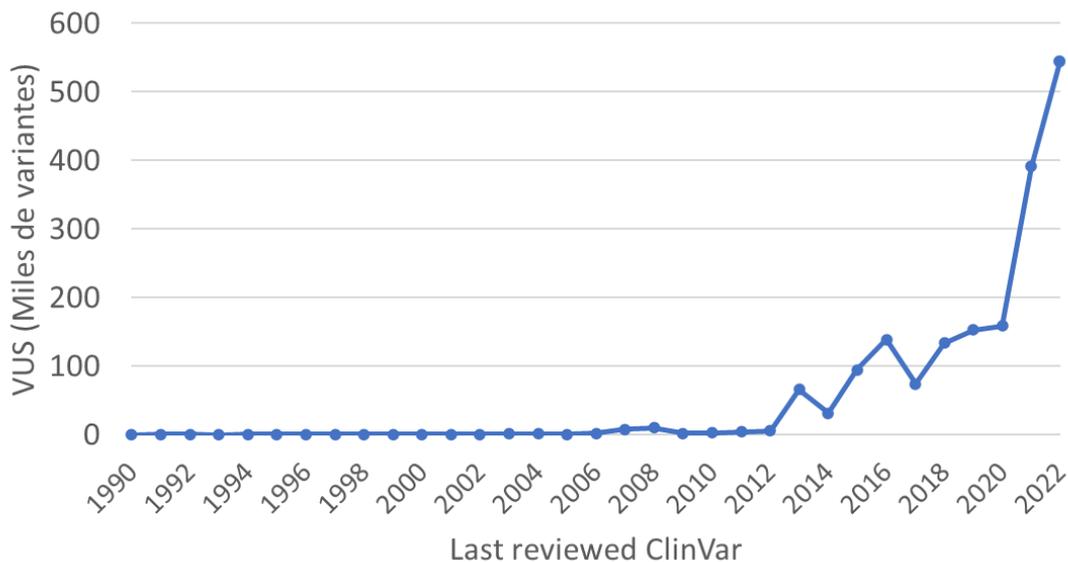


Figura 40: Número de variantes de significado incierto en Clinvar por año (datos obtenidos mayo 2022)

Típicamente los ensayos funcionales de variantes se realizan luego del descubrimiento del primer caso clínico que la presenta, muchas veces siendo bastante tardía la clasificación final de patogenicidad. Con el número creciente de VUS reportadas en los últimos años, resulta conveniente tomar una posición proactiva hacia el diseño experimental para la evaluación de variantes, y generar preventivamente un catálogo de todas las variantes posibles para un gen (o estructura genética), incluyendo aún las variantes que hasta el momento no fueron observadas en ningún paciente. Los MAVES se basan en la utilización de una paralelización masiva de ensayos funcionales para lograr este objetivo.

Los diseños experimentales para las MAVES pueden dividirse en líneas generales en cuatro etapas: (1) Mutagénesis masiva de la región a analizar, (2) selección de las variantes funcionales versus las no funcionales, (3) secuenciación y, (4) análisis computacional. A continuación se describe cada una de ellas:

1. **Mutagénesis masiva:** El método más simple y uno de los primeros en utilizarse es la incorporación de mutaciones por amplificación por PCR propensa a error, con una polimerasa sin actividad nucleasa 3'→5' (Cadwell and Joyce 1994). Este método, aunque barato y sencillo, puede no necesariamente generar todos los tipos de SNVs posibles para una región, y además generar más de una mutación a la vez. Otra opción implica la expansión de las técnicas típicas de mutagénesis sitio dirigida, utilizando oligonucleótidos con diferencias en la secuencia original, y que permitan obtener todo el conjunto de variantes posibles (Kitzman et al. 2015). Las desventajas que se encuentran con este último abordaje son los costos, ya que requiere la síntesis específica de múltiples oligonucleótidos, usualmente por síntesis por *microarray*, y que al requerir utilizar polimerasas para extender la secuencia de los oligonucleótidos, pueden sumarse nuevas mutaciones no intencionales.

Un último método de mutagénesis masiva se denomina EMPIRIC (“Extremely Methodical and Parallel Investigation of Randomized Individual Codons”) (Hietpas et al. 2011). En este método, cassettes de oligonucleótidos con las distintas mutaciones

son directamente ligados en las posiciones correspondientes. Para lograr esto es necesario primero diseñar un vector apropiado, el cual omite la secuencia del cassette y tiene en su lugar sitios de restricción que crean extremos cohesivos. Los oligos con las mutaciones son sintetizados y se ligan al vector abierto por estos extremos. Si bien esta técnica también puede resultar costosa, al evitar rondas de PCR, las secuencias resultantes de los vectores no suman mutaciones indeseadas. Existen otros tipos de mutagénesis masivas, de los cuales no entraremos en detalle.

2. **Selección:** La selección es el paso clave para diferenciar aquellas variantes funcionales, de aquellas que no lo son. Generalmente se asocian a métodos de competencia, en donde la función del gen/proteína a estudiar se asocia al “fitness” de la célula en la que se incorporó la variante (Kitzman et al. 2015); métodos de sorting celular mediante reporteros fluorescentes (Majithia 2016) ó; abundancia de transcritos (Kwasnieski et al. 2012).
3. **Secuenciación:** El paso siguiente a la selección implica la secuenciación masiva por NGS, que va mano a mano con la capacidad de analizar los efectos de distintas variantes de manera masiva. En este paso se secuencia el ADN o ARN resultante de la transfección de las células con los vectores que contienen las distintas variantes, para luego cuantificar la presencia relativa de cada una antes y luego del proceso de selección. Como la mayoría de las tecnologías de NGS permiten secuenciar fragmentos cortos (de hasta unos 150pb), según la longitud del transcripto y la posición de la variante, a veces resulta necesario asociar un *barcode* molecular a cada variante para reconocerla inequívocamente. Esto requiere pasos previos de inserción del barcode, y estrategias de ensamblado que posibiliten vincular cada uno con su variante (Hiatt et al. 2010).
4. **Análisis computacional:** El último paso implica el análisis de los resultados de la secuenciación previa. Generalmente, según la estrategia empleada, se suelen utilizar algoritmos caseros que leen las secuencias, las interpretan como una variante en particular y luego analizan la profundidad de las lecturas, que es un proxy para el éxito relativo de la variante particular. Con esta estimación de la frecuencia de la variante dentro de la muestra, se generan puntajes de enriquecimiento para cada variante asociado al proceso de selección previo, que representarán de manera cuantitativa el efecto de la variante. Un enriquecimiento de lectural respecto del WT implica una ventaja “adaptativa” en el proceso de selección anterior, por lo que variante presentaría una ganancia (o mejora) de la función, mientras que una depleción de lecturas asociada a la variante respecto del WT, implicaría una pérdida de función.

En esta sección de la tesis procederemos a mostrar los resultados de dos diseños experimentales para el análisis de variantes en los genes POU1F1 y GLI2 mediante MAVES. Por un lado se analizará el efecto de todos los posibles cambios de nucleótido único sobre el splicing alternativo del exón 2 de POU1F1 para la generación de las isoformas alfa y beta (Introducción General). Finalmente, presentamos los primeros pasos de puesta a punto para el protocolo de MAVES para determinar efectos de variantes de GLI2 en su dominio de transactivación.

productos resultantes fueron purificados con beads magnéticas y entregados para secuenciar en un equipo HiSeq 4000 y/o NovaSeq.

Análisis informático

Las lecturas de RNA-seq conteniendo los índices de los plásmidos fueron primero contrastadas con la identidad de cada mutación. Las lecturas forward fueron mapeadas frente a una referencia isoforma específica, consistiendo en el plásmido de exón trap de POU1F1 modificado *in-silico* via GMAP33. De cada lectura splicada, se armó un catálogo de isoformas, requiriendo que cada variante este representada al menos por tres índices independientes y nueve lecturas. Se calcularon fracciones de splicing porcentual (PSI) para cada índice (pesado para el número de lecturas obtenidas). Si la lectura no correspondía a las isoformas “alfa”, “beta” ó “skipping del exón 2”, se la denominó dentro de la categoría amplia “otras”. Variantes con un Z score > 4.16 (utilizando como referencia variantes intrónicas profundas) en las proporciones de alfa, beta, skip u otra, y un fold-change igual o mayor a 3, fueron consideradas variantes disruptoras del splicing (SDVs).

Las distintas posiciones y cambios también fueron anotadas con las predicciones de SpliceAI, para comparar las predicciones *in-silico* y los resultados empíricos obtenidos sobre los efectos en el splicing. Los mismos fueron analizadas por scripts propios en Python.

MAVES aplicadas al gen GLI2

Clonado del cDNA de GLI2 en un vector lentiviral

La secuencia de cDNA de GLI2 fue amplificada a partir del plásmido pCS2-MT GLI2 FL (Roessler et al., 2005) para incorporarse en los siguientes vectores:

- pCW57.1: was a gift from David Root (Fig. 41 - Addgene plasmid # 41393 ; <http://n2t.net/addgene:41393> ; RRID:Addgene_41393)
- Vector Gateway™ pDONR™221 (Fig. 42 - Invitrogen)

Primer	Secuencia 5' (overlap/spacer/ANNEAL) 3'	Long.
Lenti-Myc-Gli2_fwd	cagatcgctggagaattggATTTAGGTGACACTATAGAATAC	43
Lenti-Myc-Gli2_rev	aacatatccagtcactatggCTAGGTCATCATGTTTCAG	38
Attb1-MycGli2_fwd	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcATTTAGGTGACACTATAGAATAC	54
Attb2-MycGli2_rev	ggggaccactttgtacaagaagctgggtCTAGGTCATCATGTTTCAG	48

Tabla 15: Primers para amplificación de la región cDNA de GLI2 a partir del pCS2-MT GLI2 FL

Para la generación del proto-genoma de lentivirus con el cDNA de GLI2, se digirió el plásmido pCS2-MT GLI2 FL con la enzima de restricción Sall y se utilizó el plásmido linearizado como molde. Se utilizaron los primers Lenti-Myc-Gli2_fwd y Lenti-Myc-Gli2_rev para amplificar la secuencia con la polimerasa Phusion Green Hot Start II HF (ThermoFisher) siguiente el protocolo del fabricante y agregando 3% DMSO. El protocolo de termociclado fue [98°C, 30 seg; (98°C, 15 seg; 55°C, 20 seg, 72°C, 5 min)x35; 72°C, 7 min]. El plásmido lentiviral fue digerido con las enzimas Sall y NheI y se clonó GLI2 bajo el promotor TRE en

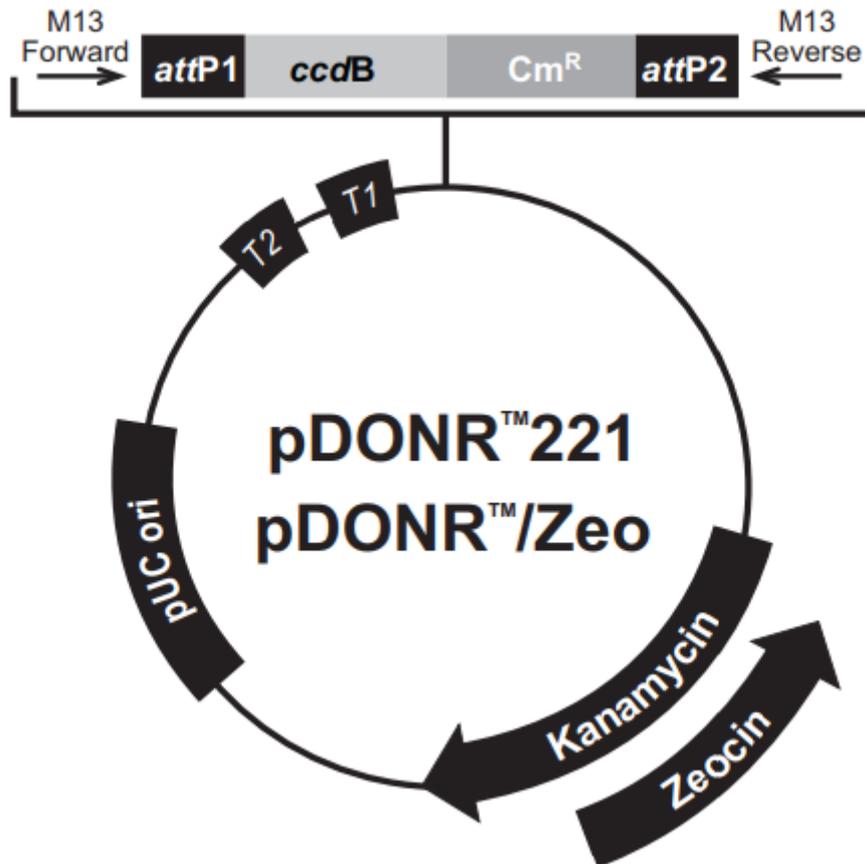


Figura 42: Esquema del plásmido pDONR221. El plásmido contiene un cassette de resistencia a kanamicina, y un sitio de clonado por recombinación Gateway, en donde los extremos attP1 y attP2 pueden recombinar con sitios attB1 y attB2 de un fragmento de amplificación para reemplazar el cassette génico que expresa de la toxina ccdB por el cDNA de interés flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2.

Infección Lentiviral

En placas multiwell de 6 pocillos, se sembraron 500.000 células NIH/3T3-CG Gli2 KO ó células HAP1 en 2mL de medio de cultivo en presencia de polibreno 8 ug/mL. Adicionalmente se agregó cantidades crecientes de preparación de lentivirus de 10 ul a 400 ul para titulación concentración de viriones infectivos.

A las 24 se replicaron las células a la mitad en dos pocillos. A las 48 hs se agregó puromicina al medio (2ug/mL) por 2 días para seleccionar células infectadas. Para determinar presencia de colonias y multiplicidad de infección, se realizó una tinción por cristal violeta (Cristal Violeta 0.05% m/v, 1% Formaldehído, 1% metanol en PBS 1X).

Determinación de reportero GFP y Western Blot

La determinación del gen reportero GFP se realizó como se describe en materiales y métodos del Capítulo 2. Para la expresión de GLI2 por parte del vector viral se agregó al medio de cultivo Doxiciclina a una concentración de 1 ng/ul.

La expresión de GLI2 por parte de los lentivirus se determinó en células HAP1 por la técnica de Western Blot. Proteína total de las células transducidas fue extraída con buffer RIPA en frio y se determinó la concentración por la técnica de Bradford. Se realizó un PAGE (6% de

acrilamida) con 25 mg de proteína por muestra y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. Se reveló la presencia de GLI2 mediante anticuerpo primario myc-tag (9B11 - Cell Signalling) y anticuerpo secundario Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076 (Cell Signaling). Se detectó la presencia de proteína por quimioluminiscencia utilizando el kit Clarity ECL Western Blotting Substrates (BioRad) en un equipo GBox (Syngene).

Mutagenesis pDONR 221

Se mutaron los sitios de restricción para BbsI que se encontraban dentro del plásmido pDONR 221-GLI2 para futuros ensayos. Se realizó de manera equivalente a la descrita en la sección de materiales y métodos del Capítulo 2, utilizando los primers de la Tabla 16.

Name (F/R)	Oligo (Uppercase = target-specific primer)
Gli2DONR_KanSyn_F	GCGTATTTGccttGCTCAGGCGC
Gli2DONR_KanSyn_R	GATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAAC
Gli2_2E3Tsyn2_fwd	atccGAATTCAATGGAaACcTCTGCCtcagccactg
Gli2_2E3Tsyn2_rev	agtcGGTACCTTCCTTCCTGGTG

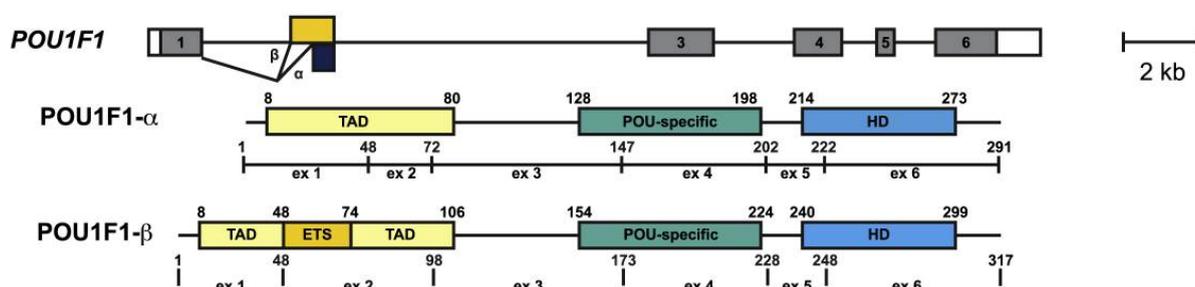
Tabla 16: Primers de mutagénesis sitio dirigida para eliminar los sitios de reconocimiento a la enzima de restricción BbsI del plásmido pDONR 221-GLI2

3C - Resultados

Mutagenes masiva y ensayos de splicing en el exón 2 de POU1F1

El gen *POU1F1* codifica para un factor de transcripción esencial para la diferenciación de gonadotropos, lactotropos y tirotropos. En su segundo exón, posee un sitio aceptor de splicing, que se encuentra rio arriba del sitio canónico (que da lugar a la isoforma alfa), que genera una isoforma con 26 aminoácidos adicionales en el dominio de transactivación (denominado isoforma beta), con función represora de la transcripción (Fig. 43-A). Nuestra hipótesis de trabajo, es que variantes en las inmediaciones del sitio aceptor de splicing de las variantes alfa y/o beta, generan un desbalance en la proporción de las isoformas alfa activadora y beta represora, y que esto podría ser causante de patologías hipofisarias.

A



B

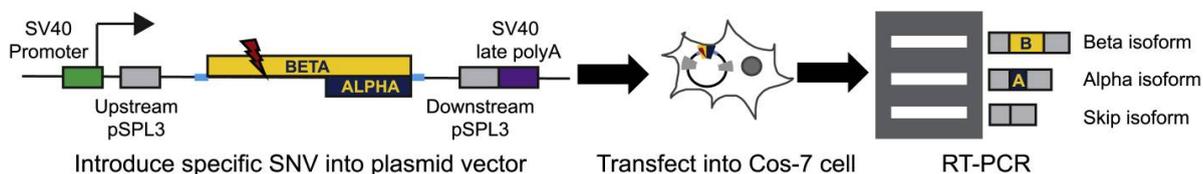


Figura 43: Diseño experimental del ensayo de MAVES para variantes de splicing en POU1F1 A) Esquema del gen humano de *POU1F1* y las isoformas proteicas producidas por el uso de los sitios alternativos de splicing en el exón 2. La isoforma beta posee una inserción de 26 aminoácidos localizados luego del aminoácido 48, en el dominio de transactivación. Referencias: TAD: dominio de transactivación, HD: homeodominio. B) Ensayo de minigen ó exon trapping en el vector pSPL3 conteniendo el exón 2 de *POU1F1* y porciones de los intrones aledaños.

Nos propusimos entonces identificar variantes disruptoras del splicing en el exón 2 de *POU1F1* en un ensayo reportero del splicing, masivo y paralelo. Para ello diseñamos mezclas de oligonucleótidos conteniendo todas las posibles variantes de nucleótido único a lo largo del exón 2 de la isoforma beta (150 pb) y las 210 pb flanqueantes de los intrones aledaños (N= 1080 SNPs) (Fig. 43-B), las cuales fueron incorporadas en una serie de bibliotecas en el vector pSPL3, un plásmido comúnmente utilizado para ensayos de exon trapping. Para identificar los resultados del splicing diferencial de cada variante, se incorporó al diseño un índice de 20 nucleótidos degenerados, rio abajo en el 3'UTR del transcripto generado. En total la biblioteca de mutantes contenía 255,023 clones diferentes con sus índices, de los cuales 188,772 (74.0%) representaban exactamente una mutación programada. Casi todas las mutaciones diseñadas aparecieron en esta biblioteca

(1070/1080, 99,1%), y además con un alto nivel de redundancia (mediana: 75 distintos índices/variante).

La biblioteca de reporteros de splicing fue transfectada en su conjunto en células COS-7. Se extrajo ARN resultante y se procesó con primers específicos para generar cDNA de los transcritos producidos. Los transcritos *spliceados* fueron leídos en masa via RNA-seq con extremos apareados (pair-end), en donde cada lectura *forward* indicaba el resultado del splicing, y las lecturas apareadas *reverse* contenían los índices del 3'UTR que identificaban las mutaciones presentes del transcripto primario. Se generaron 14 replicas biológicas, en donde se detectaron el 94,2% de los índices asociados con variantes de nucleótido único.

Identificación de variantes disruptoras del splicing

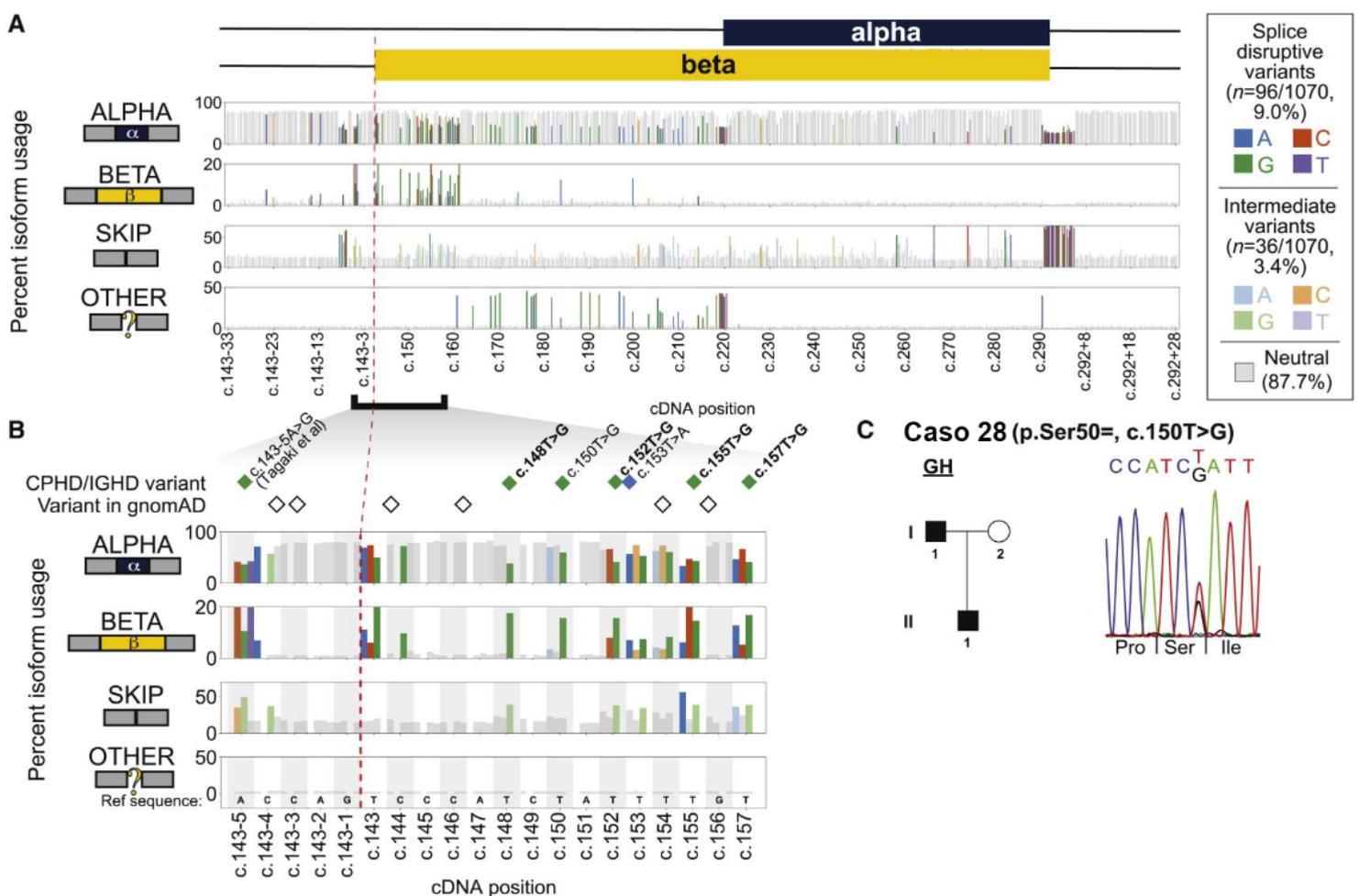


Figura 44: Mapa de efecto del splicing en el exón 2 de POU1F1 e intrones aledaños. A) Porcentaje de uso del exón 2 alfa (panel superior), beta (segundo panel), skip (perdida de exón, tercer panel), y otras isoformas (panel inferior) por posición de la variante, medido por ensayo de minigen masivo. Las barras grises denotan variantes neutras para el splicing, mientras que las barras de color indican cambios de base que producen disrupción en el splicing fuerte (barras oscuras) ó intermedio (barras claras). B) Un grupo de variantes disruptoras del splicing en las cercanías del sitio de splicing aceptor para la isoforma beta llevan a porcentajes incrementados del uso de la isoforma beta. Los diamantes llenos indican variantes halladas en pacientes con hipopituitarismo y los diamantes vacíos indican variantes reportadas en gnomAD. Las variantes de tipo missense se indican en negrita. C) La familia del caso 28 presenta dos individuos afectados con IGHG y una variante sinónima compartida disruptora del splicing.

Como era de esperarse, la isoforma alfa correspondió a la isoforma de POU1F1 predominante (69,2% de las lecturas totales), seguida de la pérdida (“skip”) del exon 2 (25,6%), y en tercer lugar la forma beta (1,6%). Creamos, además, una categoría extra (“other”) para las lecturas remanentes (3,6%) derivadas de otras 262 isoformas detectadas. La mayoría de estas isoformas “no canónicas” fueron escasamente utilizadas, entre las cuales las 20 más representadas corresponden a más del 80% de las lecturas en esta categoría. Para cada variante en POU1F1 se calculó un valor de *percent splicing in* (PSI) promediando los valores obtenidos para cada índice representando a la misma mutación. Los valores de PSI obtenidos fueron altamente reproducibles entre las réplicas (media de comparación de a pares de Pearson $r=0.92$).

Siendo que las tres isoformas ocurren para todas (o casi todas) las secuencias, y que el efecto biológico depende de la abundancia relativa de las mismas, dado su rol biológico antagonico, medimos el impacto en el splicing de los 1070 SNPs a lo largo del exón 2 (Fig. 44-A) definiendo a las SDVs como aquellas variantes que incrementan el uso de la isoforma beta, skip u otra en al menos 3 veces ($p < 0,05$ corregido por Bonferroni).

Del total de variantes, 96 (9,0%) corresponden a SDVs. De éstas, las variantes que incrementaron el uso de la isoforma beta (u otras) fueron las más frecuentes ($n = 65/96$), seguidas por las que presentaron pérdida del exón ($n=31/96$). Unas pocas variantes ($n = 4/96$) tenían un impacto en múltiples isoformas. Es interesante destacar, que las variantes que conllevan un mismo resultado tienden a agruparse en regiones distintivas. Notablemente, las variantes que aumentan la presencia de la isoforma beta se encuentran cerca del extremo 5' del exón 2 (Figura 44-B). Las variantes que propician la pérdida del exón se encuentran a lo largo de todo el exon, aunque se encuentran particularmente enriquecidas en las inmediaciones de los sitios donador y aceptor de splicing: 25 de las 26 SDVs intrónicas se encuentran ± 20 pb del exon 2.

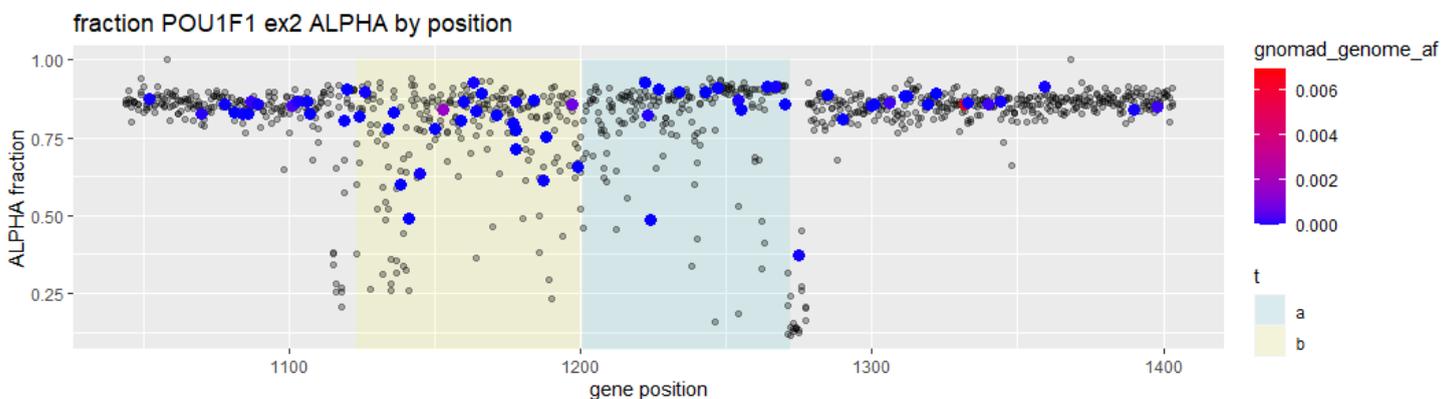


Figura 45: Efectos de las variantes reportadas en gnomAD para el exón 2 de POU1F1. Se indica la fracción de la isoforma alfa en función de la posición de la variante en el gen de POU1F1. Una disminución en la isoforma alfa indica en líneas generales la interrupción del splicing. Puntos negros: Variantes no reportadas en gnomAD; Puntos de color: variantes reportadas en gnomAD coloreados por su frecuencia, variantes más frecuentes en rojo y menos frecuentes en azul. La sombra celeste indica el exón 2 para la isoforma alfa mientras que la sombra amarilla indica los nucleótidos agregados para la isoforma beta.

A modo de comparación, examinamos además la incidencia de variantes disruptivas de POU1F1 en la población general (Fig. 45). GnomAD (v2) contiene 68 variantes de las analizadas en nuestro ensayo, de las cuales 6 (8.8%) son SDVs y 3 (4.4%) tienen un efecto intermedio. Todas estas variantes son extremadamente raras, con una frecuencia menor a 1.6×10^{-5} . En conjunto, las variantes halladas en gnomAD no están significativamente depletadas de variantes SDVs en relación a un subconjunto de SNPs tomado al azar ($p = 0.7$, Fisher's exact test). Por ende, las variantes SDVs son dentro de todo toleradas, como lo son otras variantes de pérdida de función (ganancia de codón stop, cambio de marco de lectura y splicing), que son observadas a lo largo del gen en bajas frecuencias poblacionales en GnomAD.

De las 108 variantes sinónimas analizadas, 26 son disruptoras del splicing o intermedias. Es para nosotros de particular interés la variante hallada por WES en nuestro paciente 28 (Capítulo 1). Este paciente comparte con su padre un diagnóstico de IGHD, y la variante sinónima POU1F1:c.150T>G (p.Ser50=) (Fig. 44-C). En el ensayo masivo, esta variante aumenta el uso de la isoforma beta 10.7 veces respecto a la secuencia WT, coincidiendo con la predicción de SpliceAI, lo que podría explicar el fenotipo de IGHD observado, ya que no presenta ninguna otra variante asociada a la patología.

Comparación de efectos predichos y empíricos

Aprovechando la masividad de los datos, examinamos cómo los valores otorgados por el predictor de splicing SpliceAI se comparaban con nuestras medidas experimentales. Al tomar el máximo valor disruptivo entre las cuatro predicciones que otorga el algoritmo (ganancia de sitio aceptor, ganancia de sitio donador, pérdida de sitio aceptor y pérdida de sitio donador), y compararlo con la proporción de isoforma alfa como proxy de interrupción del splicing canónico (Fig. 46-A) observamos una correlación negativa significativa (Correlación de Pearson: -0,4666686, intervalo de confianza: (-0,5123967; -0,4183015), p -valor < $2,2 \times 10^{-16}$). Luego utilizamos las SDVs identificadas empíricamente, como conjunto de datos verdadero (i.e True Positives) para realizar una curva tipo ROC (Fig. 46-B) de precisión (True Positive Rate) vs 1-especificidad (False Positive Rate), obteniendo un área bajo la curva de 0,91.

Para poder analizar cómo se desempeñó SpliceAI en la predicción de interrupción de splicing en cada caso, graficamos el valor de predicción individual de ganancia, o pérdida de sitio aceptor ó donador en función del PSI de las isoformas beta, pérdida de exon u otras (Fig. 47). En la Fig. 47 A y B observamos la predicción de ganancia de sitio aceptor vs la proporción de isoformas beta u otras respectivamente. Hay una correlación marcada entre la predicción de una ganancia de sitio aceptor en la posición 1123 (color celeste), coincidente con el sitio de splicing para obtener la isoforma beta con un aumento de esta isoforma (Fig. 47-A). Para la predicción de otras isoformas (Figura 47-B) no se ve una tendencia tan marcada, pero sí se observa un agrupamiento de SNVs que generan nuevos sitios aceptores en la misma posición. En otras palabras, SpliceAI suele identificar cambios de splicing en la misma posición de manera similar, pero no así entre distintos sitios.

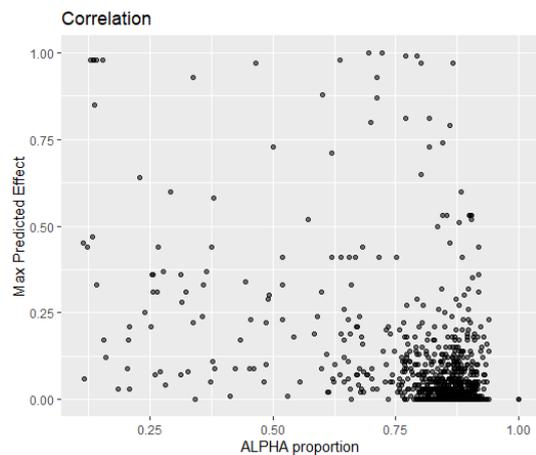
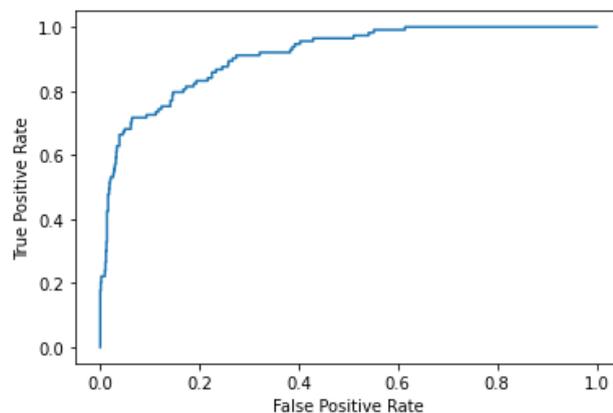
A**B**

Figura 46: Comparación de los efectos predichos por SpliceAI y el ensayo de MAVES para *POU1F1*. A) Relación del mayor efecto predicho según SpliceAI (siendo 0 sin efecto a 1, gran capacidad disruptiva), en función de la proporción de isoforma alfa como proxy de disruptión de splicing a niveles menores. B) Curva ROC de precisión (true positive rate) vs. 1-especificidad (false positive rate) para las predicciones de SpliceAI utilizando nuestros resultados empíricos como set verdadero.

Al analizar la predicción de pérdida de sitio aceptor, los efectos más claros muestran que la pérdida del sitio canónico aceptor de splicing (color aguamarina), que generaría la isoforma alfa, suele tener efecto más marcado en el uso de sitios crípticos y en la pérdida del exon (Fig. 47 C, D y E). En cuanto a las predicciones de pérdida y ganancia de sitio donador, el efecto más claro es la pérdida de sitio donador (color verde claro), que suele influir en la pérdida del exon 2 del transcripto final (Fig. 47-F), mientras que existe sólo una variante de ganancia de sitio donador de splicing que explicaría la aparición de una nueva isoforma (Fig. 47-G). Las comparaciones restantes que no se muestran en la figura no aportan información relevante a la predicción por SpliceAI (datos no mostrados). Se evaluaron otros programas de predicción de splicing como Human Splice Finder, el cual tuvo peor rendimiento y actualmente se encuentra bajo acceso pago.

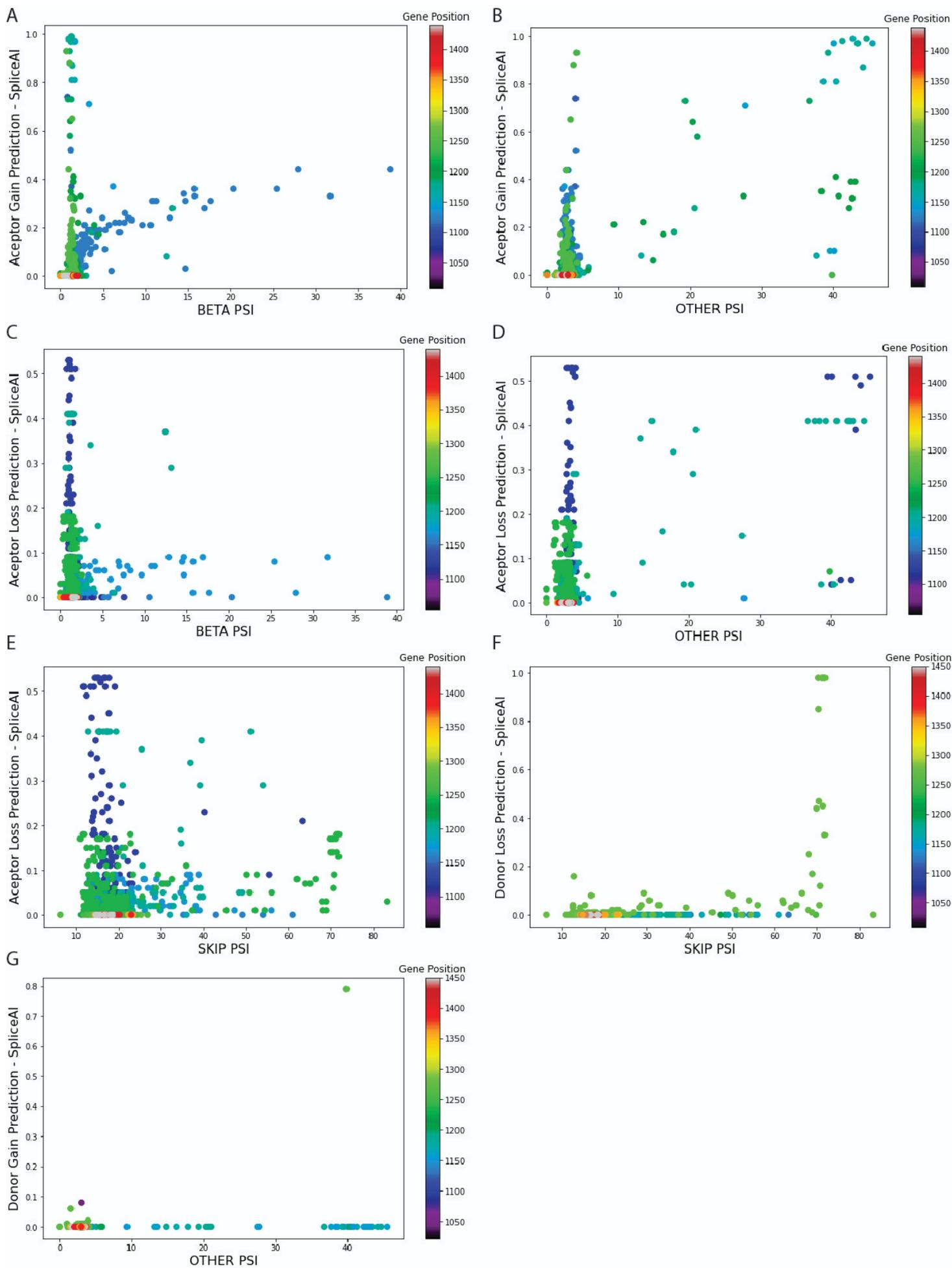


Figura 47: Predicciones de ganancia o pérdida de sitio de splicing aceptor ó donador según SpliceAI en relación al porcentaje de isoformas beta, otras ó skip. Cada punto indica los valores de predicción y obtenidos de PSI para una misma variante, coloreado por la posición en donde se predice el efecto en el gen. A) Predicción de ganancia de sitio aceptor vs. porcentaje de splicing para isoforma beta. B) Predicción de ganancia de aceptor vs. porcentaje de splicing para isoforma “otra”. C) Predicción de pérdida de sitio aceptor vs. porcentaje de splicing para isoforma beta. D) Predicción de pérdida de sitio aceptor vs. porcentaje de splicing para isoforma “otra”. E) Predicción de pérdida de sitio aceptor vs. porcentaje de splicing para isoforma “skip” de pérdida del exón 2. F) Predicción de pérdida de sitio donador vs. porcentaje de splicing para isoforma “skip”. G) Predicción de ganancia de sitio donador vs. porcentaje de splicing para isoforma “otra”.

Puesta a punto para ensayos masivos de variantes en GLI2

De manera similar, a lo realizado para POU1F1, se propuso diseñar un experimento que permita analizar el efecto de múltiples variantes de GLI2 de manera masiva y paralela. Utilizando a las células reporteras de GLI2 NIH/3T3-CG Gli2KO establecidas en el capítulo anterior, se evaluó la posibilidad de utilizar un vector lentiviral para insertar un única copia (que lleva una variante) del cDNA de GLI2, y luego medir el nivel de GFP de células individuales, como proxy de la funcionalidad de la variante de GLI2 expresada.

Como prueba de concepto, se construyó un vector lentiviral con el cDNA de GLI2 WT en la estructura del plásmido vector pCW57.1. Este plásmido contiene un promotor inducible por Doxiciclina (Dox), y selección por Puromicina. Se prepararon luego vectores infectivos en células empaquetadoras y se utilizaron los viriones para infectar en un primer ensayo a células HAP1 con una multiplicidad de infección de 0,3X. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con puromicina para seleccionar aquellas con una inserción del genoma viral y se activó la expresión de GLI2 con Dox. Se evaluó la presencia de GLI2 por Western Blot de las células infectadas (Fig. 48). Sólo en aquellas células incubadas en presencia de Doxiciclina se observa expresión del tag molecular Myc unido al extremo N-terminal de GLI2. Se observa un patrón de bandas que incluye al peso esperado de GLI2 (180 kDa) en conjunto a bandas de menor peso molecular. Hipotetizamos que estas bandas pueden corresponder a procesamiento post-traducciona l y degradación de GLI2, ya que las mismas bandas no se observan en ausencia de Dox.

Posteriormente evaluamos la capacidad de los lentivirus en infectar a las células NIH/3T3 -CG Gli2 KO, y de reactivar la expresión de GFP utilizado como reportero. Las células infectadas fueron luego hambreadas y tratadas con SAG de manera equivalente a lo realizado en el Capítulo 2, en presencia o ausencia de Dox.

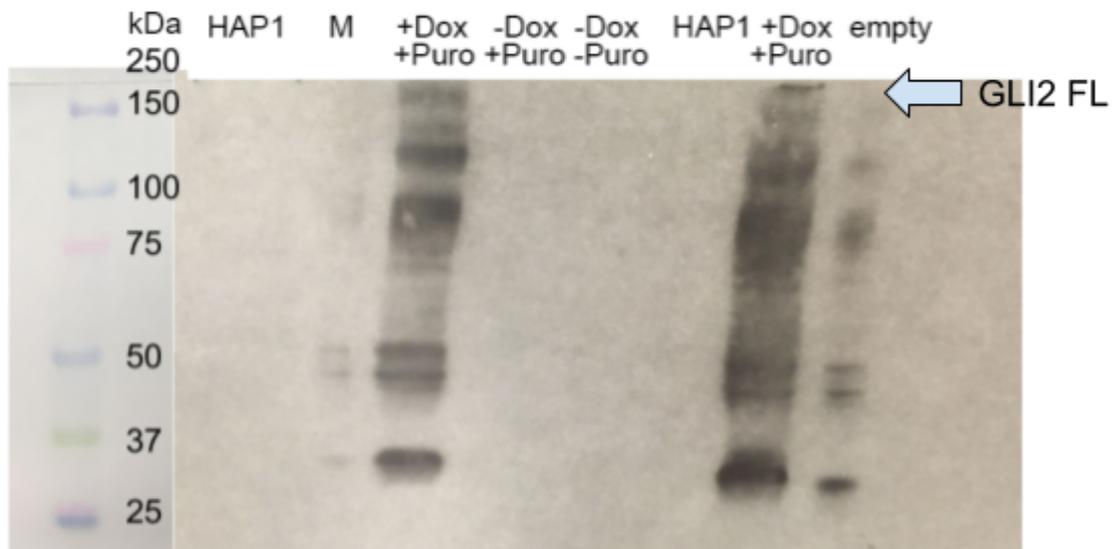


Figura 48: Western Blot para expresión de GLI2 en células HAP1 infectadas con lentivirus. Se utilizó un anticuerpo primario contra el tag molecular Myc. SJ cells: Células HAP1 sin infectar. M: Marcador de peso molecular. Dox: Doxiciclina. Puro: Puromicina. Gli2 FL: GLI2 tamaño completo

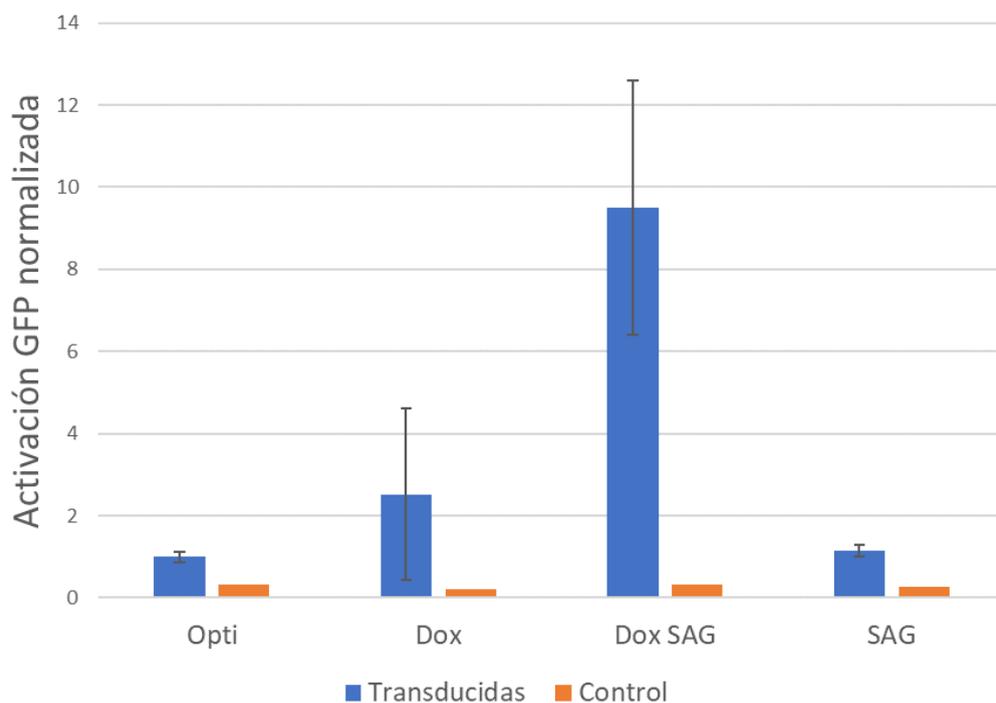


Figura 49: Actividad del gen reportero GFP en células NIH/3T3-CG Gli2KO infectadas con lentivirus de expresión de GLI2 WT. Se indica actividad normalizada a células transducidas en medio sin suero (Opti). Las células fueron incubadas por 24 horas en medio sin suero en presencia de Doxiciclina (Dox) y/o SAG. (n=1, se indica media y SD en triplicado)

Luego del tratamiento, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo para evaluar su expresión de GFP. En la Fig. 49 se muestra el resultado de un primer experimento, en donde se puede observar que en las células infectadas hay un nivel basal de expresión de GFP más alto que el observado en las células control sin lentivirus, y que la presencia de

Dox eleva la expresión de GFP (un poco más del doble que en células sin tratar), lo que era de esperar por la expresión inducida de GLI2. Adicionalmente, el agregado de SAG además potencia la activación de GFP cuando se suplementa al medio en presencia de Dox, no así de manera aislada, lo que muestra que la activación de la vía de señalización de SHH actúa de manera sinérgica a la presencia de GLI2 en las células.

La mala noticia es que, al querer mantener viables las células transfectadas, luego de dos pasajes la resistencia a puromicina se pierde y las células dejan de expresar GLI2. Nuestra hipótesis es que el ADN insertado es silenciado por la maquinaria intracelular, lo que nos impide extender estos ensayos en el tiempo.

El diseño experimental propuesto, luego involucra realizar las mutaciones en el cDNA de GLI2 por intercambio de cassettes de ADN. Para ello, la secuencia codificante de GLI2 fue incorporada en un vector DONR 221, el cual tiene sitios de recombinación attL1 y attL2. El vector luego fue modificado por mutagénesis dirigida para eliminar dos sitios de restricción para la enzima BsmBI (Fig. 50). Con estas modificaciones, puede reemplazarse una región del cDNA de GLI2 por una secuencia *stuffer*. Esta secuencia *stuffer* contiene sitios de restricción para la enzima BsmBI, una enzima de restricción de tipo IIS, que elimina la secuencia *stuffer* y deja extremos cohesivos en el plásmido, en donde se puede unir por complementariedad un oligonucleótido sintetizado ad-hoc con la misma secuencia que se reemplaza pero con una variante específica, que luego procederá a ligarse.

Utilizando el protocolo mencionado, con una biblioteca de variantes, cada una en un cassette, obtendremos un pool de plásmidos de GLI2, cada uno con una variante distinta en la región reemplazada. La síntesis de estos cassettes evita la utilización de una polimerasa que, por error innato de esta enzima, podría agregar otras mutaciones en regiones no contempladas.

Posteriormente, la secuencia de GLI2 mutada puede transferirse al vector de interés con el que proponemos incorporar GLI2 en las células por medio de recombinación de los sitios attL1 y 2 del plásmido con los sitios attR1 y attR2 del vector final. La biblioteca final de mutaciones de GLI2 en el vector correspondiente luego se usará en las células NIH/3T3 para estimular la expresión de GFP. Por medio de *sorting* celular en función del nivel de expresión de GFP, obtendremos poblaciones celulares con variantes de GLI2 funcionales (GFP positivas) ó no funcionales (GFP negativas). Estas poblaciones serán luego secuenciadas por NGS para determinar la presencia relativa de estas variantes en cada población celular y establecer un puntaje dado el enriquecimiento o depleción de estas en cada grupo, logrando el objetivo de determinar en un sólo ensayo la actividad de cada mutación en forma masiva y paralela.

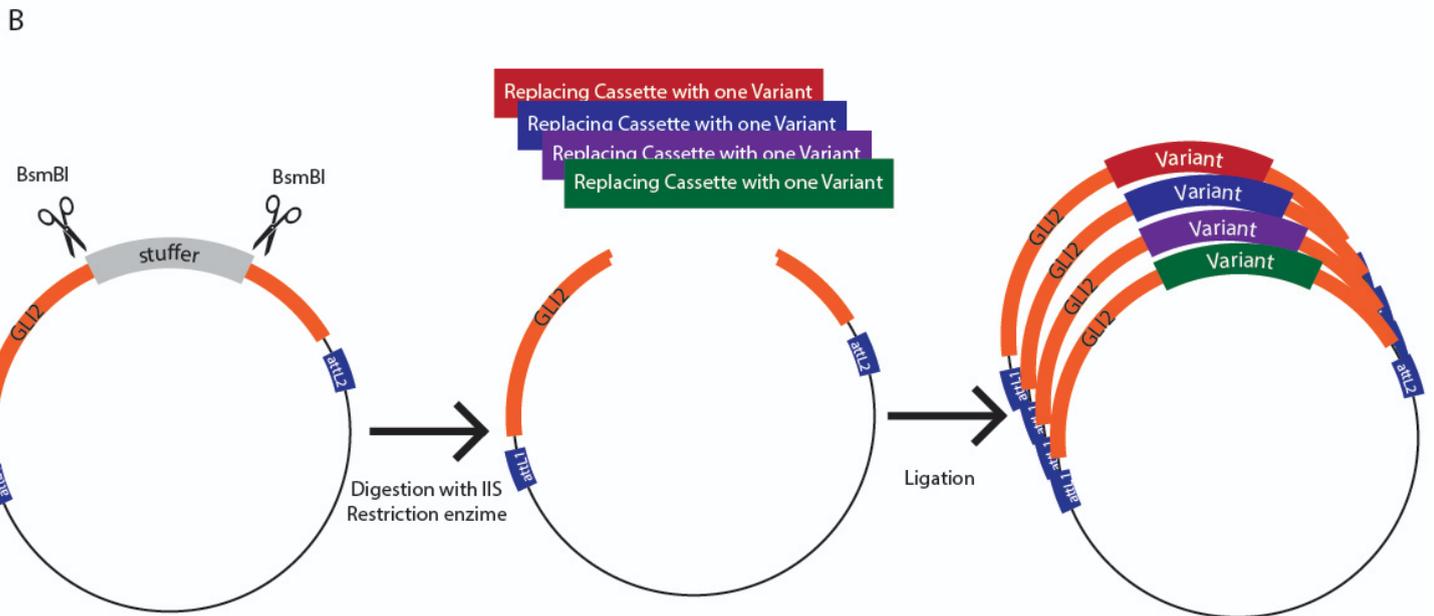
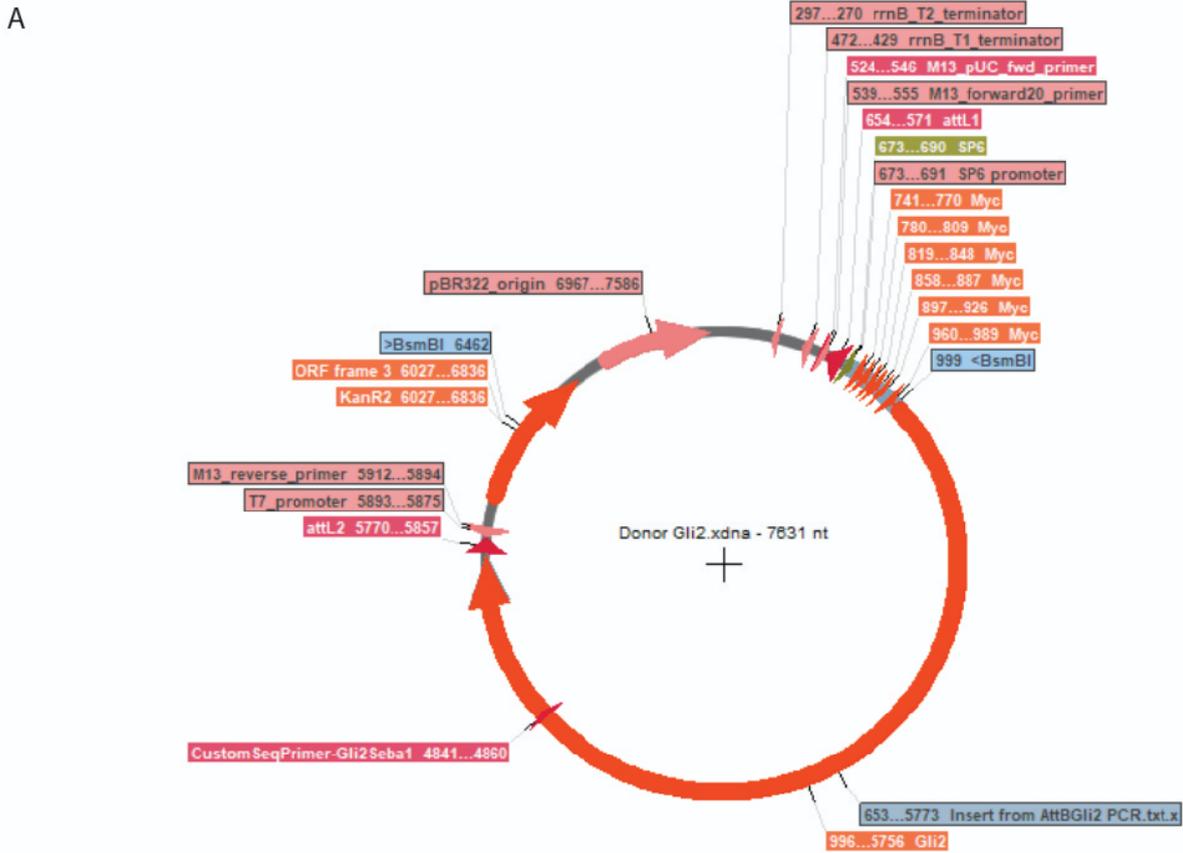


Figura 50: A) Esquema del plásmido DONR 221 - GLI2. B) Esquema de mutagenesis masiva por reemplazo de cassettes.

DISCUSIÓN

Aplicación de un panel propio de smMIPs en una cohorte de pacientes con hipopituitarismo congénito

Durante el transcurso de esta tesis de doctorado, nos enfocamos en establecer relaciones genotipo-fenotipo de pacientes argentinos con deficiencias de hormonas hipofisarias congénitas. Esta patología presenta una alta heterogeneidad genética, es decir, que existen muchos genes asociados al diagnóstico clínico, con una gran parte de las variantes patogénicas presentando penetrancia incompleta y/o expresividad variable. En diversos estudios de las causas moleculares del HC, se suele obtener un porcentaje relativamente bajo de éxito diagnóstico, con 16% para casos de CPHD y 11% para IGHD ([Cogan et al. 1998](#)) ([Coya et al. 2007](#)) ([Dateki et al. 2010](#)) ([de Graaff et al. 2010](#)) ([De Rienzo et al. 2015](#)) ([Mehta and Dattani 2008](#)) ([Reynaud et al. 2006](#)) ([Alatzoglou and Dattani 2010](#)) ([Wit et al. 2016](#)). En líneas generales, además, los casos esporádicos (que son los más frecuentes en HC) suelen ser más difíciles de diagnosticar que los casos familiares, donde se puede priorizar variantes compartidas entre los distintos familiares afectados.

Como primer objetivo nos planteamos entonces diseñar, poner a punto e implementar un panel de captura de genes asociados a HC basado en smMIPs. Diseñamos el panel incluyendo 104 genes, de modo que sea lo suficientemente amplio como para poder analizar, no sólo genes previamente reportados asociados a la patología, sino también, nuevos genes candidatos que puedan explicar el alto porcentaje de casos no resueltos en estudios previos. Se incluyeron en el mismo genes que se conoce que participan del desarrollo hipofisario en modelos animales; genes con pocos reportes asociados a HC; y genes codificantes de proteínas asociadas a PROP1, un factor de transcripción sumamente importante en el desarrollo hipofisario, y que se encuentra mayormente mutado en casos de HC a nivel mundial ([Wu et al. 1998](#)) ([Deladoëy et al. 1999](#)). Este panel resulta de la ampliación de un primer panel de 67 genes diseñado en 2016 por mi directora de tesis la Dra María Inés Pérez Millán ([Pérez Millán et al. 2018](#)).

Con este panel de smMIPs secuenciamos un gran número de casos pediátricos con HC derivados de diversos hospitales de Argentina. La cohorte presentada en este trabajo de tesis es única en el estudio de HC, no sólo por su dimensión sino también por su población de origen y por ende, su bagaje genético, correspondiente a la población argentina, con mezcla de ascendencias nativas amerindias, europeas y africanas ([Homburger et al. 2015](#)) ([Muzzio M et al. 2018](#)) ([Luisi et al. 2020](#)). Se secuenciaron 265 pacientes en total (170 secuenciados con el panel del año 2016, Tabla suplementaria 1, y 95 con el nuevo panel diseñado en este trabajo, Tabla 7), junto a 193 familiares directos. De los 263 casos totales, sólo 3 resultaron ser casos familiares confirmados por los médicos, siendo la mayor proporción casos esporádicos. En las dos sub-cohortes analizadas, (2016 y 2019) se observa una mayor proporción de pacientes masculinos (60 y 61% respectivamente). En la mayoría de los estudios de este tipo se suelen observar valores similares ([França et al. 2013](#)) ([Babu et al. 2018](#)) ([Nakaguma et al. 2019](#)) ([Budny et al. 2020](#)), lo que podría indicar dos escenarios posibles: el primero sería que hay una influencia del sexo biológico en el desarrollo de HC; vimos que el desarrollo de la hipófisis es un proceso complejo con numerosos factores involucrados, incluidas hormonas y sustancias parácrinas, además de mencionar a la evidente presencia de los gonadotropos que participan del desarrollo y

maduración sexual del individuo. El desarrollo de HC, como intentamos mostrar en esta tesis, no es necesariamente monogénico y típicamente mendeliano, por lo que relaciones epistáticas, y la indudable relación del genotipo con el ambiente pueden contribuir a la complejidad de la patología, siendo el sexo otro factor relevante a considerar. Por otro lado, no habría que descartar un error sistemático en la determinación de HC en mujeres, ya que suelen tener en general menor altura que los hombres y es probable que sea más difícil de detectar un retardo en el crecimiento, así como alteraciones en las gónadas (que en los hombres se puede identificar por micropene y criptorquidismo), ya sea por los médicos, o también por los padres al momento de decidir consultar. Sin embargo, no encontramos, al día de la fecha, trabajos que hayan planteado o analizado esta hipótesis. Respecto a la edad de diagnóstico de estos pacientes, encontramos un desvío estándar grande, con rangos que llegan hasta la adultez, dando indicios de una cierta dificultad para realizar el diagnóstico en algunos pacientes.

La deficiencia hormonal más común en nuestros pacientes es de GH (80-100%), coincidiendo con el retraso del crecimiento observado en la mayoría de los pacientes, seguidas de las deficiencias de TSH (58-60%) y ACTH (41-48%). Es probable que la proporción de pacientes con falta de GH u otras hormonas sea mayor al reportado, ya que contamos con algunas historias clínicas incompletas.

La secuenciación por smMIPs resultó muy buena, con una profundidad promedio alta (mayor a 500X), y con sólo 24 muestras que no pasaron los filtros de calidad. Las muestras restantes poseían una cobertura horizontal alta, indicando que la mayor parte de las bases capturadas por el panel fueron debidamente secuenciadas, y un alto porcentaje de mapeo contra el genoma de referencia humano, mostrando bajo nivel de contaminación. Las variantes de interés con cobertura mayor a 20 fueron validadas por secuenciación de Sanger (Fig. Suplementaria 2), además de las variantes en los casos 28 y 29 fueron detectadas tanto por la secuenciación de smMIPs como por WES ó WGS. Luego de la priorización de variantes, hallamos 205 variantes candidatas a explicar la patología en 149 probandos individuales (56% de los casos), de las cuales la mayor proporción eran variantes de significado incierto (89%) y una baja proporción de variantes patogénicas o posiblemente patogénicas (9%) (Fig 22). Es importante destacar que al haber sido 170 pacientes secuenciados con el panel de 67 genes del 2016, es probable que nos hayamos perdido variantes ubicadas en los genes del panel extendido en estos pacientes, que podrían haber aumentado el número de variantes candidatas a explicar los fenotipos individuales.

El gen *PROP1* es una de las causas más comunes de CPHD a nivel mundial (Wu et al. 1998) (Deladoëy et al. 1999), sin embargo la frecuencia de mutaciones en este gen varía enormemente en base a la etnia, con altos niveles en cohortes de Lituania (65%) y Rusia (46%), y menos de 1% en Reino unido, Alemania, Japón y Corea (De Rienzo et al. 2015) (Dusatkova et al. 2015) (Navardauskaite et al. 2014). Las poblaciones españolas e italianas, dos de los mayores componentes de la fracción europea de la población argentina, suelen tener también proporciones bajas de mutaciones en *PROP1* (De Rienzo et al. 2015) (Coya et al. 2007). En nuestra cohorte encontramos tan sólo dos variantes VUS en este gen: *PROP1*:c.551C>A, p.Ala184Asp en el paciente 8 y *PROP1*:c.276G>C, p.Gln92His en el paciente 27, ambas detectadas en heterocigosis, lo que no explica del todo el fenotipo observado, ya que la mutaciones en este gen suelen aparecer con un patrón de herencia autosómico recesivo. Además, corroboramos que la captura de las regiones exónicas del gen y la profundidad de secuenciación fuera correcta (Fig. Suplementaria 1), por lo que la

baja proporción de variantes encontradas no se debe a una subdetección de parte de nuestra metodología. **Este resultado parece indicar que la prevalencia de mutaciones en *PROP1* en distintas poblaciones, se deben en su mayor parte a efectos fundadores y una alta tasa de portadores de la variante (que la población Argentina no comparte), más que a un “hot-spot” mutacional en el gen. Este resultado muestra el valor de realizar estudios genéticos en la población local.**

Nuestro estudio descubrió, por otro lado, una variante en el gen *GH1* compartida por 3 familias no relacionadas (Fig. 26, Tabla 8): la familia del caso 19 con tres generaciones afectadas, la familia del caso 20 con madre e hijo afectados, y el probando del caso 21, aparentemente esporádico, todos con deficiencia aislada de hormona de crecimiento tipo 2 (autosómica dominante). La variante, GH1:pR209H fue previamente reportada en una familia turca de tres generaciones (Deladoëy et al. 2001), en dos familias no relacionadas de ascendencia árabe y judía ashkenazi (Hess et al. 2007) y también en dos pacientes no relacionados de Argentina con IGHD (Marino et al. 2003). Los individuos con esta variante exhiben fenotipos variables, con portadores en la misma familia presentando alturas con -4,5 a -1,0 SDS (Hess et al. 2007). Mientras que todos los portadores de los casos familiares reportados en este trabajo presentan estatura baja severa, el caso esporádico de la familia 21 presenta padres aparentemente no afectados, consistente con los reportes de expresividad variable de este alelo. No se encontraron deficiencias adicionales de hormonas hipofisarias en estos pacientes y todos los pacientes respondieron correctamente a la terapia de reemplazo hormonal según indicaron los médicos. Estos resultados y los reportes previos de esta variante ya encontrada en familias argentinas, sí puede indicar un efecto fundacional en la región. Según los estudios funcionales realizados por (Deladoëy et al. 2001), la variante GH1:p.R209H permite una secreción de GH efectiva en respuesta a la estimulación por cAMP, pero en caso de coexpresión con la proteína normal, la secreción se ve significativamente reducida, lo que sugiere una interferencia de la variante missense en la agregación de las proteínas de GH necesaria para la formación de los gránulos secretores, explicando así el efecto dominante negativo de esta variante.

Un caso particularmente interesante es el paciente 24, con manifestaciones clínicas compatibles con Síndrome de Beck-Witherthmann: hipoglucemia, hepatomegalia y nefromegalia, macroglosia, fontanela anterior amplia y hernia umbilical. Lo que intrigaba a los médicos, sin embargo, era la falta de sobrecrecimiento asociada típicamente a esta patología. El diagnóstico de SBW fue confirmado por MS-MLPA (Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación - metilación específica), detectando una disomía parental del cromosoma 11 (datos no mostrados). Este paciente fue entonces incluido en el estudio de alteraciones genéticas por smMIPs para intentar explicar la deficiencia de hormona de crecimiento asociada que contrarrestó el sobrecrecimiento por SBW. De esta forma detectamos la variante de sitio donador de splicing en el gen del receptor de la hormona liberadora de GH *GHRHR*:c.57+1G>A en homocigosis, una variante que ya se encuentra previamente asociada a IGHD, particularmente en Brasil (Salvatori et al. 1999) (Aguiar-Oliveira et al. 1999) (Gondo et al. 2001). Es curioso notar que ésta, es la única variante patogénica que detectamos en los 265 pacientes de manera homocigota, por lo que si bien, existen genes asociados a HC con herencia autosómica recesiva, no parecería ser la causa más común, al menos en la población argentina.

En resumen, los paneles de smMIPs resultaron altamente eficientes a la hora de hallar variantes candidatas a explicar la patología de los pacientes. Con esta técnica pudimos secuenciar y analizar muchos más pacientes de lo que habríamos podido

realizar si sólo hubiéramos trabajado con exomas o genomas completos, no sólo por los costos, sino por el enorme volumen de datos a procesar, almacenar y analizar. Esto es enormemente útil a la hora de trasladar estas técnicas al ambiente clínico, permitiendo realizar paneles de secuenciación a numerosos pacientes, a un costo reducido, y seleccionando los genes más importantes a analizar, con un panel propio, customizable y expandible, sin recurrir a los paneles de compañías que muchas veces no evalúan todos los genes de interés, tardan en actualizarse y suelen tener costos elevados. Con este trabajo brindamos clara evidencia de su utilizad como herramienta diagnóstica.

La relevancia de los ensayos funcionales

Dentro de las variantes que representan VUS, realizamos ensayos funcionales para validar los efectos a nivel proteico de los factores de transcripción LHX3, LHX4 y GLI2, y de la enzima PNPLA6, el cual nos planteamos como segundo objetivo de esta tesis. En el gen LHX3 se identificaron tres variantes en cuatro pacientes, LHX3:c.559C>T, p.Pro187Ser, LHX3:c.658C>A, p.Leu220Met y LHX3:c.301G>A, p.Gly101Ser, de las cuales se realizaron ensayos funcionales de las dos primeras. La variante p.Pro187Ser se encuentra en un residuo conservado evolutivamente, particularmente en el homeodominio de la proteína, con función de unión al ADN. El cambio en la estructura proteica identificaba una posible desestabilización de la estructura al reemplazar la prolina 187, ubicada en un bucle hélice-giro-hélice por una serina sin las propiedades estructurales del aminoácido original. Por el otro lado, la variante p.Leu220Met, si bien se encontró en dos pacientes no relacionados, se encuentra fuera de un dominio establecido, con un cambio aminoacídico poco disruptivo. En los ensayos funcionales de activación del reportero de luciferasa bajo regulación del promotor de α GSU, se observó una disminución en la actividad de la proteína con la variante p.Pro187Ser y no así con p.Leu220Met, respecto a la versión WT. La localización de ambas proteínas al núcleo se da de manera correcta, por lo que la falta de actividad de la primer variante probablemente se deba a una menor estabilidad como podría evidenciarse por la menor intensidad de la banda de esta variante en el WB, ó a una menor interacción con el ADN (Fig. 30). Si bien no lo testeamos, estas hipótesis podrían evaluarse por WB inhibiendo el complejo proteasoma, y por un ensayo de EMSA (ensayo de cambio de movilidad por electroforesis), ó alternativamente por inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR cuantitativa de la región promotora de α GSU, respectivamente. **En base a estos resultados, la clasificación de la variante p.Pro187Ser pasa a ser posiblemente patogénica (según los criterios del ACMG), mientras que las otras variantes continúan con su clasificación como VUS (la evidencia del ensayo funcional sin diferencia a la proteína WT no es suficiente para convertirla en posiblemente benigna por el momento).** Los casos previamente reportados por variantes en LHX3 se dan con una herencia autosómica recesiva, a veces incluyendo sordera o rotación del cuello reducida, lo que no se encuentra en el paciente 1. Se han descrito sólo dos mutaciones en heterocigosis en este gen (Jullien et al. 2018) en pacientes con un fenotipo de CPHD leve. Esto podría sugerir que la variante p.Pro187Ser causa un fenotipo de estas características, o que existen otros factores genéticos o ambientales que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Con respecto a LHX4, identificamos seis variantes en cinco casos distintos: LHX4:c.91G>A, p.Ala31Thr, LHX4:c.300G>T, p.Gln100His en supuesta heterocigosis compuesta y LHX4:c.611G>T, p.Trp204Leu, LHX4:c.251G>A, p.Arg84His, LHX4:c.812A>G, p.Asn271Ser, LHX4:c.886G>A, p.Gly296Arg en heterocigosis simple. Testeamos, en un ensayo similar al

realizado para LHX3, la habilidad de tres de estas variantes en activar la expresión del gen de la luciferasa bajo el promotor del gen *GH1*. Demostramos que las tres variantes p.Arg84His, p.Gln100His, and p.Trp204Leu son hipomórficas y disminuyen la activación transcripcional del gen reportero, sin actuar de manera dominante negativa. Es decir, mantienen la funcionalidad del alelo WT en caso de encontrarse ambos presentes a la vez (Fig 31). Por ensayo de inmunofluorescencia detectamos que tanto LHX4 WT como las variantes se localizan en el núcleo y por Western Blot detectamos que la expresión de las variantes es similar al WT, por lo que concluimos que el efecto de las variantes puede deberse a la capacidad de unión al ADN ó un menor efecto en transactivación. Al igual que para el caso de las variantes de LHX3 esto se podría resolver con un ensayo de EMSA o inmunoprecipitación de la cromatina. **Con estos resultados, ahora la clasificación de las variantes LHX4:p.Gln100His y LHX4:p.Trp204Leu pasan a ser Patogénicas y la variante LHX4:p.Arg84His posiblemente patogénica.** Otra mutación en el residuo de esta última variante, p.Arg84Cys fue previamente reportada asociada a CH y también se demostró que presentaba un defecto en la función de transactivación (Pfaeffle et al. 2008). La variante p.Arg84His se encuentra presente en baja proporción en bases de datos poblacionales (gnomAD= 0.00004961), por lo que el efecto patogénico que observamos podría presentar baja penetrancia, con otros factores genéticos o ambientales teniendo alguna influencia sobre el desarrollo de la enfermedad. En este contexto es interesante remarcar que en tres de los pacientes con variantes en LHX4 identificamos otras variantes de interés que podrían contribuir al fenotipo de una manera oligogénica: una variante en *PROP1*, una en *FGFR1* y una en *GLI2*. Si bien la variante en *GLI2* parece ser posiblemente benigna, las variantes en los otros genes no se encuentran en bases de datos, con *PROP1* siendo un gen muy importante en el desarrollo de HC como se mencionó anteriormente y *FGFR1* asociado a deficiencia de gonadotropinas, con un tipo de herencia autosómico dominante (Dodé et al. 2003). Sin embargo, el paciente 6, quien porta esta última mutación, no tiene deficiencia de estas hormonas. Por último, el paciente 5, en el cual se encontraron dos mutaciones en LHX4 y ninguna de interés en otro gen, presenta un fenotipo de SOD, el cual no es común en mutaciones en este gen, pudiendo también indicar una enfermedad multigénica que contribuya al fenotipo total que no logramos detectar.

Para el análisis funcional de variantes en *GLI2*, generamos una línea reportera con expresión de la proteína fluorescente GFP exclusivamente en presencia de *GLI2* en su forma activa. La línea original NIH/3T3-CG (Pusapati et al. 2018), aumenta los niveles de expresión de GFP al activarse la vía de señalización de SHH mediante el agonista de Smoothened "SAG". Utilizamos la técnica de CRISPR-Cas9 para realizar un *knock-out* del gen *Gli2* endógeno, obteniendo mutaciones loss-of-function en los tres alelos del gen (la línea celular es triploide para esta región). El *knock-out* del factor de transcripción eliminó por completo la inducción de expresión de GFP por SAG, mientras que la transfección de plásmidos de expresión de *GLI2* humano WT, restauró la expresión de GFP. Utilizamos esta nueva línea celular para evaluar la capacidad de transactivación de tres de las cinco variantes halladas en este gen en pacientes secuenciados por smMIPS: c.607G>A; p.Ala203Thr ubicada en el dominio represor, c.2281C>T; p.Leu761Phe ubicada en el centro de la proteína, cercana al sitio de acetilación de *GLI2*, y c.4207_4220dup; p.Ser1404fs ubicada en el sitio de transactivación. Al transfectar estas células con los plásmidos de expresión de las distintas variantes observamos que la variante de frameshift p.Ser1404fs era la única en no activar la expresión de GFP, mientras que las variantes p.Ala203Thr y p.Leu761Phe lo hacían a niveles equiparables al WT (Fig. 35). **Debido a esto, las interpretaciones de ACMG de las variantes p.Leu761Phe y c.4207_4220dup se**

mantienen como VUS y Patogénica respectivamente, mientras que la variante p.Ala203Thr pasa a tener significancia Benigna. En este ensayo también detectamos que al momento de la transfección, el agregado de SAG no influía en el nivel de GFP expresado, la transfección era suficiente para activar la expresión. Hipotetizamos que la cantidad de GLI2 producida por el plásmido, bajo un promotor de expresión fuerte, satura el mecanismo de regulación de la actividad de GLI2, encontrándose constitutivamente activo, independientemente de la activación de la vía de señalización de SHH. En el capítulo 3, al cambiar la forma de incorporación de GLI2 a las células, utilizando un vector lentiviral, con el cual mediante una baja multiplicidad de infección se puede conseguir células con tan sólo la incorporación de una única copia de cDNA de GLI2, logramos restaurar la inducción de GFP dependiente de SAG, confirmando la hipótesis del primer modelo utilizado. El modelo de transfección por plásmidos de expresión entonces funciona para determinar la funcionalidad del factor de transcripción en su capacidad de unirse al ADN y transactivar al gen reportero, pero no así en evaluar su comportamiento de interacción con las distintas proteínas regulatorias de la vía de señalización de SHH.

La variante p.Leu761Phe es particularmente interesante que no haya afectado la actividad transcripcional de GLI2, ya que hay indicios de la patogenicidad de esa variante al encontrarse en otros pacientes con CPHD y malformaciones craneofaciales ([Paulo et al. 2014](#)) ([Simioni et al. 2014](#)). Siguiendo la idea de pensamiento de que algunas variantes en GLI2 pueden alterar no su función transcripcional, sino la regulación del procesamiento de la forma activa a reprimida o viceversa, evaluamos la habilidad de la variante p.Leu761Phe en afectar la acetilación de la proteína. Previamente [Coni et al 2013](#), indicaron que la Lys757 es acetilada por la acción de la acetil-transferasa p300, disminuyendo la capacidad de GLI2 de activar la expresión de un gen reportero de luciferasa. Hipotetizamos que la variante p.Ley761Phe, al encontrarse cercana al sitio de acetilación, podría influir en esta vía de regulación. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de GLI2 y revelado con un anticuerpo anti lisina acetilada, observamos una marcada reducción de la acetilación en p.Leu761Phe respecto a la proteína WT (Fig. 36). Sin embargo, al querer replicar los resultados del trabajo de Coni et al., nos encontramos con la situación inversa. Al realizar co-transfecciones de GLI2 WT o mutante en presencia de p300, la expresión de GFP reportero aumentó de manera significativa respecto a un control cotransfectado con pCAF, una acetil-transferasa que no posee sitios de reconocimiento en GLI2 (Fig. 37). Estos resultados indican que si bien GLI2:p.Leu671Phe no es acetilada a los niveles de la proteína WT, tiene una actividad comparable a la proteína WT tanto en presencia de p300 como en su ausencia, por lo que ambos ensayos funcionales realizados no aportan evidencia de la patogenicidad de esta variante. En un estudio de screening de knock-outs, usando la misma línea reportera que utilizamos en este trabajo, [Pusapati et al. 2018](#) utilizan la técnica de CRISPR-Cas9 para eliminar la función de distintos genes que podrían contribuir positiva o negativamente a la vía de señalización de SHH. La proteína p300, al ser eliminada del sistema, no afecta en gran medida a la expresión de GFP, y si lo hace, sería de manera positiva, aumentando su expresión (en Pusapati et al. log-fold change= 0,61556, p-valor = 0.06), concordando con nuestros resultados. Estos experimentos indicarían que si bien GLI2 es efectivamente acetilado, la acetilación por sí sola no modifica la actividad de GLI2 de trans activar un gen reportero GFP.

El último ensayo funcional realizado en el marco de esta tesis, corresponde a la determinación de una variante de splicing en el gen *PNPLA6* hallada en una paciente con CPHD y retinitis pigmentosa. En la secuenciación por smMIPs se identificó una variante

missense *PNPLA6*:c.3343A>C, p.Thr1115Pro heredada de la madre, y mediante secuenciación de genoma completo, se encontró la variante de splicing c.3428-44G>A, p.Pro1142_Ala1143ins14 en trans, heredada del padre, completando el genotipo para una enfermedad de tipo autosómica recesiva por heterocigosis compuesta. La variante missense fue evaluada por el equipo del Dr. Hufnagel, concluyendo que la enzima pierde completamente la actividad de esterasa en la hidrólisis del fenil-valerato respecto a la proteína WT (Fig. 38). Por otro lado, la determinación de la variante de sitio de splicing intrónica fue realizada mediante la amplificación de un segmento del transcrito de *PNPLA6* a partir de sangre periférica, donde la enzima también se expresa. En este ensayo, tanto en el padre como la probando, ambos con la mutación intrónica, mostraron la presencia de dos bandas correspondientes a los dos alelos, debido a un splicing aberrante, congruente con la adición de 42 nucleótidos incorporados por el nuevo sitio aceptor de splicing. Si bien no contamos todavía con los ensayos enzimáticos de la proteína con la incorporación de los 14 aminoácidos, al encontrarse en el sitio catalítico de la proteína, estar en baja frecuencia en base de datos poblacionales, evidenciarse el efecto en el splicing y encontrarse en trans con una variante patogénica, se determina que esta variante también es patogénica. Es importante destacar, que si bien el caso fue resuelto en última instancia por una secuenciación de genoma completo, la incorporación del caso en la cohorte por smMIPs contribuyó de manera clave a enfocar el rumbo para la resolución final, habiéndose encontrado primero la mutación missense compartida con la madre, y con una relación genotipo-fenotipo muy evidente para el equipo médico, que dio una hipótesis clara sobre lo que se debía buscar en el genoma.

Ensayos funcionales masivos en splicing alternativo en *POU1F1*

En esta tesis dedicamos un capítulo entero a realizar ensayos funcionales de un puñado de variantes halladas durante la secuenciación por NGS de pacientes con IGHD y CPHD. Estas variantes típicamente representan VUS, en donde el mero hallazgo en el ADN del paciente de la variante no indica una causalidad del fenotipo observado. El ensayo funcional permite en algunos casos asociar la variante a un efecto en la función proteica que pueda extrapolarse al paciente, aunque, al realizarse luego del primer reporte de la variante, en el ambiente clínico, la clasificación final de patogenicidad se obtiene tarde para el paciente y la familia que espera el resultado. En esta época de crecientes datos genómicos dentro y fuera de la clínica, en donde la mayor parte de las variantes reportadas no tienen un efecto certero sobre el fenotipo, resulta imperativo tomar una acción proactiva y evaluar efectos de variantes antes de que sean observadas en algún paciente y generar un catálogo de estos efectos disponibles al momento de que sí sean detectadas para, de este modo, acortar los tiempos de incertidumbre.

En este contexto, nos planteamos evaluar los efectos de variantes de nucleótido único en el splicing alternativo del exón 2 del factor de transcripción específico de la hipófisis *POU1F1*. Este gen posee un programa de splicing alternativo que genera dos isoformas funcionalmente distintas, la isoforma predominante, la alfa, con acción activadora de la transcripción, y una isoforma beta, con la adición de 26 aminoácidos en el dominio de transactivación, que posee función represora (Schanke et al. 1997) (Wallis 2018). Aunque este splicing alternativo se mantiene conservado evolutivamente, se desconoce actualmente la significancia funcional en un contexto fisiológico de la isoforma beta.

Para evaluar el efecto de SNVs en este exón nos valimos de un ensayo de *exon trapping*/minigen, en el cual las distintas variantes fueron incorporadas por mutagénesis masiva, seguido por secuenciación *high-throughput* de los resultados de splicing en ARN. Evaluamos la totalidad de variantes de nucleótido único dentro del exon 2 de *POU1F1* y 131 pb de los intrones flanquantes, en su potencial efecto disruptor del splicing. Identificamos 96 SDVs y unas 36 SDVs intermedias, que incrementan el uso de las isoforma beta ó causan otros resultados aberrantes del splicing, tal como la pérdida del exón por *exon skipping*.

Este ensayo nos permitió además establecer la patogenicidad de una variante sinónima hallada en uno de los pacientes secuenciados por smMIPs y exoma completo. El paciente en cuestión, corresponde al caso 28 con la variante *POU1F1:c.150T>G* (p.Ser50=) y presencia de IGHD, variante y condición heredadas del padre, indicando una herencia autosómica dominante. **Este resultado cambia la clasificación de la variante de VUS a Posiblemente Patogénica.** Es interesante destacar, que del total de las posibles variantes sinónimas del exón 2, 26 resultaron ser SDVs en nuestro ensayo, subrayando **la importancia que pueden llegar a tener las variantes sinónimas en el splicing de este gen en particular, y de otros genes en general, siendo muchas de estas filtradas en los procesos tradicionales de análisis de exomas y genomas.**

La ausencia de una depleción significativa de SDVs en adultos sanos de la base de datos gnomAD puede indicar una posible expresividad variable o penetrancia incompleta de los SDVs en *POU1F1*. Esto es consistente con datos de bibliografía que pacientes con la misma variante pueden presentar IGHD ó CPHD (Turton et al. 2005). *POU1F1* actúa como un heterodímero (Holloway et al. 1995), por lo que algunas variantes dominantes en el gen actúan como variantes dominantes negativas, por la habilidad de la proteína mutante en interferir con la acción de la proteína WT producida por el otro alelo (Rhodes et al. 1993) (Cohen et al. 2006). Los efectos negativos de la isoforma beta de *POU1F1* en las propiedades de transactivación de la isoforma beta son muchas veces dependientes del contexto, presentando efectos distintos en los promotores de los genes Gh, Prl y Pou1f1 (Theill et al. 1992).

En genes humanos, los sitios canónicos de splicing contienen menos de la mitad de la información necesaria para un correcto splicing (Lim and Burge 2001). La especificidad adicional es provista por motivos cortos (de 6 a 10 pb) conocidos como *enhancers* o *silencers* exónicos o intrónicos, a los cuales se unen proteínas de unión al ARN que promueven o antagonizan el splicing en la región (Cartegni et al. 2002). Nuestro mapa de efectos del splicing nos permitió identificar un grupo de SDVs en el extremo 5' del exón 2 para la isoforma beta que incrementan la proporción de esta isoforma. Estos resultados sugieren la presencia de un sitio silenciador del splicing exónico (ESS), el cual normalmente suprime la utilización del sitio aceptor de splicing para la isoforma beta. No consideramos que existan factores específicos al tipo celular que puedan estar involucrados en el ensayo de minigen, ya que la relación de isoformas alfa y beta en el ensayo de transcritos WT es similar en células COS7 como en la glándula hipofisaria (Theill et al. 1992). En futuros análisis podría evaluarse los motivos conocidos de unión de factores de splicing en el exón 2 de la isoforma beta que podrían estar involucrados en el splicing diferencial.

La disrupción del splicing usualmente contribuye de manera minoritaria pero significativa a las causas genéticas de enfermedades endocrinas, y a enfermedades genéticas humanas en general (Scotti and Swanson 2015) (Cummings et al. 2017). Algunas estimaciones de estudios a gran escala indican que el 10% de los SNVs dentro de exones alteran el splicing,

y un tercio de todas los SNVs asociados a enfermedades tienen un efecto sobre la eficiencia del splicing (Soemedi et al. 2017). Las variantes cerca de los sitios canónicos de splicing son usualmente reconocidas como patogénicas, mientras que variantes exónicas más profundas ó distantes, que pueden tener efectos sobre el splicing son más difíciles de interpretar. Las herramientas predictoras de splicing como SpliceAI pueden, en algunos casos, ayudar a encontrar estas variantes. En este trabajo observamos una buena relación de los efectos predictores de esta herramienta con las proporciones de splicing de cada una de las isoformas. Además las dos variantes de splicing detectadas en las secuenciaciones de exomas y genomas enteros fueron correctamente identificadas por el algoritmo y luego comprobadas empíricamente.

Nuestros ensayos funcionales masivos del splicing ilustran de manera general que diferentes variantes en el mismo gen pueden llevar a distintos resultados del splicing, con consecuencias distintas, desde pérdida de función a efectos dominante-negativos, además de generar un catálogo entero del efecto estas variantes disponible para la comunidad científica y médica.

Ensayos funcionales masivos en GLI2

Para trasladar los conocimientos adquiridos durante el diseño del ensayo de MAVES para POU1F1, decidimos plantear un segundo ensayo masivo para determinar efectos de variantes en el factor de transcripción GLI2, del cual ya habíamos realizado ensayos funcionales de variantes individuales. Valiéndonos de la línea celular reportera construída en el Capítulo 2, nos propusimos poner a punto un experimento que nos permitiera dilucidar efectos individuales de cada una de las variantes. Por un lado, construimos un vector donador con la región codificante de GLI2, el cual va a servir de *backbone* para incorporar todas las variantes posibles de una región de interés por mutagénesis masiva de intercambio de cassette. Por otro lado, evaluamos la posibilidad de incorporar tan sólo una copia de vector codificante de GLI2 por medio de infección lentiviral. Observamos que los lentivirus son capaces de infectar a las células NIH/3T3-CG Gli2KO y de expresar GLI2 exógeno en presencia de doxiciclina. Además, la presencia de SAG en células infectadas, a diferencia de las células transfectadas con plásmidos de expresión, actúa sinérgicamente con la doxiciclina para elevar los niveles de GFP reportero. De esta forma, la infección lentiviral se vuelve un método eficiente para determinar no sólo la actividad transcripcional de GLI2, sino también efectos regulatorios sobre la vía de señalización de SHH. La única desventaja que nos encontramos ante esta situación fue la pérdida de expresión de GLI2 por el cassette lentiviral a los pocos pasajes después de la infección. Es probable que la maquinaria de defensa de las células esté silenciando los genes insertados. Nos proponemos en un futuro repetir los experimentos incluyendo un intrón artificial en la región codificante de GLI2 ó hacer un segundo noqueo de las células NIH/3T3-CG del gen HUSH, que se demostró que participa en el silenciamiento de transgenes sin intrones (Seczynska et al. 2021). Nos encontramos esperanzados de que este tipo de ensayo masivo nos permita generar un catálogo de variantes patogénicas en GLI2.

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo se consolidó como un proyecto completo desde el diagnóstico molecular por NGS de pacientes con hipopituitarismo congénito, hasta la determinación funcional de la significancia de las variantes encontradas, para volver circularmente sobre las primeras determinaciones de patogenicidad y llegar, de ese modo, a una conclusión final sobre la significancia clínica de las variantes encontradas.

Utilizamos distintas técnicas de secuenciación, paneles, exomas y genomas, surcando las ventajas y desventajas de cada una de ellas, y aplicamos numerosas tecnologías bioinformáticas para el análisis completo de cada paciente. Una de las conclusiones más importantes del trabajo es la evidencia de la diversa etiología genética que tiene el HC, presentando heterogeneidad genética, expresividad variable y penetrancia incompleta en la mayoría de los casos. Aún queda mucho trabajo por hacer para llegar al diagnóstico certero en la mayoría de los pacientes, tanto en los que se encontraron variantes candidatas para explicar la patología, como en aquellos en los que no. Creemos que el avance de ciencia básica en la búsqueda de nuevos mecanismos genéticos involucrados en el desarrollo de la hipófisis permitirá identificar nuevos genes asociados a la cascada de diferenciación, junto con la secuenciación de más pacientes en donde se detecten variantes en genes poco o no reportados asociados a la patología. Este trabajo apunta hacia esos objetivos, con numerosas variantes reportadas que necesitan y merecen evaluarse funcionalmente en experimentos *in-vitro* e *in-vivo*, de manera similar a lo realizado en esta tesis para los genes *LHX3*, *LHX4*, *GLI2*, *PNPLA6* y *POU1F1*. Actualmente, y como una evolución y continuación natural de la presente tesis, en el laboratorio de la Dra. Perez Millán, se están realizando ensayos funcionales en genes como *OTX2*, *HMGA2*, *FOXA2* y *SEMA3A*.

El análisis individual de variantes es un trabajo de nunca acabar, con más y más variantes VUS reportadas cada año. En nuestro trabajo, la mayor parte de las variantes reportadas son VUS, muchas de las cuales probablemente no sean vueltas a analizar. En este sentido, los ensayos masivos de efectos de variantes son una herramienta muy importante en la determinación de patogenicidad de variantes, tanto las ya existentes, como aquellas que pueden aparecer en el futuro. La pandemia de Sars-Cov-2 y la situación económica del país, sin duda tuvo su peso en el desarrollo de esta tesis, con muchos contratiempos que no nos permitieron ahondar más profundo en algunos temas o experimentos, siendo el caso de las MAVES en *GLI2* un proyecto que quedó “en cierto sentido” por la mitad. Sin embargo, los pasos de puesta a punto, el diseño, las construcciones y líneas celulares se encuentran avanzados a tal intento que es probable que muy pronto tengamos resultados al respecto.

Para cerrar, el trabajo realizado durante esta tesis fue plasmado en los siguientes papers en revistas internacionales:

- Pérez Millán, M. I., **Vishnopolska, SA.**, et al. (2018). Next generation sequencing panel based on single molecule molecular inversion probes for detecting genetic variants in children with hypopituitarism. *Molecular genetics & genomic medicine*.
- Sanguineti, N., Braslavsky, N., Scaglia, P., Keselman, A., Ballerini, M.G, Ropelato, M.G., Suco, S., **Vishnopolska, S.** et al. (2019) p.R209H GH1 variant challenges short stature assessment. *Growth Hormone & IGF Research*.
- **Vishnopolska, SA.**, et al. (2021). Comprehensive identification of pathogenic gene variants in patients with neuroendocrine disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
- Gergics P, Smith C, Bando H, Jorge AAL, Rockstroh-Lippold D, **Vishnopolska SA**, et al. (2021) High-throughput splicing assays identify missense and silent splice-disruptive POU1F1 variants underlying pituitary hormone deficiency. *Am J Hum Genet*.

Y contamos con manuscritos en preparación para reportar los resultados funcionales en los genes *GLI2* y *PNPLA6*.

- **Vishnopolska, SA.**, Camilletti, MA., Camper, S., Kitzman, J., Pérez Millán, MI. (En preparación) “Acetylation deficit in *GLI2* variant identified in pediatric patients with congenital hypopituitarism”
- **Vishnopolska, SA.**, Camilletti, MA., Liu, J., Hufnagel, R., Pérez Millán, MI. (en preparación) “Splice acceptor variant in *PNPLA6* in compound heterozygous state leads to combined pituitary hormone deficiency and retinitis pigmentosa in Argentinian patient”

ANEXO

Casos	170
Familiares	1 (3 pacientes)
Esporádicos	167
Edad Media (Rango)	5 (1-29)
Edad promedio	5,7
Género	
Masculino	101 (60%)
Femenino	69 (40%)
Diagnóstico principal	
IGHD	57 (34%)
CPHD	113 (66%)
Deficiencia Hormonal	
GH	170 (100%)
ACTH	70 (41%)
TSH	102 (60%)
Gonadotropinas (LH, FSH)	16 (9%)
PRL	8 (5%)
Resonancia magnética	
Adenohipófisis	
Hipoplasia	83
Ausencia	5
Normal	50
Neurohipofisitis	
Ectópica	56
Ausencia	20
Normal	60
Tallo	
Ausencia	35
Delgado	12
Interrumpido	4
Normal	70

Tabla Suplementaria 1: Resumen clínico de los casos analizados con el panel 2016

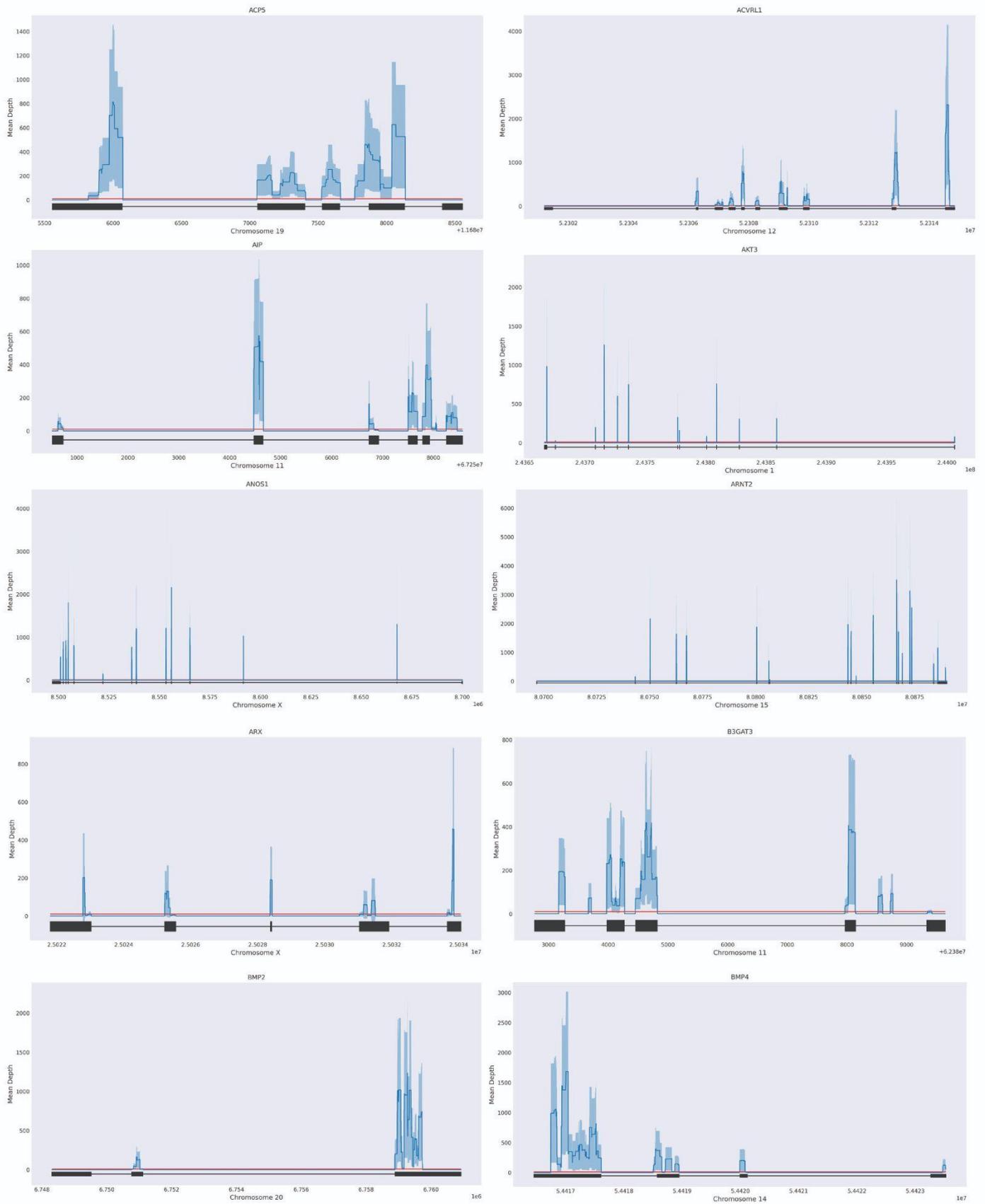


Figura Suplementaria 1

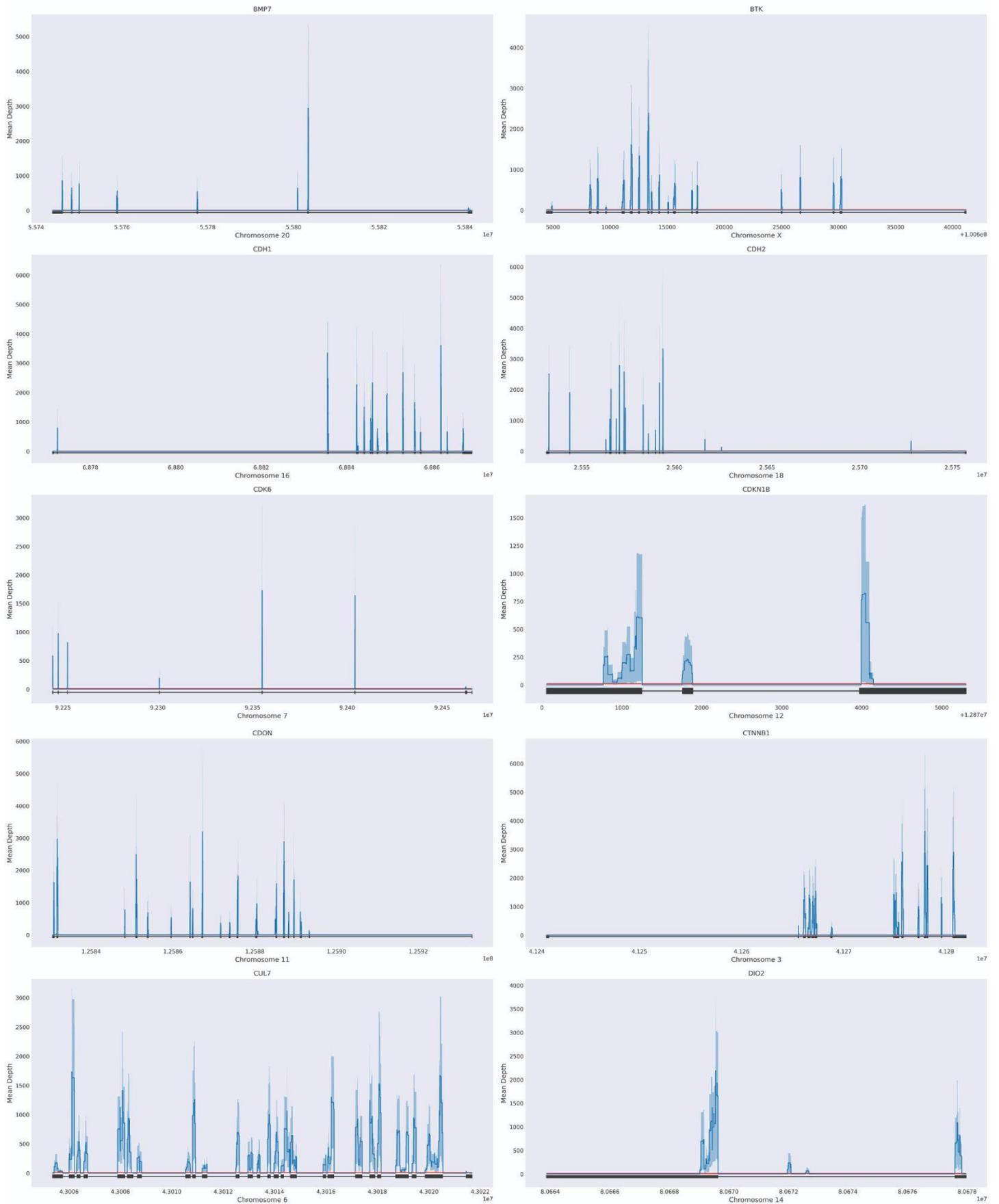


Figura Suplementaria 1 (cont)

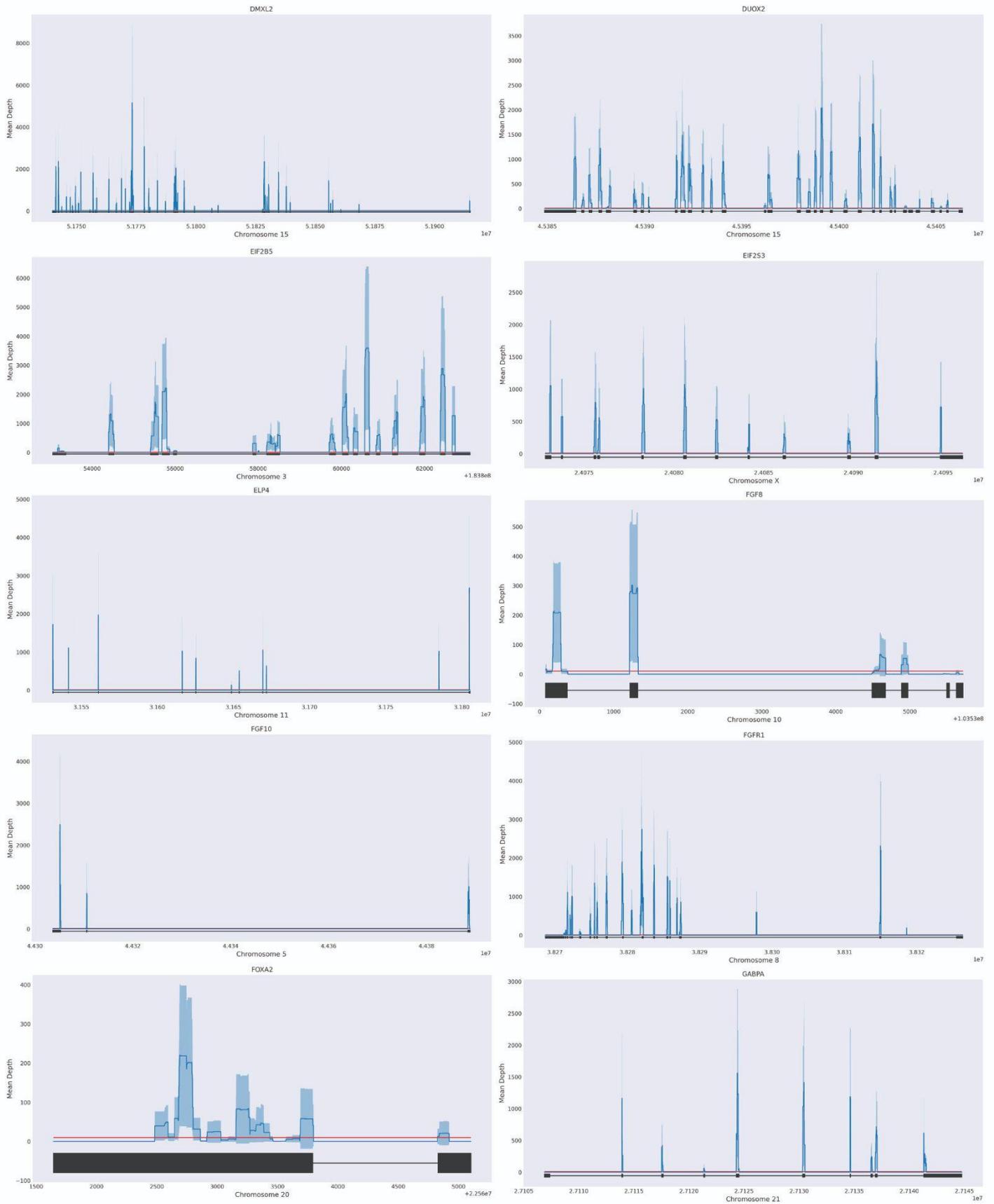


Figura Suplementaria 1 (cont)

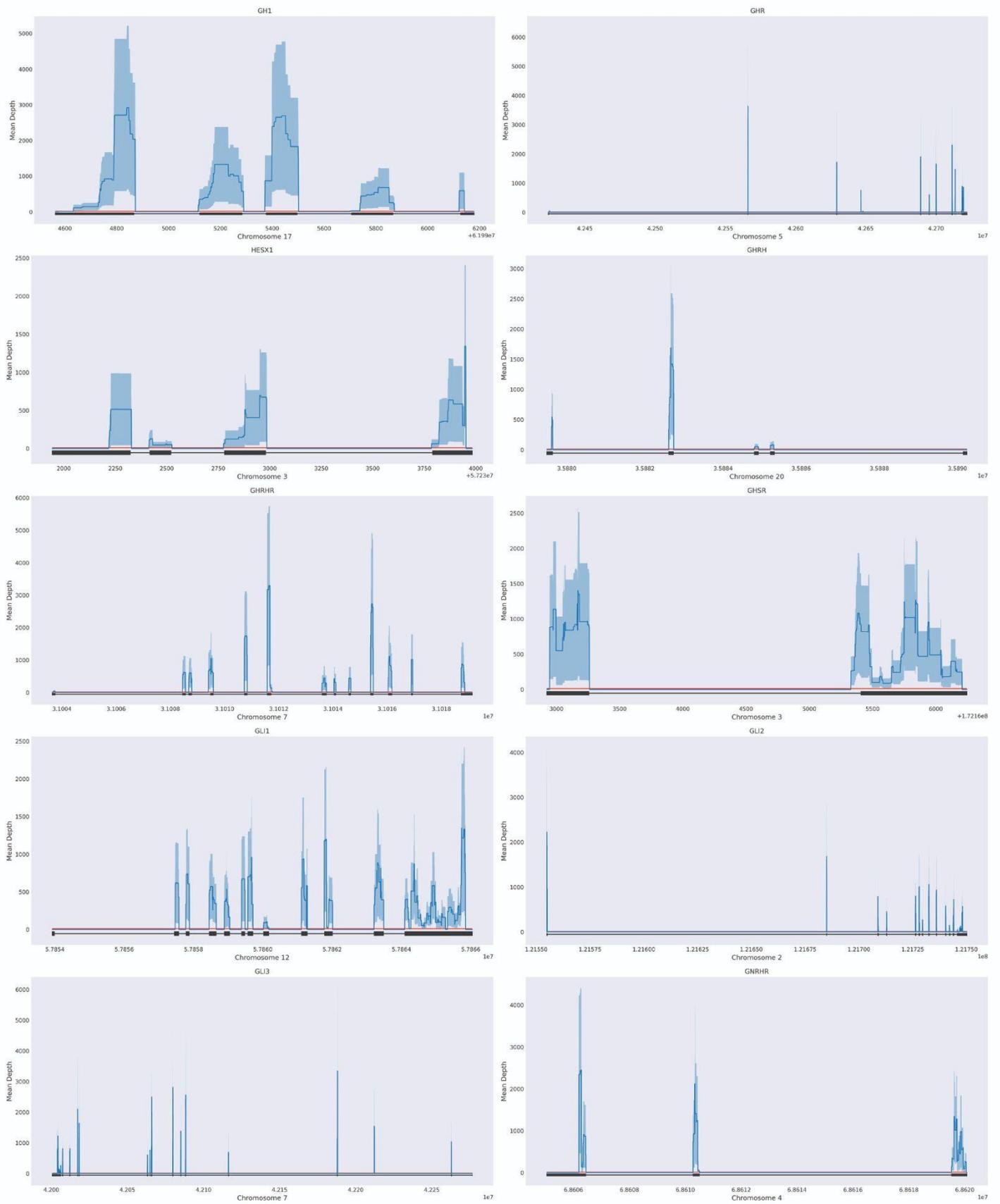


Figura Suplementaria 1 (cont)



Figura Suplementaria 1 (cont)

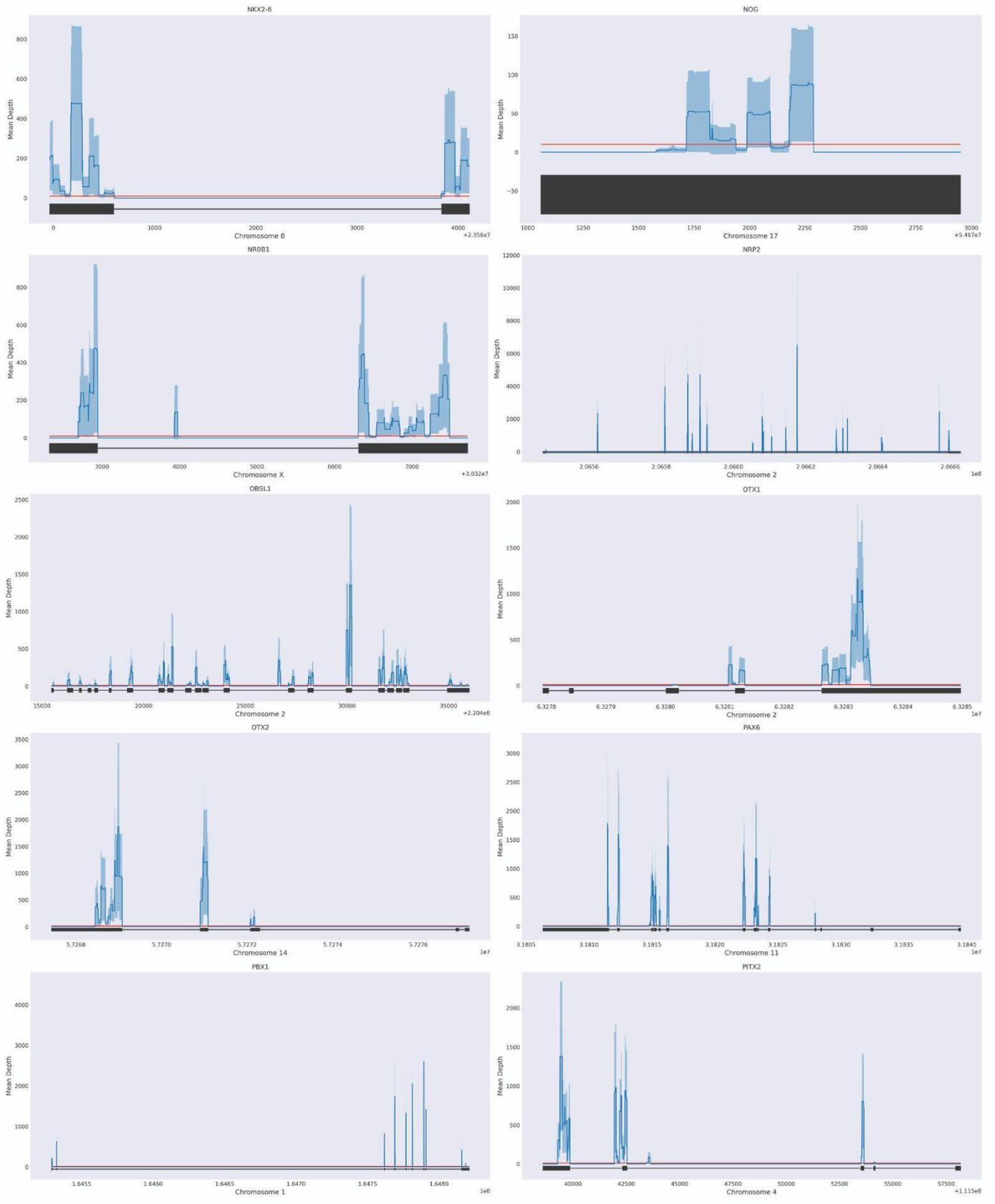


Figura Supplementaria 1 (cont)

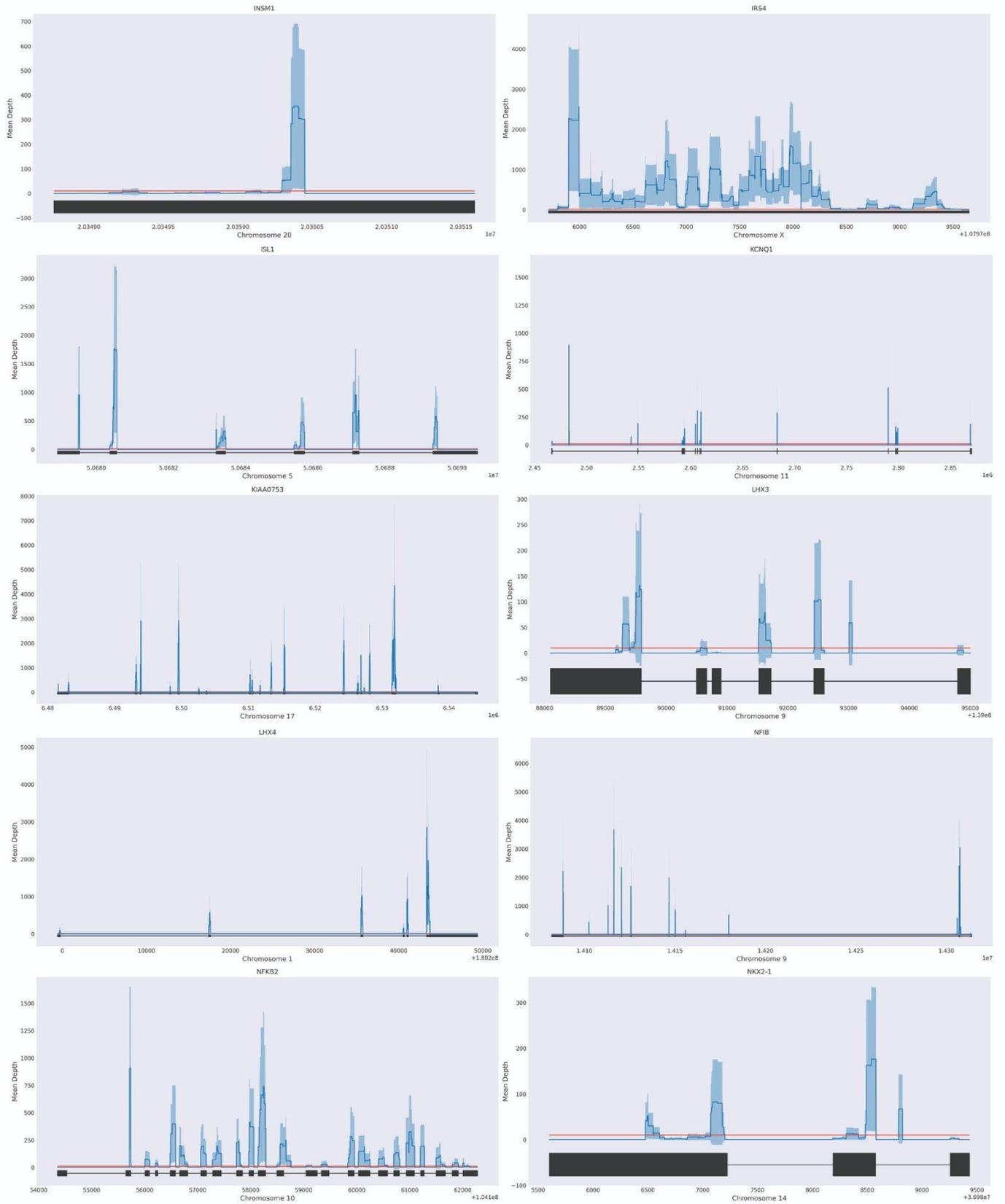


Figura Suplementaria 1 (cont)

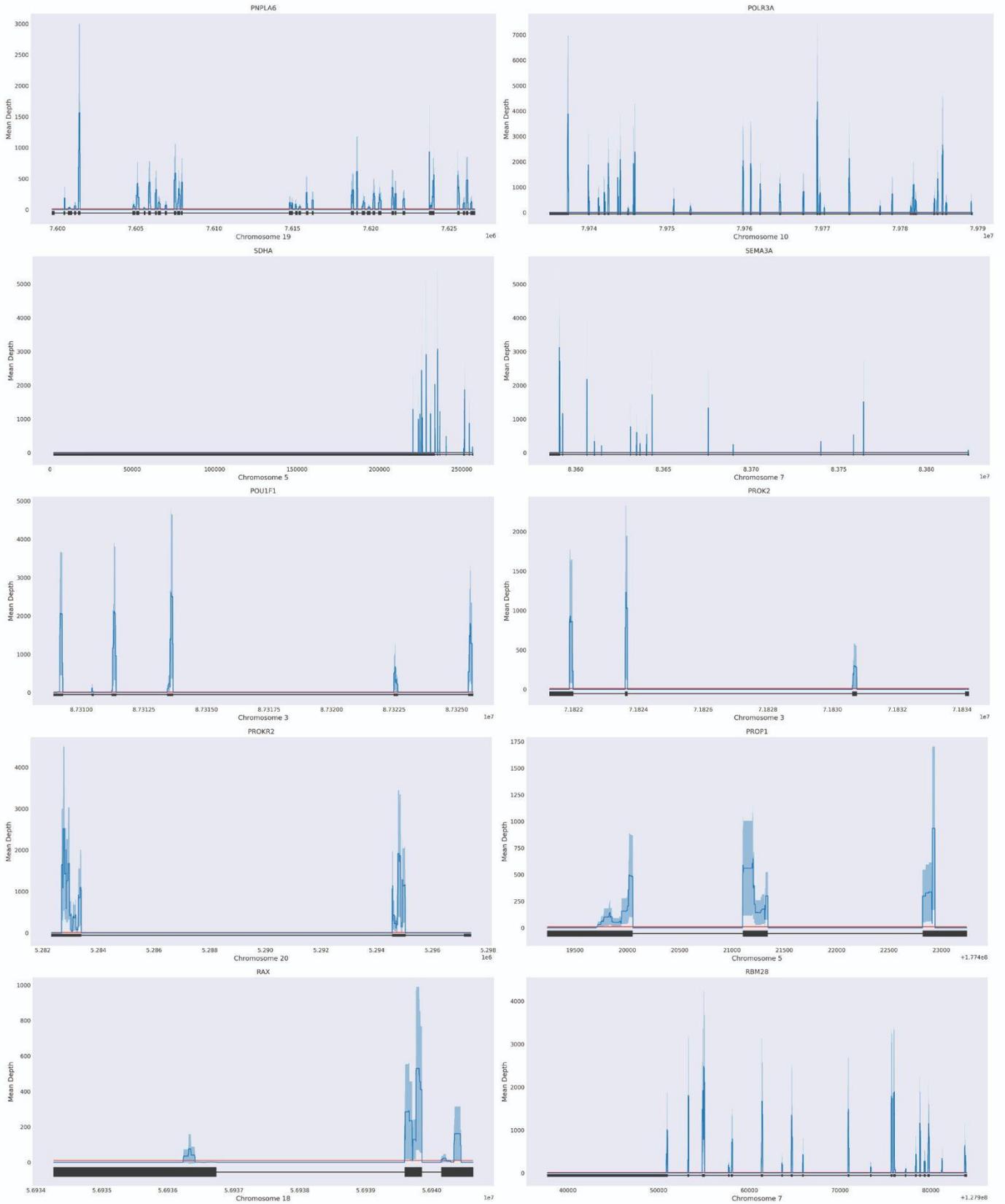


Figura Suplementaria 1 (cont)

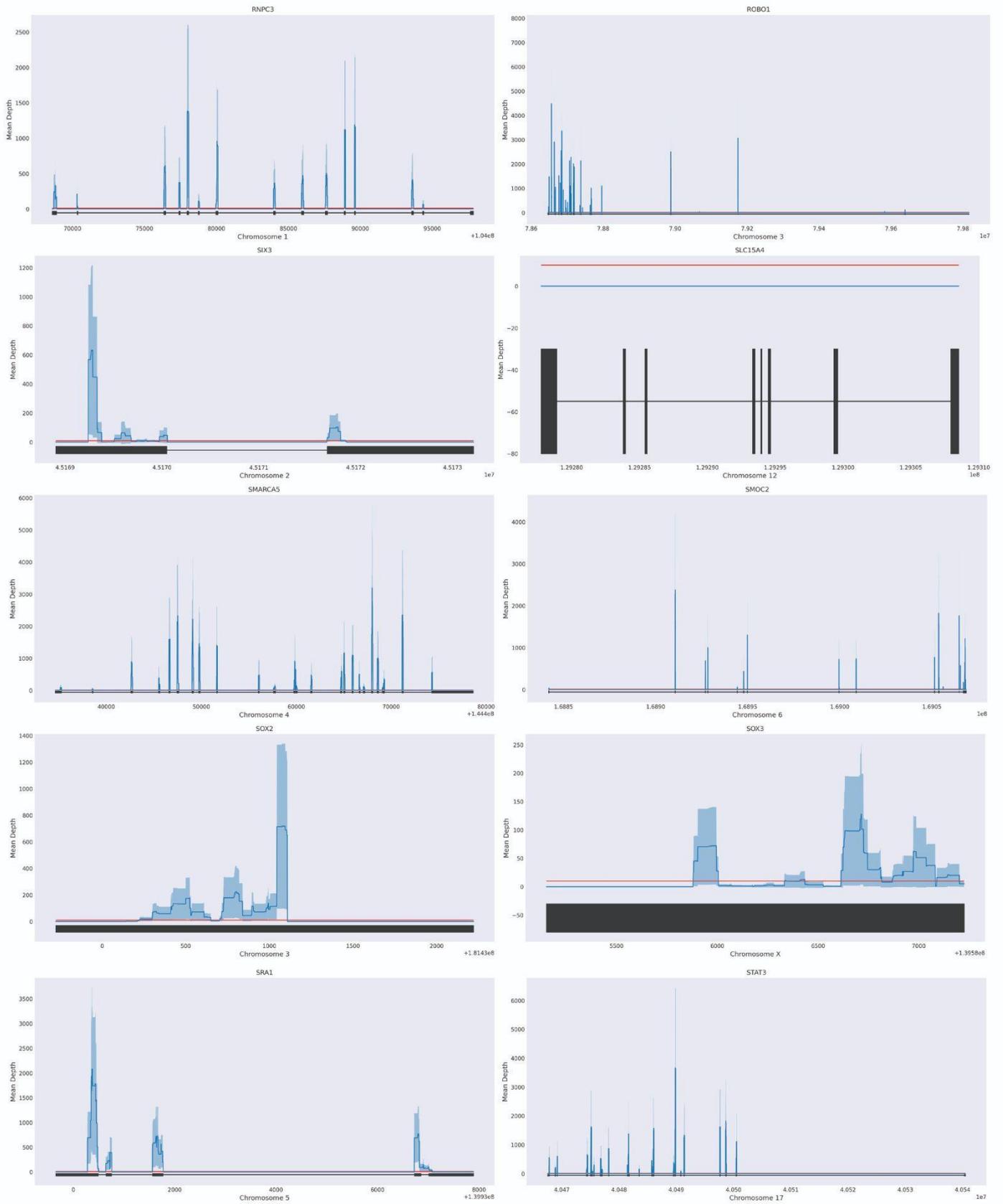


Figura Suplementaria 1 (cont)

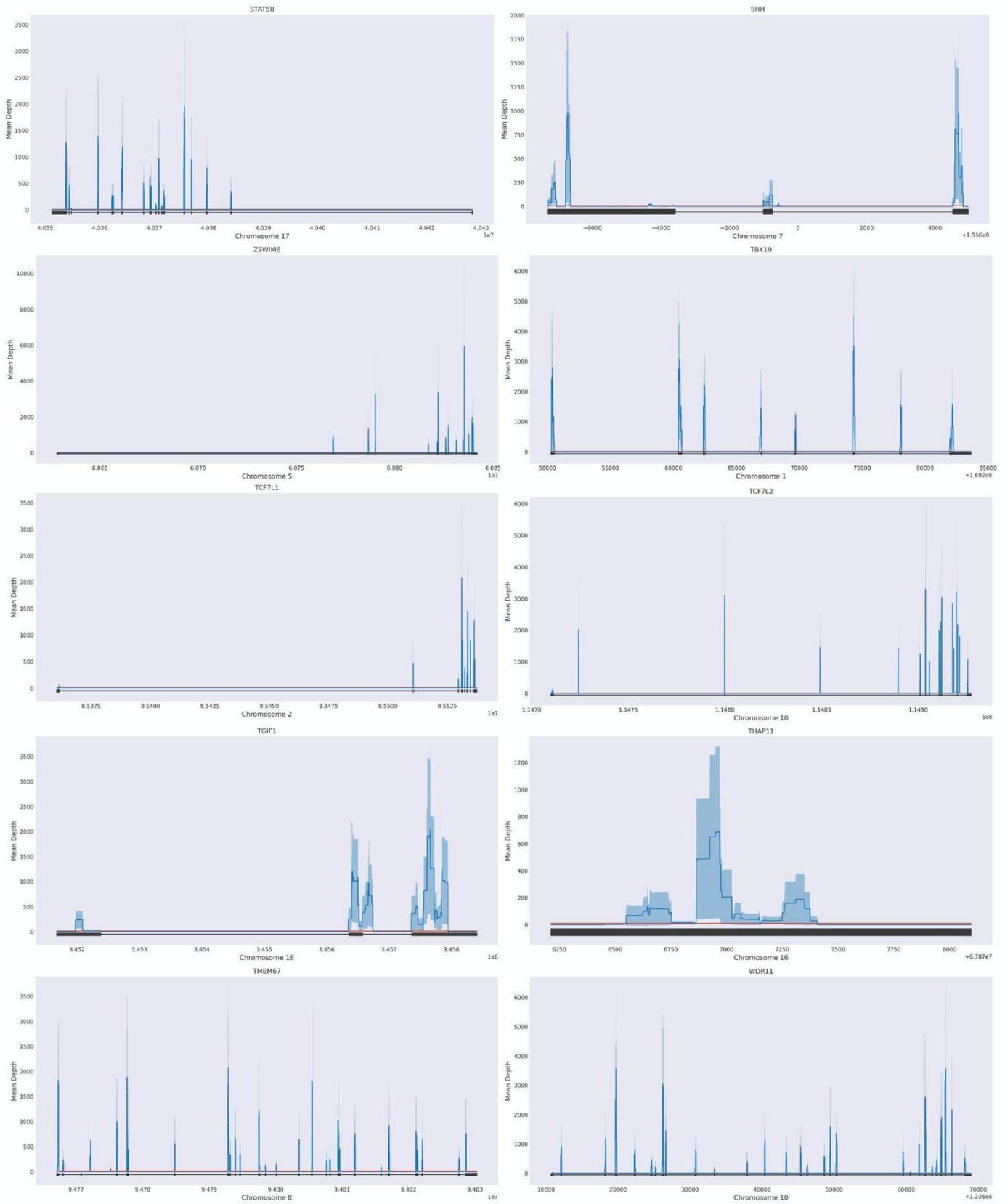


Figura Suplementaria 1 (cont)

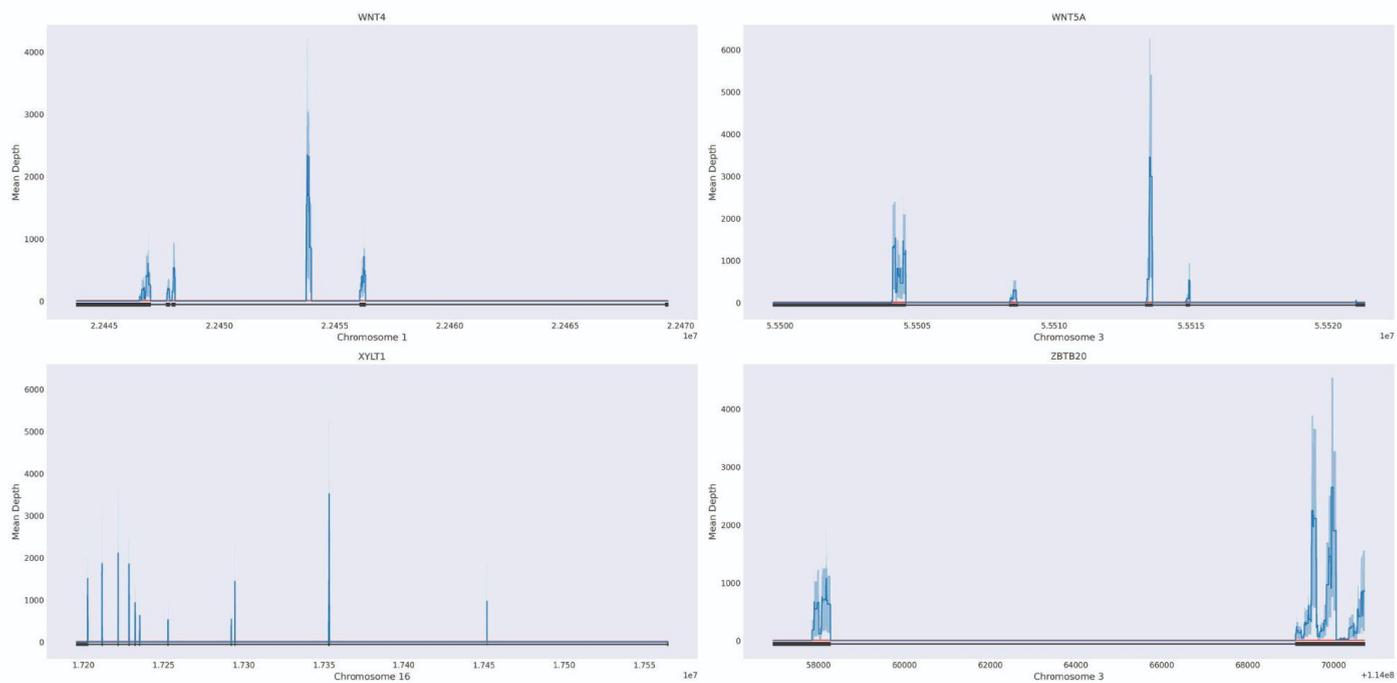
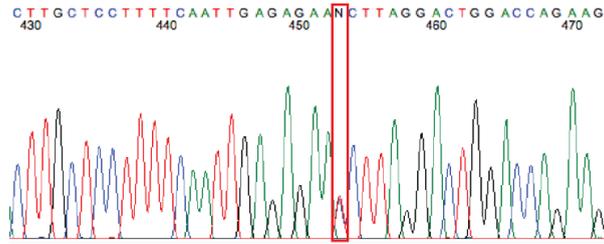
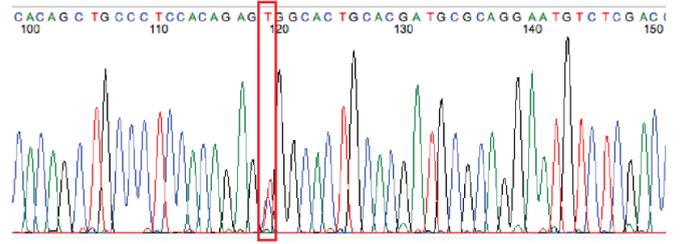


Figura Suplementaria 1: Profundidad promedio por gen incluido el panel de smMIPs. Se indica en línea azul la profundidad y en sombra azul la dispersión para cada posición en el genoma. La línea roja indica el mínimo que consideramos de buena calidad 10X de profundidad. Se indica en cajas negras unidas por líneas los exones del cada gen.

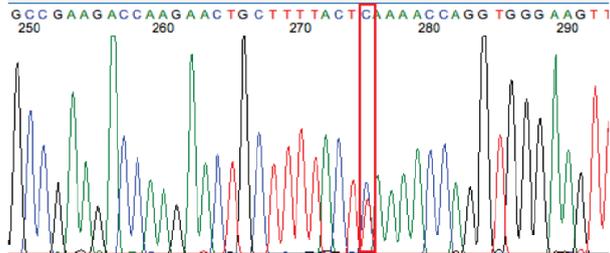
Caso 10 HESX1:c.77T>C, p.Ile26Thr Proband



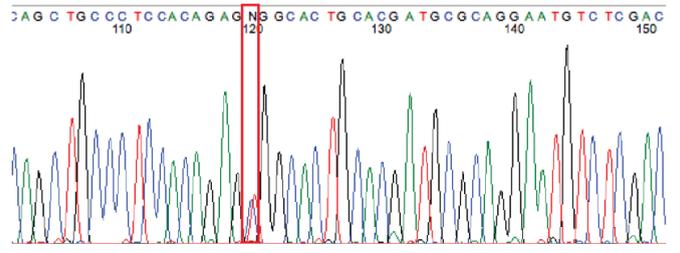
Caso 19 GH1:c.626G>A, p.Arg209His



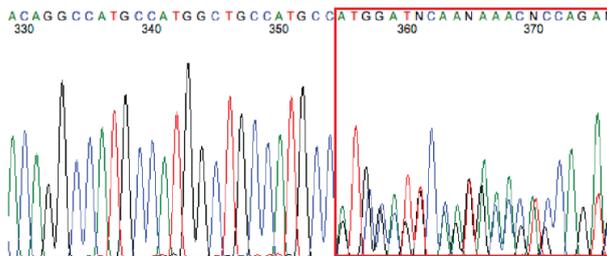
Caso 11 HESX1:c.349C>T, p.Gln117* Proband



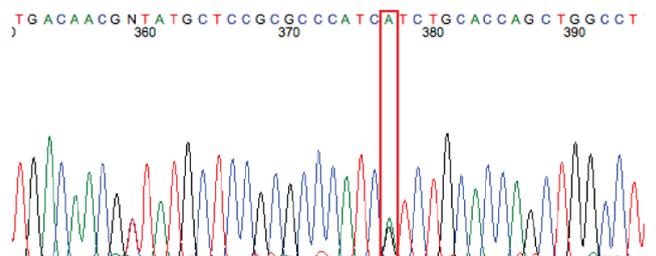
Caso 21 GH1:c.626G>A, p.Arg209His Proband



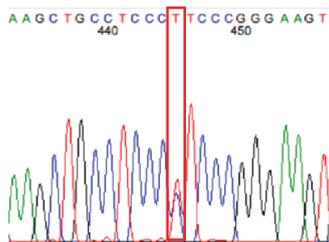
Caso 12 GLI2:c.4207_4220dup, p.Ser1404fs Proband



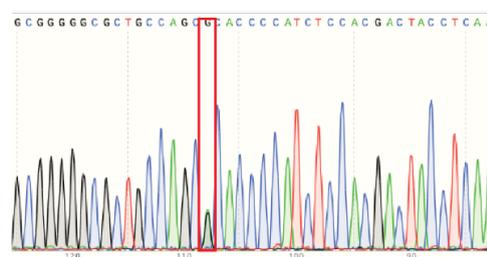
Caso 23 GH1: c.116C>T, p.Ala39Val; c.134G>A, p.Arg45His Proband



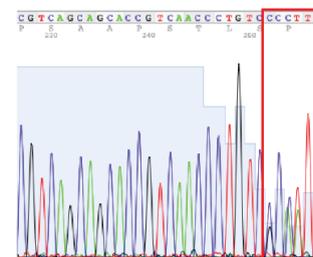
Caso 13 GLI2:c.2281C>T, p.Leu761Phe Proband



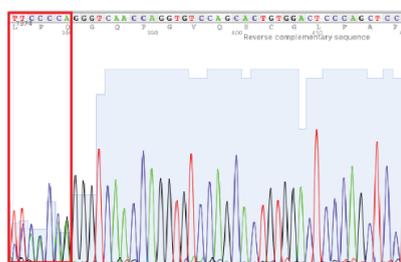
Caso 14 GLI2:c.607G>A, p.Ala203Thr Proband



Caso 15 GLI2:c.1108delG, p.Ala320fs Proband



Caso 16 GLI2: c.4477delG, p.Val1493fs Proband



Caso 24 GHRHR:c.57+1G>A Proband

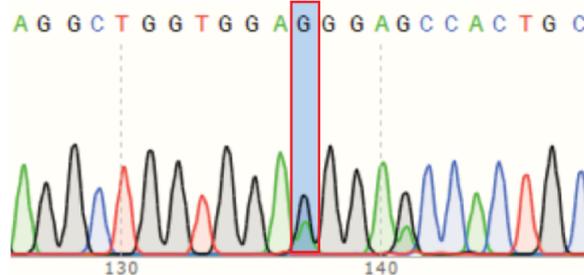


Figura Suplementaria 2: Validación por Sanger de variantes identificadas en la secuenciación por smMIPs

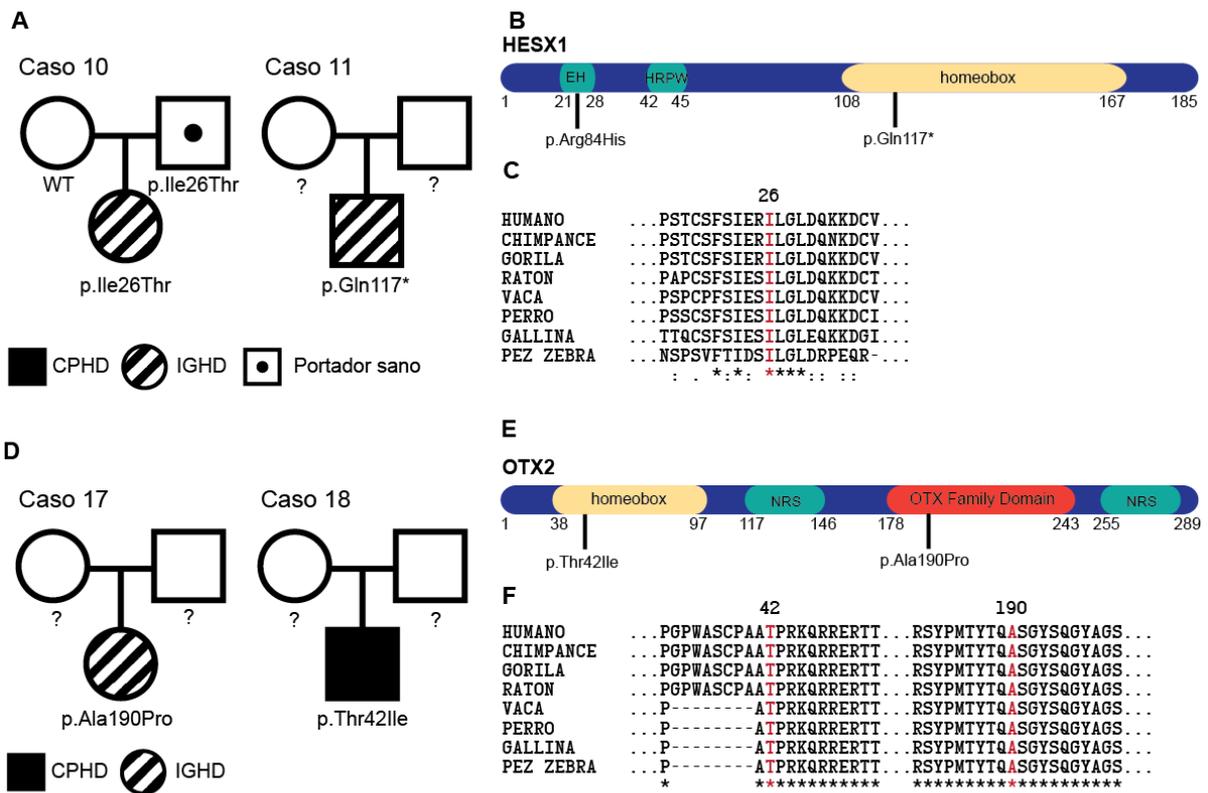


Figura Suplementaria 3: Descripción gráfica de las variantes encontradas en HESX1 y OTX2. A,D: Familiogramas de los dos casos de HESX1 y dos casos de OTX2 respectivamente. Las referencias se encuentran en la figura, los signos de pregunta corresponden a genotipos indeterminados o ADN no disponible para análisis, WT indica que no se detectó la mutación. B,E: Estructura primaria de HESX1 y OTX2 respectivamente, y la posición relativa de las variantes halladas. C,F: Conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por la variantes missenses de HESX1 y OTX2 respectivamente. En rojo se indica las posiciones analizadas.

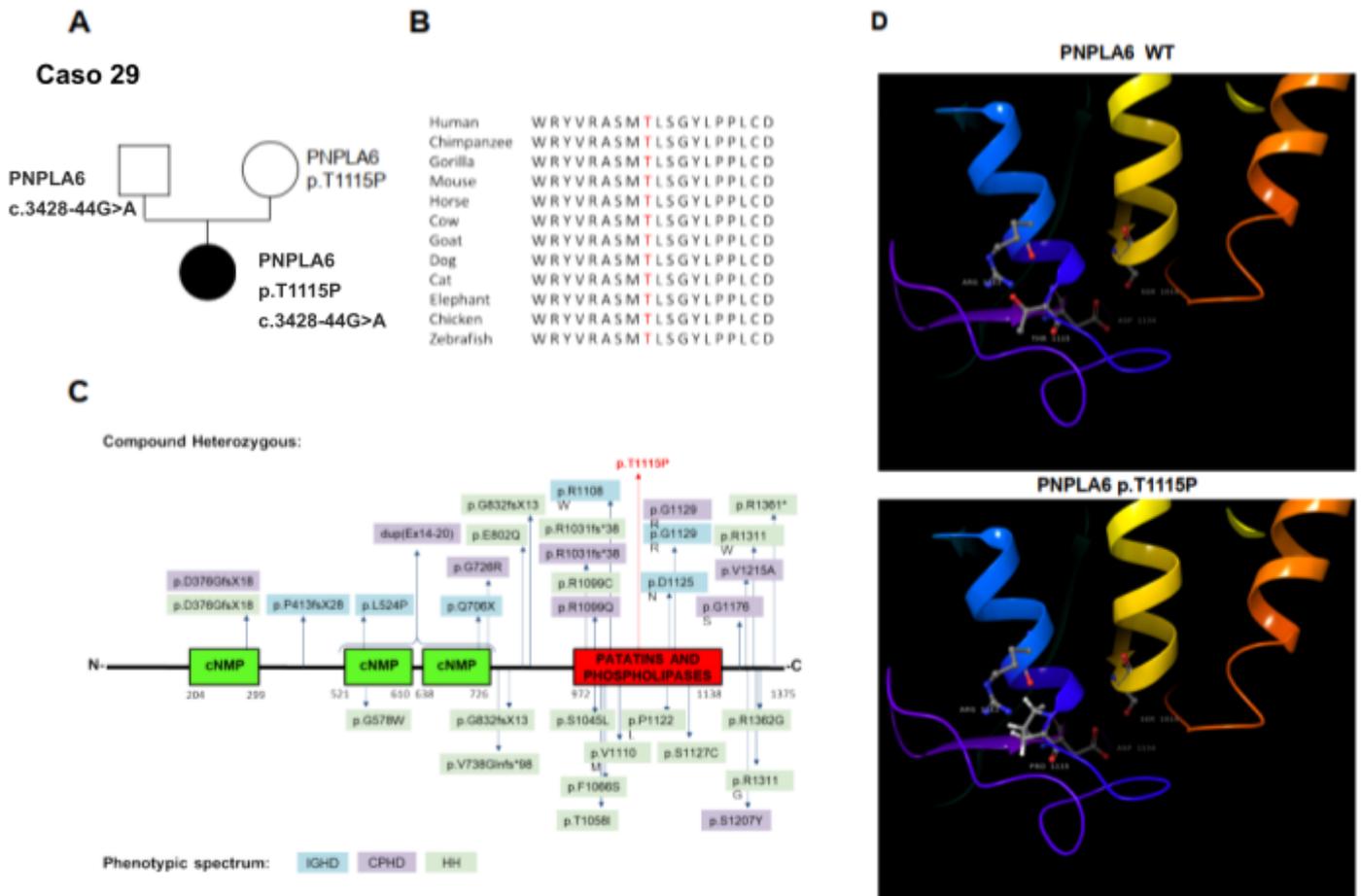


Figura Suplementaria 4: Variante missense identificada en PNPLA6. A: Familiograma del caso 29. Símbolos llenos representan pacientes con deficiencias hipofisarias, símbolos vacíos son individuos sanos B: Conservación aminoacídica en la proteína PNPLA6 entre especies diferentes. En rojo se indica el aminoácido involucrado en la variante missense. C: Estructura proteica de PNPLA6 y variantes previamente reportadas. En rojo la variante en el paciente del caso 29. D: Estructura cartoon de la proteína PNPLA6 mostrando la proteína WT (arriba) y la variante p.T1115P (abajo). Es posible que la prolina que se encuentra en el extremo de una alfa hélice desestabilice su estructura por su propiedad imino-ácido, además de perderse la interacción de la Treonina con la Arginina adyacente. Abreviaciones: IGHD, Deficiencias aislada de hormona de crecimiento; CPHD, Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; HH, Hipogonadismo hipogonadotrófico; WT, wild type.

BIBLIOGRAFÍA

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Agarwal, G., Bhatia, V., Cook, S., & Thomas, P. Q. (2000). Adrenocorticotropin deficiency in combined pituitary hormone deficiency patients homozygous for a novel PROP1 deletion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), 4556–4561. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7013>
- Aguiar-Oliveira, M. H., Gill, M. S., de, E. S., Barretto, A., Alcântara, M. R. S., Miraki-Moud, F., Menezes, C. A., Souza, A. H. O., Martinelli, C. E., Pereira, F. A., Salvatori, R., Levine, M. A., Shalet, S. M., Camacho-Hubner, C., & Clayton, P. E. (1999). Effect of Severe Growth Hormone (GH) Deficiency due to a Mutation in the GH-Releasing Hormone Receptor on Insulin-Like Growth Factors (IGFs), IGF-Binding Proteins, and Ternary Complex Formation Throughout Life1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(11), 4118–4126. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6133>
- Alangari, A., Abobaker, A., Kanegane, H., & Miyawaki, T. (2005). X-linked lymphoproliferative disease associated with hypogammaglobulinemia and growth-hormone deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 165(3), 165–167. <https://doi.org/10.1007/s00431-005-0023-x>
- Alatzoglou, K. S., & Dattani, M. T. (2010). Acquired disorders of the hypothalamo-pituitary axis. In *Brook's Clinical Pediatric Endocrinology* (pp. 106–123). Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/9781444316728.ch5>
- Alatzoglou, K. S., Gregory, L. C., & Dattani, M. T. (2020). Development of the Pituitary Gland. *Comprehensive Physiology*, 389–413. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150043>
- Alman, B. A. (2015). The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(9), 552–560. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.84>
- Alrezk, R., Hannah-Shmouni, F., & Stratakis, C. A. (2017). MEN4 and CDKN1B mutations: The latest of the MEN syndromes. *Endocrine-Related Cancer*, 24(10), T195–T208. <https://doi.org/10.1530/erc-17-0243>
- Amar, A. P., & Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics of North America*, 14(1), 11–23. [https://doi.org/10.1016/s1042-3680\(02\)00017-7](https://doi.org/10.1016/s1042-3680(02)00017-7)
- Amselem, S., Duquesnoy, P., Attree, O., Novelli, G., Bousnina, S., Postel-Vinay, M.-C., & Goossens, M. (1989). Laron dwarfism and mutations of the growth hormone–receptor gene. *New England Journal of Medicine*, 321(15), 989–995. <https://doi.org/10.1056/nejm198910123211501>
- Andoniadou, C. L., Signore, M., Sajedi, E., Gaston-Massuet, C., Kelberman, D., Burns, A. J., Itasaki, N., Dattani, M., & Martinez-Barbera, J. P. (2007). Lack of the murine homeobox gene *Hesx1* leads to a posterior transformation of the anterior forebrain. *Development*, 134(8), 1499–1508. <https://doi.org/10.1242/dev.02829>
- Argente, J., Flores, R., Gutiérrez-Arumí, A., Verma, B., Martos-Moreno, G. Á., Cuscó, I., Oghabian, A., Chowen, J. A., Frilander, M. J., & Pérez-Jurado, L. A. (2014). Defective minor spliceosome mRNA processing results in isolated familial growth hormone deficiency. *EMBO Molecular Medicine*, 6(3), 299–306. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303573>
- Arnhold, I. J. P., França, M. M., Carvalho, L. R., Mendonça, B. B., & Jorge, A. A. L. (2015). Role of *GLI2* in hypopituitarism phenotype. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(3), R141–R150. <https://doi.org/10.1530/jme-15-0009>
- Babu, D., Fanelli, A., Mellone, S., Muniswamy, R., Wasniewska, M., Prodam, F., Petri, A., Bellone, S., Salerno, M. C., & Giordano, M. (2018). Novel *GLI2* mutations identified in patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD): Evidence for a pathogenic effect by functional characterization. *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/cen.13914>
- Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., 2nd, Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K. M., Sawchenko, P. E., & Rosenfeld, M. G. (1995). P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary

- organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2720–2724. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2720>
- Ballerini, M. G., Chiesa, A., Scaglia, P., Groñeiro-Papendieck, L., Heinrich, J. J., & Ropelato, M. G. (2010). 17 α -Hydroxyprogesterone and cortisol serum levels in neonates and young children: Influence of age, gestational age, gender and methodological procedures. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 23(1–2). <https://doi.org/10.1515/jpem.2010.23.1-2.121>
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrg3031>
- Bashamboo, A., Bignon-Topalovic, J., Moussi, N., McElreavey, K., & Brauner, R. (2017). Mutations in the human ROBO1 gene in pituitary stalk interruption syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(7), 2401–2406. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1095>
- Bashamboo, A., Bignon-Topalovic, J., Rouba, H., McElreavey, K., & Brauner, R. (2016). A nonsense mutation in the hedgehog receptor CDON associated with pituitary stalk interruption syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(1), 12–15. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2995>
- Batchuluun, K., Azuma, M., Yashiro, T., & Kikuchi, M. (2016). Notch signaling-mediated cell-to-cell interaction is dependent on E-cadherin adhesion in adult rat anterior pituitary. *Cell and Tissue Research*, 368(1), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2540-5>
- Bechtold-Dalla Pozza, S., Hiedl, S., Roeb, J., Lohse, P., Malik, R. E., Park, S., Durán-Prado, M., & Rhodes, S. J. (2012). A recessive mutation resulting in a disabling amino acid substitution (T194R) in the LHX3 homeodomain causes combined pituitary hormone deficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, 77(1), 41–51. <https://doi.org/10.1159/000335929>
- Belchetz, P. E., Plant, T. M., Nakai, Y., Keogh, E. J., & Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202(4368), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.100883>
- Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverse, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H. F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A. V., Heng, H. H. Q., Koop, B., Martindale, D., Rommens, J. M., Tsui, L.-C., & Scherer, S. W. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nature Genetics*, 14(3), 353–356. <https://doi.org/10.1038/ng1196-353>
- Bernard, V., Young, J., & Binart, N. (2019). Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(6), 356–365. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
- Bernasconi, A., Marino, R., Ribas, A., Rossi, J., Ciaccio, M., Oleastro, M., Ornani, A., Paz, R., Rivarola, M. A., Zelazko, M., & Belgorosky, A. (2006). Characterization of immunodeficiency in a patient with growth hormone insensitivity secondary to a novel stat5b gene mutation. *Pediatrics*, 118(5), e1584–e1592. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2882>
- Bhangoo, A. P. S., Hunter, C. S., Savage, J. J., Anhalt, H., Pavlakis, S., Walvoord, E. C., Ten, S., & Rhodes, S. J. (2006). A novel LHX3 mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3), 747–753. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2360>
- Bhatia, S., Bengani, H., Fish, M., Brown, A., Divizia, M. T., de Marco, R., Damante, G., Grainger, R., van Heyningen, V., & Kleinjan, D. A. (2013). Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia. *The American Journal of Human Genetics*, 93(6), 1126–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.028>
- Blanco, D. G. del, de Graaff, L. C. G., Visser, T. J., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2013). Single-nucleotide variants in two Hedgehog genes, SHH and HHIP, as genetic cause of combined pituitary hormone deficiency. *Clinical Endocrinology*, 78(3), 415–423. <https://doi.org/10.1111/cen.12000>
- Bloor, S., Giri, D., Didi, M., & Senniappan, S. (2017). Novel splicing mutation in B3GAT3 associated with short stature, GH deficiency, hypoglycaemia, developmental delay, and multiple congenital anomalies. *Case Reports in Genetics*, 2017, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2017/3941483>
- Blum, W. F., Deal, C., Zimmermann, A. G., Shavrikova, E. P., Child, C. J., Quigley, C. A., Drop, S. L.

- S., Cutler, G. B., & Rosenfeld, R. G. (2014). Development of additional pituitary hormone deficiencies in pediatric patients originally diagnosed with idiopathic isolated GH deficiency. *European Journal of Endocrinology*, *170*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1530/eje-13-0643>
- Boda, H., Miyata, M., Inagaki, H., Shinkai, Y., Kato, T., Yoshikawa, T., & Kurahashi, H. (2019). FOXA2 gene mutation in a patient with congenital complex pituitary hormone deficiency. *European Journal of Medical Genetics*, *62*(11), 103570. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.11.004>
- Bonfig, W., Krude, H., & Schmidt, H. (2011). A novel mutation of LHX3 is associated with combined pituitary hormone deficiency including ACTH deficiency, sensorineural hearing loss, and short neck—a case report and review of the literature. *European Journal of Pediatrics*, *170*(8), 1017–1021. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1393-x>
- Botermann, D. S., Brandes, N., Frommhold, A., Heß, I., Wolff, A., Zibat, A., Hahn, H., Buslei, R., & Uhmann, A. (2021). Hedgehog signaling in endocrine and folliculo-stellate cells of the adult pituitary. *Journal of Endocrinology*, *248*(3), 303–316. <https://doi.org/10.1530/joe-20-0388>
- Böttner, A., Keller, E., Kratzsch, J., Stobbe, H., Weigel, J. F. W., Keller, A., Hirsch, W., Kiess, W., Blum, W. F., & Pfäffle, R. W. (2004). PROP1 Mutations Cause Progressive Deterioration of Anterior Pituitary Function including Adrenal Insufficiency: A Longitudinal Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(10), 5256–5265. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0661>
- Brachet, C., Kozhemyakina, E. A., Boros, E., Heinrichs, C., Balikova, I., Soblet, J., Smits, G., Vilain, C., & Mathers, P. H. (2019). Truncating RAX mutations: Anophthalmia, hypopituitarism, diabetes insipidus, and cleft palate in mice and men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *104*(7), 2925–2930. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-02316>
- Brancati, F., Camerota, L., Colao, E., Vega-Warner, V., Zhao, X., Zhang, R., Bottillo, I., Castori, M., Caglioti, A., Sangiuolo, F., Novelli, G., Perrotti, N., & Otto, E. A. (2018). Biallelic variants in the ciliary gene TMEM67 cause RHYNS syndrome. *European Journal of Human Genetics*, *26*(9), 1266–1271. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0183-6>
- Braslavsky, D., Grinson, R. P., Ballerini, M. G., Bedecarrás, P., Loreti, N., Bastida, G., Ropelato, M. G., Keselman, A., Campo, S., Rey, R. A., & Bergadá, I. (2015). Hypogonadotropic hypogonadism in infants with congenital hypopituitarism: A challenge to diagnose at an early stage. *Hormone Research in Paediatrics*, *84*(5), 289–297. <https://doi.org/10.1159/000439051>
- Brinkman, E. K., Kousholt, A. N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., Jonkers, J., & van Steensel, B. (2018). Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Research*, *46*(10), e58–e58. <https://doi.org/10.1093/nar/gky164>
- Brinkmeier, M. L., Bando, H., Camarano, A. C., Fujio, S., Yoshimoto, K., de Souza, F. S. J., & Camper, S. A. (2020). Rathke's cleft-like cysts arise from *Isl1* deletion in murine pituitary progenitors. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci136745>
- Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Cha, K. B., Gridley, T., Stifani, S., Meeldijk, J., Clevers, H., & Camper, S. A. (2003). TCF and groucho-related genes influence pituitary growth and development. *Molecular Endocrinology*, *17*(11), 2152–2161. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0225>
- Brue, T., Quentien, M.-H., Khetchoumian, K., Bensa, M., Capo-Chichi, J.-M., Delemer, B., Balsalobre, A., Nassif, C., Papadimitriou, D. T., Pagnier, A., Hasselmann, C., Patry, L., Schwartzentruber, J., Souchon, P.-F., Takayasu, S., Enjalbert, A., Van Vliet, G., Majewski, J., Drouin, J., & Samuels, M. E. (2014). Mutations in NFKB2 and potential genetic heterogeneity in patients with DAVID syndrome, having variable endocrine and immune deficiencies. *BMC Medical Genetics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-014-0139-9>
- Budny, B., Karmelita-Katulaska, K., Stajgis, M., Žemojtel, T., Ruchała, M., & Ziemnicka, K. (2020). Copy number variants contributing to combined pituitary hormone deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 5757. <https://doi.org/10.3390/ijms21165757>
- Bui, C., Huber, C., Tuysuz, B., Alanay, Y., Bole-Feysot, C., Leroy, J. G., Mortier, G., Nitschke, P., Munnich, A., & Cormier-Daire, V. (2014). XYLT1 mutations in desbuquois dysplasia type 2. *The American Journal of Human Genetics*, *94*(3), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.01.020>
- Burger, L. L., Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C., & Marshall, J. C. (2004). Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *Journal of Molecular Endocrinology*, *33*(3), 559–584.

- <https://doi.org/10.1677/jme.1.01600>
- Cadwell, R. C., & Joyce, G. F. (1994). Mutagenic PCR. *Genome Research*, 3(6), S136–S140. <https://doi.org/10.1101/gr.3.6.s136>
- Canettieri, G., Di Marcotullio, L., Greco, A., Coni, S., Antonucci, L., Infante, P., Pietrosanti, L., De Smaele, E., Ferretti, E., Miele, E., Pelloni, M., De Simone, G., Pedone, E. M., Gallinari, P., Giorgi, A., Steinkühler, C., Vitagliano, L., Pedone, C., Schinin, M. E., ... Gulino, A. (2010). Histone deacetylase and Cullin3–REKCTD11 ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nature Cell Biology*, 12(2), 132–142. <https://doi.org/10.1038/ncb2013>
- Cariboni, A., Davidson, K., Rakic, S., Maggi, R., Parnavelas, J. G., & Ruhrberg, C. (2010). Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: Implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Human Molecular Genetics*, 20(2), 336–344. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq468>
- Carithers, L. J., Ardlie, K., Barcus, M., Branton, P. A., Britton, A., Buia, S. A., Compton, C. C., DeLuca, D. S., Peter-Demchok, J., Gelfand, E. T., Guan, P., Korzeniewski, G. E., Lockhart, N. C., Rabiner, C. A., Rao, A. K., Robinson, K. L., Roche, N. V., Sawyer, S. J., Segrè, A. V., ... Moore, H. M. (2015). A novel approach to high-quality postmortem tissue procurement: The GTEx Project. *Biopreservation and Biobanking*, 13(5), 311–319. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0032>
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Castinetti, F., Brinkmeier, M. L., Mortensen, A. H., Vella, K. R., Gergics, P., Brue, T., Hollenberg, A. N., Gan, L., & Camper, S. A. (2015). ISL1 is necessary for maximal thyrotrope response to hypothyroidism. *Molecular Endocrinology*, 29(10), 1510–1521. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1192>
- Castinetti, F., Reynaud, R., Quentien, M.-H., Jullien, N., Marquant, E., Rochette, C., Herman, J.-P., Saveanu, A., Barlier, A., Enjalbert, A., & Brue, T. (2014). Combined pituitary hormone deficiency: Current and future status. *Journal of Endocrinological Investigation*, 38(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40618-014-0141-2>
- Castinetti, F., Saveanu, A., Reynaud, R., Quentien, M. H., Buffin, A., Brauner, R., Kaffel, N., Albarel, F., Guedj, A. M., El Kholy, M., Amin, M., Enjalbert, A., Barlier, A., & Brue, T. (2008). A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2790–2799. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2389>
- Celli, G. (1998). Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *The EMBO Journal*, 17(6), 1642–1655. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1642>
- Cha, K. B., Douglas, K. R., Potok, M. A., Liang, H., Jones, S. N., & Camper, S. A. (2004). WNT5A signaling affects pituitary gland shape. *Mechanisms of Development*, 121(2), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.12.002>
- Charles, M. A., Suh, H., Hjalt, T. A., Drouin, J., Camper, S. A., & Gage, P. J. (2005). PITX genes are required for cell survival and *lhx3* activation. *Molecular Endocrinology*, 19(7), 1893–1903. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0052>
- Chauvet, N., El-Yandouzi, T., Mathieu, M.-N., Schlernitzauer, A., Galibert, E., Lafont, C., Le Tissier, P., Robinson, I. C., Mollard, P., & Coutry, N. (2009). Characterization of adherens junction protein expression and localization in pituitary cell networks. *Journal of Endocrinology*, 202(3), 375–387. <https://doi.org/10.1677/joe-09-0153>
- Ciccione, N. A., & Kaiser, U. B. (2009). The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 16(4), 321–327. <https://doi.org/10.1097/med.0b013e32832d88fb>
- Clarke, I. J. (2014). Hypothalamus as an endocrine organ. *Comprehensive Physiology*, 217–253. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140019>
- Clemmons, D. R. (2012). Metabolic actions of insulin-like growth factor-i in normal physiology and

- diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(2), 425–443.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.017>
- Cogan, J. D., Wu, W., Phillips, J. A., III, Arnhold, I. J. P., Agapito, A., Fofanova, O. V., Osorio, M. G. F., Bircan, I., Moreno, A., & Mendonca, B. B. (1998). The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(9), 3346–3349. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.9.5142>
- Cohen, R. N., Brue, T., Naik, K., Houlihan, C. A., Wondisford, F. E., & Radovick, S. (2006). The role of cbp/p300 interactions and pit-1 dimerization in the pathophysiological mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(1), 239–247. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1211>
- Cole, L. W., Sidis, Y., Zhang, C., Quinton, R., Plummer, L., Pignatelli, D., Hughes, V. A., Dwyer, A. A., Raivio, T., Hayes, F. J., Seminara, S. B., Huot, C., Alos, N., Speiser, P., Takeshita, A., VanVliet, G., Pearce, S., Crowley, W. F., Jr., Zhou, Q.-Y., & Pitteloud, N. (2008). Mutations in Prokineticin 2 and Prokineticin receptor 2 genes in Human Gonadotrophin-Releasing Hormone Deficiency: Molecular Genetics and Clinical Spectrum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(9), 3551–3559. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2654>
- Coni, S., Antonucci, L., D'Amico, D., Di Magno, L., Infante, P., De Smaele, E., Giannini, G., Di Marcotullio, L., Screpanti, I., Gulino, A., & Canettieri, G. (2013). Gli2 acetylation at lysine 757 regulates hedgehog-dependent transcriptional output by preventing its promoter occupancy. *PLoS ONE*, 8(6), e65718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065718>
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. R., & Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437(7061), 1018–1021. <https://doi.org/10.1038/nature04117>
- Cortés, J. M. R., & Zerón, H. M. (2019). Genetics of thyroid disorders. *Folia Medica*, 61(2), 172–179. <https://doi.org/10.2478/folmed-2018-0078>
- Couture, C., Saveanu, A., Barlier, A., Carel, J. C., Fassnacht, M., Flück, C. E., Houang, M., Maes, M., Phan-Hug, F., Enjalbert, A., Drouin, J., Brue, T., & Vallette, S. (2012). Phenotypic homogeneity and genotypic variability in a large series of congenital isolated acth-deficiency patients with TPIT gene mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(3), E486–E495. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1659>
- Coya, R., Vela, A., Perez de Nanclares, G., Rica, I., Castano, L., Busturia, M. A., Martul, P., & GEDPIT group. (2007). Panhypopituitarism: Genetic versus acquired etiological factors. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 20(1). <https://doi.org/10.1515/jpem.2007.20.1.27>
- Cummings, B. B., Marshall, J. L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Foley, A. R., Bolduc, V., Waddell, L. B., Sandaradura, S. A., O'Grady, G. L., Estrella, E., Reddy, H. M., Zhao, F., Weisburd, B., Karczewski, K. J., O'Donnell-Luria, A. H., Birnbaum, D., Sarkozy, A., Hu, Y., ... MacArthur, D. G. (2017). Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Science Translational Medicine*, 9(386). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal5209>
- Dasen, J. S., Barbera, J.-P. M., Herman, T. S., Connell, S. O., Olson, L., Ju, B., Tollkuhn, J., Baek, S. H., Rose, D. W., & Rosenfeld, M. G. (2001a). Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes & Development*, 15(23), 3193–3207. <https://doi.org/10.1101/gad.932601>
- Dasen, J. S., Barbera, J.-P. M., Herman, T. S., Connell, S. O., Olson, L., Ju, B., Tollkuhn, J., Baek, S. H., Rose, D. W., & Rosenfeld, M. G. (2001b). Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes & Development*, 15(23), 3193–3207. <https://doi.org/10.1101/gad.932601>
- Dasen, J. S., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Treier, M., Gleiberman, A. S., Szeto, D. P., Hooshmand, F., Aggarwal, A. K., & Rosenfeld, M. G. (1999). Reciprocal interactions of pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, 97(5), 587–598. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80770-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80770-9)

- Dateki, S., Fukami, M., Sato, N., Muroya, K., Adachi, M., & Ogata, T. (2008). OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: Functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(10), 3697–3702. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0720>
- Dateki, S., Fukami, M., Uematsu, A., Kaji, M., Iso, M., Ono, M., Mizota, M., Yokoya, S., Motomura, K., Kinoshita, E., Moriuchi, H., & Ogata, T. (2010). Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with LHX4 Deletion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(8), 4043–4047. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0150>
- Dattani, M. T., Martinez-Barbera, J.-P., Thomas, P. Q., Brickman, J. M., Gupta, R., Mårtensson, I.-L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J. K. H., Hindmarsh, P. C., Krauss, S., Beddington, R. S. P., & Robinson, I. C. A. F. (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics*, 19(2), 125–133. <https://doi.org/10.1038/477>
- Daughaday, W. H. (2000). Growth hormone axis overview - Somatomedin hypothesis. *Pediatric Nephrology*, 14(7), 537–540. <https://doi.org/10.1007/s004670000334>
- Davis, S. W., & Camper, S. A. (2007). Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Developmental Biology*, 305(1), 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.001>
- de Bruin, C., Orbak, Z., Andrew, M., Hwa, V., & Dauber, A. (2016). Severe short stature in two siblings as the presenting sign of PROP1 deficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, 85(5), 358–362. <https://doi.org/10.1159/000443684>
- de Graaff, L. C. G., Argente, J., Veenma, D. C. M., Drent, M. L., Uitterlinden, A. G., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2010). PROP1, HESX1, POU1F1, LHX3 and LHX4 mutation and deletion screening and gh1 and IVS3+1/+2 mutation screening in a Dutch nationwide cohort of patients with combined pituitary hormone deficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, 73(5), 363–371. <https://doi.org/10.1159/000308169>
- De Rienzo, F., Mellone, S., Bellone, S., Babu, D., Fusco, I., Prodam, F., Petri, A., Muniswamy, R., De Luca, F., Salerno, M., Momigliano-Richardi, P., Bona, G., & Giordano, M. (2015). Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: A systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. *Clinical Endocrinology*, 83(6), 849–860. <https://doi.org/10.1111/cen.12849>
- De Souza, F. S. J., & Placzek, M. (2021). Conserved roles of Rax/rx3 genes in hypothalamus and pituitary development. *The International Journal of Developmental Biology*, 65(4–5–6), 195–205. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200081fd>
- Deladoëy, J., Flück, C., Büyükgebiz, A., Kuhlmann, B. V., Eblé, A., Hindmarsh, P. C., Wu, W., & Mullis, P. E. (1999). “Hot spot” in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(5), 1645–1650. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.5.5681>
- Deladoëy, J., Stocker, P., & Mullis, P. E. (2001). Autosomal dominant GH deficiency due to an arg183hisgh-1 gene mutation: Clinical and molecular evidence of impaired regulated GH secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(8), 3941–3947. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7723>
- Dellovade, T., Romer, J. T., Curran, T., & Rubin, L. L. (2006). THE HEDGEHOG PATHWAY AND NEUROLOGICAL DISORDERS. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 539–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112858>
- Deprez, P., Nichane, M., Lengelé, B., Rezsöhazy, R., & Nyssen-Behets, C. (2013). Molecular study of a hoxa2 gain-of-function in chondrogenesis: A model of idiopathic proportionate short stature. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20386–20398. <https://doi.org/10.3390/ijms141020386>
- Di Iorgi, N., Morana, G., Allegri, A. E. M., Napoli, F., Gastaldi, R., Calcagno, A., Patti, G., Loche, S., & Maghnie, M. (2016a). Classical and non-classical causes of GH deficiency in the paediatric age. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(6), 705–736. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.008>

- Di Iorgi, N., Morana, G., Allegri, A. E. M., Napoli, F., Gastaldi, R., Calcagno, A., Patti, G., Loche, S., & Maghnie, M. (2016b). Classical and non-classical causes of GH deficiency in the paediatric age. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(6), 705–736. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.008>
- Diaczok, D., Romero, C., Zunich, J., Marshall, I., & Radovick, S. (2008). A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(11), 4351–4359. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1189>
- Dodé, C., Levilliers, J., Dupont, J.-M., De Paepe, A., Le Dû, N., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R. S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Baverel, F., Pêcheux, C., Le Tessier, D., Cruaud, C., Delpéch, M., Speleman, F., Vermeulen, S., Amalfitano, A., Bachelot, Y., Bouchard, P., ... Hardelin, J.-P. (2003). Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genetics*, 33(4), 463–465. <https://doi.org/10.1038/ng1122>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Domené, H. M., Scaglia, P. A., Martínez, A. S., Keselman, A. C., Karabatas, L. M., Pipman, V. R., Bengolea, S. V., Guida, M. C., Ropelato, M. G., Ballerini, M. G., Lescano, E. M., Blanco, M. A., Heinrich, J. J., Rey, R. A., & Jasper, H. G. (2013). Heterozygous IGFALS Gene variants in idiopathic short stature and normal children: Impact on height and the IGF system. *Hormone Research in Paediatrics*, 80(6), 413–423. <https://doi.org/10.1159/000355412>
- Drouin, J., Lamolet, B., Lamonerie, T., Lanctôt, C., & Tremblay, J. J. (1998a). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1–2), 31–36. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00026-4)
- Drouin, J., Lamolet, B., Lamonerie, T., Lanctôt, C., & Tremblay, J. J. (1998b). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1–2), 31–36. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00026-4)
- Duque Osorio, J. F. (2003). Crestas neurales, placodas y arcos branquiales: Una revisión evolutiva y embriológica de datos básicos y recientes. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 27(103).
- Duquesnoy, P., Roy, A., Dastot, F., Ghali, I., Teinturier, C., Netchine, I., Cacheux, V., Hafez, M., Salah, N., Chaussain, J.-L., Goossens, M., Bougnères, P., & Amselem, S. (1998). Human Prop-1: Cloning, mapping, genomic structure. *FEBS Letters*, 437(3), 216–220. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01234-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01234-4)
- Dusatková, P., Pfäffle, R., Brown, M. R., Akulevich, N., Arnhold, I. J., Kalina, M. A., Kot, K., Krziszik, C., Lemos, M. C., Malikova, J., Navardauskaite, R., Obermannova, B., Pribilincova, Z., Sallai, A., Stipancic, G., Verkauskiene, R., Cinek, O., Blum, W. F., Parks, J. S., ... Lebl, J. (2015). Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *European Journal of Human Genetics*, 24(3), 415–420. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.126>
- Ellsworth, B. S., Butts, D. L., & Camper, S. A. (2008). Mechanisms underlying pituitary hypoplasia and failed cell specification in Lhx3-deficient mice. *Developmental Biology*, 313(1), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.006>
- Erbaş, İ. M., Paketçi, A., Acar, S., Kotan, L. D., Demir, K., Abacı, A., & Böber, E. (2020). A nonsense variant in FGFR1: A rare cause of combined pituitary hormone deficiency. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 33(12), 1613–1615. <https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0029>
- Ericson, J., Norlin, S., Jessell, T. M., & Edlund, T. (1998). Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development*, 125(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1242/dev.125.6.1005>
- Fang, Q., George, A. S., Brinkmeier, M. L., Mortensen, A. H., Gergics, P., Cheung, L. Y. M., Daly, A. Z., Ajmal, A., Pérez Millán, M. I., Ozel, A. B., Kitzman, J. O., Mills, R. E., Li, J. Z., & Camper, S. A. (2016). Genetics of combined pituitary hormone deficiency: Roadmap into the genome

- era. *Endocrine Reviews*, 37(6), 636–675. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1101>
- Filges, I., Bischof-Renner, A., Röthlisberger, B., Potthoff, C., Glanzmann, R., Günthard, J., Schneider, J., Huber, A. R., Zumsteg, U., Miny, P., & Szinnai, G. (2012). Panhypopituitarism presenting as life-threatening heart failure caused by an inherited microdeletion in 1q25 including LHX4. *Pediatrics*, 129(2), e529–e534. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-3849>
- Flemming, G. M. C., Klammt, J., Ambler, G., Bao, Y., Blum, W. F., Cowell, C., Donaghue, K., Howard, N., Kumar, A., Sanchez, J., Stobbe, H., & Pfäffle, R. W. (2013). Functional characterization of a heterozygous GLI2 missense mutation in patients with multiple pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(3), E567–E575. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3224>
- Flück, C., Deladoey, J., Rutishauser, K., Eblé, A., Marti, U., Wu, W., & Mullis, P. E. (1998). Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation resulting in the substitution of arg→cys at codon 120 (R120C)1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(10), 3727–3734. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.10.5172>
- Fogli, A., Rodriguez, D., Eymard-Pierre, E., Bouhour, F., Labauge, P., Meaney, B. F., Zeesman, S., Kaneski, C. R., Schiffmann, R., & Boespflug-Tanguy, O. (2003). Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *The American Journal of Human Genetics*, 72(6), 1544–1550. <https://doi.org/10.1086/375404>
- Fowler, D. M., Araya, C. L., Fleishman, S. J., Kellogg, E. H., Stephany, J. J., Baker, D., & Fields, S. (2010). High-resolution mapping of protein sequence-function relationships. *Nature Methods*, 7(9), 741–746. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1492>
- França, M. M., Jorge, A. A. L., Carvalho, L. R. S., Costalonga, E. F., Otto, A. P., Correa, F. A., Mendonca, B. B., & Arnhold, I. J. P. (2013). Relatively high frequency of non-synonymous GLI2 variants in patients with congenital hypopituitarism without holoprosencephaly. *Clinical Endocrinology*, 78(4), 551–557. <https://doi.org/10.1111/cen.12044>
- França, M. M., Jorge, A. A. L., Carvalho, L. R. S., Costalonga, E. F., Vasques, G. A., Leite, C. C., Mendonca, B. B., & Arnhold, I. J. P. (2010). Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(11), E384–E391. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1050>
- Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., Kendall, W., Oden, J., Bridges, S., Binart, N., Breant, B., & Kelly, P. A. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: Effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, 143(4), 1378–1385. <https://doi.org/10.1210/endo.143.4.8722>
- Gage, P. J., Brinkmeier, M. L., Scarlett, L. M., Knapp, L. T., Camper, S. A., & Mahon, K. A. (1996). The Ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *Rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Molecular Endocrinology*, 10(12), 1570–1581. <https://doi.org/10.1210/mend.10.12.8961267>
- Gaston-Massuet, C., Andoniadou, C. L., Signore, M., Sajedi, E., Bird, S., Turner, J. M. A., & Martinez-Barbera, J. P. (2008). Genetic interaction between the homeobox transcription factors HESX1 and SIX3 is required for normal pituitary development. *Developmental Biology*, 324(2), 322–333. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.008>
- Gaston-Massuet, C., McCabe, M. J., Scagliotti, V., Young, R. M., Carreno, G., Gregory, L. C., Jayakody, S. A., Pozzi, S., Gualtieri, A., Basu, B., Koniordou, M., Wu, C.-I., Bancalari, R. E., Rahikkala, E., Veijola, R., Lopponen, T., Graziola, F., Turton, J., Signore, M., ... Martinez-Barbera, J. P. (2016). Transcription factor 7-like 1 is involved in hypothalamo–pituitary axis development in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503346113>
- Gertner, J. M., Wajnrajch, M. P., & Leibel, R. L. (1998). Genetic defects in the control of growth hormone secretion. *Hormone Research*, 49(Suppl. 1), 9–14. <https://doi.org/10.1159/000053062>
- Gharib, S. D., Wierman, M. E., Shupnik, M. A., & Chin, W. W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews*, 11(1), 177–199. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-177>

- Giordano, M. (2016). Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(6), 679–691. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.09.005>
- Giustina, A., Mazziotti, G., & Canalis, E. (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, 29(5), 535–559. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0036>
- Glaser, N. S., Shirali, A. C., Styne, D. M., & Jones, K. L. (1998). Acid-base homeostasis in children with growth hormone deficiency. *Pediatrics*, 102(6), 1407–1414. <https://doi.org/10.1542/peds.102.6.1407>
- Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 331–344. <https://doi.org/10.1038/nrg2774>
- Gondo, R. G., Aguiar-Oliveira, M. H., Hayashida, C. Y., Toledo, S. P. A., Abelin, N., Levine, M. A., Bowers, C. Y., Souza, A. H. O., Pereira, R. M. C., Santos, N. L., & Salvatori, R. (2001). Growth hormone-releasing peptide-2 stimulates GH secretion in gh-deficient patients with mutated gh-releasing hormone receptor1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(7), 3279–3283. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7694>
- Gonzalez-Calderon, G., Liu, R., Carvajal, R., & Teer, J. K. (2020). A negative storage model for precise but compact storage of genetic variation data. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baz158>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gorbenko Del Blanco, D., de Graaff, L. C. G., Posthouwer, D., Visser, T. J., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2011a). Isolated GH deficiency: Mutation screening and copy number analysis of HMGA2 and CDK6 genes. *European Journal of Endocrinology*, 165(4), 537–544. <https://doi.org/10.1530/eje-11-0478>
- Gorbenko Del Blanco, D., de Graaff, L. C. G., Posthouwer, D., Visser, T. J., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2011b). Isolated GH deficiency: Mutation screening and copy number analysis of HMGA2 and CDK6 genes. *European Journal of Endocrinology*, 165(4), 537–544. <https://doi.org/10.1530/eje-11-0478>
- Gregory, L. C., Ferreira, C. B., Young-Baird, S. K., Williams, H. J., Harakalova, M., van Haften, G., Rahman, S. A., Gaston-Massuet, C., Kelberman, D., GOSgene, Qasim, W., Camper, S. A., Dever, T. E., Shah, P., Robinson, I. C. A. F., & Dattani, M. T. (2019). Impaired EIF2S3 function associated with a novel phenotype of X-linked hypopituitarism with glucose dysregulation. *EBioMedicine*, 42, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.013>
- Gregory, L. C., Gaston-Massuet, C., Andoniadou, C. L., Carreno, G., Webb, E. A., Kelberman, D., McCabe, M. J., Panagiotakopoulos, L., Saldanha, J. W., Spoudeas, H. A., Torpiano, J., Rossi, M., Raine, J., Canham, N., Martinez-Barbera, J. P., & Dattani, M. T. (2014a). The role of the sonic hedgehog signalling pathway in patients with midline defects and congenital hypopituitarism. *Clinical Endocrinology*, 82(5), 728–738. <https://doi.org/10.1111/cen.12637>
- Gregory, L. C., Gaston-Massuet, C., Andoniadou, C. L., Carreno, G., Webb, E. A., Kelberman, D., McCabe, M. J., Panagiotakopoulos, L., Saldanha, J. W., Spoudeas, H. A., Torpiano, J., Rossi, M., Raine, J., Canham, N., Martinez-Barbera, J. P., & Dattani, M. T. (2014b). The role of the sonic hedgehog signalling pathway in patients with midline defects and congenital hypopituitarism. *Clinical Endocrinology*, 82(5), 728–738. <https://doi.org/10.1111/cen.12637>
- Gregory, L. C., Humayun, K. N., Turton, J. P. G., McCabe, M. J., Rhodes, S. J., & Dattani, M. T. (2015). Novel lethal form of congenital hypopituitarism associated with the first recessivelhx4mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), 2158–2164. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4484>
- Haimi, M., & Gershoni-Baruch, R. (2005). Autosomal recessive Oliver-McFarlane syndrome: Retinitis pigmentosa, short stature (GH deficiency), trichomegaly, and hair anomalies or CPD syndrome (chorioretinopathy-pituitary dysfunction). *American Journal of Medical Genetics Part A*, 138A(3), 268–271. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30953>
- Hamzeh, A. R., Andrews, T. D., & Field, M. A. (2021). Detecting causal variants in mendelian disorders using whole-genome sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 1–25).

- Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-1103-6_1
- Han, L., Pan, Y., & Wang, B. (2012). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification inhibits GLI2 protein transcriptional activity in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 20483–20489. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.359299>
- Hanchate, N. K., Giacobini, P., Lhuillier, P., Parkash, J., Espy, C., Fouveaut, C., Leroy, C., Baron, S., Campagne, C., Vanacker, C., Collier, F., Cruaud, C., Meyer, V., García-Piñero, A., Dewailly, D., Cortet-Rudelli, C., Gersak, K., Metz, C., Chabrier, G., ... Dodé, C. (2012). SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genetics*, 8(8), e1002896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002896>
- Hardenbol, P., Banér, J., Jain, M., Nilsson, M., Namsaraev, E. A., Karlin-Neumann, G. A., Fakhrai-Rad, H., Ronaghi, M., Willis, T. D., Landegren, U., & Davis, R. W. (2003). Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nature Biotechnology*, 21(6), 673–678. <https://doi.org/10.1038/nbt821>
- Hay, C., & Wu, F. (2002). Genetics and hypogonadotrophic hypogonadism. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 14(3), 303–308. <https://doi.org/10.1097/00001703-200206000-00010>
- Heinen, C. A., de Vries, E. M., Alders, M., Bikker, H., Zwaveling-Soonawala, N., van den Akker, E. L. T., Bakker, B., Hoorweg-Nijman, G., Roelfsema, F., Hennekam, R. C., Boelen, A., van Trotsenburg, A. S. P., & Fliers, E. (2018). Mutations in IRS4 are associated with central hypothyroidism. *Journal of Medical Genetics*, 55(10), 693–700. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105113>
- Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., & Ruvkun, G. (1988). The POU domain: A large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes & Development*, 2(12a), 1513–1516. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12a.1513>
- Hess, O., Hujeirat, Y., Wajnrajch, M. P., Allon-Shalev, S., Zadik, Z., Lavi, I., & Tenenbaum-Rakover, Y. (2007). Variable phenotypes in familial isolated growth hormone deficiency caused by a G6664A mutation in the GH-1 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(11), 4387–4393. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0684>
- Heyne, G. W., Everson, J. L., Ansen-Wilson, L. J., Melberg, C. G., Fink, D. M., Parins, K. F., Doroodchi, P., Ulschmid, C. M., & Lipinski, R. J. (2016). Gli2 gene dosage and gene-environment interaction illuminate the etiological complexity of holoprosencephaly. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.026328>
- Hiatt, J. B., Patwardhan, R. P., Turner, E. H., Lee, C., & Shendure, J. (2010). Parallel, tag-directed assembly of locally derived short sequence reads. *Nature Methods*, 7(2), 119–122. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1416>
- Hiatt, J. B., Pritchard, C. C., Salipante, S. J., O’Roak, B. J., & Shendure, J. (2013). Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Research*, 23(5), 843–854. <https://doi.org/10.1101/gr.147686.112>
- Hietpas, R. T., Jensen, J. D., & Bolon, D. N. A. (2011). Experimental illumination of a fitness landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7896–7901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016024108>
- Ho, S. S., Urban, A. E., & Mills, R. E. (2019). Structural variation in the sequencing era. *Nature Reviews Genetics*, 21(3), 171–189. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0180-9>
- Holloway, J. M., Szeto, D. P., Scully, K. M., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1995). Pit-1 binding to specific DNA sites as a monomer or dimer determines gene-specific use of a tyrosine-dependent synergy domain. *Genes & Development*, 9(16), 1992–2006. <https://doi.org/10.1101/gad.9.16.1992>
- Homburger, J. R., Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Nelson, D., Sanchez, E., Ortiz-Tello, P., Pons-Estel, B. A., Acevedo-Vasquez, E., Miranda, P., Langefeld, C. D., Gravel, S., Alarcón-Riquelme, M. E., & Bustamante, C. D. (2015). Genomic insights into the ancestry and demographic history of South America. *PLOS Genetics*, 11(12), e1005602. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005602>

- Hsiao, C.-J., Chang, C.-H., Ibrahim, R. B., Lin, I.-H., Wang, C.-H., Wang, W.-J., & Tsai, J.-W. (2018). Gli2 modulates cell cycle re-entry through autophagy-mediated regulation on the length of primary cilia. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.221218>
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, *426*(6962), 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature02061>
- Hufnagel, R. B., Arno, G., Hein, N. D., Hershenson, J., Prasad, M., Anderson, Y., Krueger, L. A., Gregory, L. C., Stoetzel, C., Jaworek, T. J., Hull, S., Li, A., Plagnol, V., Willen, C. M., Morgan, T. M., Prows, C. A., Hegde, R. S., Riazuddin, S., Grabowski, G. A., ... Ahmed, Z. M. (2014). Neuropathy target esterase impairments cause Oliver–McFarlane and Laurence–Moon syndromes. *Journal of Medical Genetics*, *52*(2), 85–94. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102856>
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes & Development*, *15*(23), 3059–3087. <https://doi.org/10.1101/gad.938601>
- Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., Musolf, A., Li, Q., Holzinger, E., Karyadi, D., Cannon-Albright, L. A., Teerlink, C. C., Stanford, J. L., Isaacs, W. B., Xu, J., Cooney, K. A., Lange, E. M., Schleutker, J., Carpten, J. D., ... Sieh, W. (2016). REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *The American Journal of Human Genetics*, *99*(4), 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.016>
- Jonsen, M. D., Duval, D. L., & Gutierrez-Hartmann, A. (2009). The 26-Amino Acid β -Motif of the Pit-1 β Transcription Factor Is a Dominant and Independent Repressor Domain. *Molecular Endocrinology*, *23*(9), 1371–1384. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0137>
- Jorgez, C. J., Rosenfeld, J. A., Wilken, N. R., Vangapandu, H. V., Sahin, A., Pham, D., Carvalho, C. M. B., Bandholz, A., Miller, A., Weaver, D. D., Burton, B., Babu, D., Bamforth, J. S., Wilks, T., Flynn, D. P., Roeder, E., Patel, A., Cheung, S. W., Lupski, J. R., & Lamb, D. J. (2014). Genitourinary defects associated with genomic deletions in 2p15 encompassing OTX1. *PLoS ONE*, *9*(9), e107028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107028>
- Juanes, M., Di Palma, I., Ciaccio, M., Marino, R., Ramírez, P. C., Pérez Garrido, N., Maceiras, M., Lazzati, J. M., Rivarola, M. A., & Belgorosky, A. (2016). Two novel heterozygous missense variations within the {GLI2} gene in two unrelated Argentine patients. *Medicina*, *76*(4), 213–217.
- Jullien, N., Romanet, P., Philippon, M., Quentien, M.-H., Beck-Peccoz, P., Bergada, I., Odent, S., Reynaud, R., Barlier, A., Saveanu, A., Brue, T., & Castinetti, F. (2018). Heterozygous LHX3 mutations may lead to a mild phenotype of combined pituitary hormone deficiency. *European Journal of Human Genetics*, *27*(2), 216–225. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0264-6>
- Karaca, E., Buyukkaya, R., Pehlivan, D., Charng, W.-L., Yaykasli, K. O., Bayram, Y., Gambin, T., Withers, M., Atik, M. M., Arslanoglu, I., Bolu, S., Erdin, S., Buyukkaya, A., Yaykasli, E., Jhangiani, S. N., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., & Lupski, J. R. (2015). Whole-Exome sequencing identifies homozygous GPR161 mutation in a family with pituitary stalk interruption syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(1), E140–E147. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1984>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, *581*(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kehrer, M., Liehr, T., Benkert, T., Singer, S., Grasshoff, U., Schaeferhoff, K., Bonin, M., Weichselbaum, A., & Tzschach, A. (2015). Interstitial duplication of chromosome region 1q25.1q25.3: Report of a patient with mild cognitive deficits, tall stature and facial dysmorphism. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *167*(3), 653–656. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36943>
- Kim, H.-G., Ahn, J.-W., Kurth, I., Ullmann, R., Kim, H.-T., Kulharya, A., Ha, K.-S., Itokawa, Y.,

- Meliciani, I., Wenzel, W., Lee, D., Rosenberger, G., Ozata, M., Bick, D. P., Sherins, R. J., Nagase, T., Tekin, M., Kim, S.-H., Kim, C.-H., ... Layman, L. C. (2010). WDR11, a WD Protein that Interacts with Transcription Factor EMX1, Is Mutated in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, *87*(4), 465–479. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.08.018>
- Kitzman, J. O., Starita, L. M., Lo, R. S., Fields, S., & Shendure, J. (2015). Massively parallel single-amino-acid mutagenesis. *Nature Methods*, *12*(3), 203–206. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3223>
- Konzak, K. E., & Moore, D. D. (1992). Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Molecular Endocrinology*, *6*(2), 241–247. <https://doi.org/10.1210/mend.6.2.1569967>
- Kottler, M.-L., Counis, R., & Bouchard, P. (1999). Mutations of the gnRH receptor gene. *Archives of Medical Research*, *30*(6), 481–485. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(99\)00072-7](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(99)00072-7)
- Kriström, B., Zdunek, A.-M., Rydh, A., Jonsson, H., Sehlin, P., & Escher, S. A. (2009). A Novel Mutation in The LHX3 Gene is Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency, Hearing Impairment, and Vertebral Malformations. *Molecular Endocrinology*, *23*(2), 277–277. <https://doi.org/10.1210/mend.23.2.9996>
- Kropp, T., & Richardson, R. (2003). Relative inhibitory potencies of chlorpyrifos oxon, chlorpyrifos methyl oxon, and mipafox for acetylcholinesterase versus neuropathy target esterase. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *66*(12), 1145–1157. <https://doi.org/10.1080/15287390306360>
- Kumar, A., Jain, V., Chowdhury, M. R., Kumar, M., Kaur, P., & Kabra, M. (2019). Pathogenic/likely pathogenic variants in the SHOX, GHR and IGFALS genes among Indian children with idiopathic short stature. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *33*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1515/jpem-2019-0234>
- Kwasnieski, J. C., Mogno, I., Myers, C. A., Corbo, J. C., & Cohen, B. A. (2012). Complex effects of nucleotide variants in a mammalian cis -regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(47), 19498–19503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210678109>
- Lacbawan, F., Solomon, B. D., Roessler, E., El-Jaick, K., Domene, S., Velez, J. I., Zhou, N., Hadley, D., Balog, J. Z., Long, R., Fryer, A., Smith, W., Omar, S., McLean, S. D., Clarkson, K., Lichty, A., Clegg, N. J., Delgado, M. R., Levey, E., ... Muenke, M. (2009). Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: Correlation between genotype, phenotype and function. *Journal of Medical Genetics*, *46*(6), 389–398. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.063818>
- Lamolet, B., Pulichino, A.-M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., & Drouin, J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, tpit, activates POMC transcription in cooperation with pitx homeoproteins. *Cell*, *104*(6), 849–859. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00282-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00282-3)
- Langan, E. A., Foitzik-Lau, K., Goffin, V., Ramot, Y., & Paus, R. (2010). Prolactin: An emerging force along the cutaneous–endocrine axis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(9), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.001>
- Lapunzina Badía, P., del Campo Casanelles, M., Delicado Navarro, A., Fernández-Toral, J., García-Alix, A., García-Guereta, L., Pérez Jurado, L. A., Ramos Fuentes, F. J., Sánchez Díaz, A., & Urioste Azcorra, M. (2006). Guía clínica para el seguimiento de pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann. *Anales de Pediatría*, *64*(3), 252–259. <https://doi.org/10.1157/13085513>
- Lee, S., Lee, C. E., Elias, C. F., & Elmquist, J. K. (2009). Expression of the diabetes-associated gene TCF7L2 in adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *517*(6), 925–939. <https://doi.org/10.1002/cne.22199>
- Lee, Y.-H., Sauer, B., & Gonzalez, F. J. (1998). Laron Dwarfism and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Hnf-1 α Knockout Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(5), 3059–3068. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.5.3059>
- Lemyre, E., Lemieux, N., Dacarie, J. C., & Lambert, M. (1998). Del(14)(q22.1q23.2) in a patient with anophthalmia and pituitary hypoplasia. *American Journal of Medical Genetics*, *77*(2),

- 162–165. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19980501\)77:2<162::aid-ajmg10>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19980501)77:2<162::aid-ajmg10>3.0.co;2-l)
- Li, J., Li, N., Ding, Y., Huang, X., Shen, Y., Wang, J., & Wang, X. (2016). Clinical characteristics and follow-up of 5 young Chinese males with gonadotropin-releasing hormone deficiency caused by mutations in the KAL1 gene. *Meta Gene*, 7, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.12.001>
- Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical interpretation of genetic variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *The American Journal of Human Genetics*, 100(2), 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004>
- Li, S., Crenshaw, E. B., III, Rawson, E. J., Simmons, D. M., Swanson, L. W., & Rosenfeld, M. G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*, 347(6293), 528–533. <https://doi.org/10.1038/347528a0>
- Lim, L. P., & Burge, C. B. (2001). A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11193–11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.201407298>
- Lisbjerg, K., Andersen, M. K. G., Bertelsen, M., Brost, A. G., Buchvald, F. F., Jensen, R. B., Bisgaard, A.-M., Rosenberg, T., Tümer, Z., & Kessel, L. (2021). Oliver McFarlane syndrome: Two new cases and a review of the literature. *Ophthalmic Genetics*, 42(4), 464–473. <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.1904419>
- Long, F., Shi, H., Li, P., Guo, S., Ma, Y., Wei, S., Li, Y., Gao, F., Gao, S., Wang, M., Duan, R., Wang, X., Yang, K., Sun, W., Li, X., Li, J., & Liu, Q. (2021). A SMOC2 variant inhibits BMP signaling by competitively binding to BMPR1B and causes growth plate defects. *Bone*, 142, 115686. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115686>
- Lucas-Herald, A. K., Kinning, E., Iida, A., Wang, Z., Miyake, N., Ikegawa, S., McNeilly, J., & Ahmed, S. F. (2015). A case of functional growth hormone deficiency and early growth retardation in a child with IFT172 mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(4), 1221–1224. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3852>
- Luisi, P., García, A., Berros, J. M., Motti, J. M. B., Demarchi, D., Alfaro, E., Aquilano, E., Argüelles, C., Avena, S., Bailliet, G., Beltramo, J., Bravi, C. M., Cuello, M., Dejean, C., Dipierri, J. E., Jurado Medina, L. S., Lanata, J. L., Muzzio, M., Parolin, M. L., ... Dopazo, H. (2020). *Fine-scale genomic analyses of admixed individuals reveal unrecognized genetic ancestry components in Argentina*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2020.01.24.917898>
- Macchiaroli, A., Kelberman, D., Auriemma, R. S., Drury, S., Islam, L., Giangiobbe, S., Ironi, G., Lench, N., Sowden, J. C., Colao, A., Pivonello, R., Cavallo, L., Gasperi, M., & Faienza, M. F. (2014). A novel heterozygous SOX2 mutation causing congenital bilateral anophthalmia, hypogonadotropic hypogonadism and growth hormone deficiency. *Gene*, 534(2), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.043>
- Machinis, K., Pantel, J., Netchine, I., Léger, J., Camand, O. J. A., Sobrier, M.-L., Moal, F. D.-L., Duquesnoy, P., Abitbol, M., Czernichow, P., & Amselem, S. (2001). Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *The American Journal of Human Genetics*, 69(5), 961–968. <https://doi.org/10.1086/323764>
- Majithia, A. R., Tsuda, B., Agostini, M., Gnanapradeepan, K., Rice, R., Peloso, G., Patel, K. A., Zhang, X., Broekema, M. F., Patterson, N., Duby, M., Sharpe, T., Kalkhoven, E., Rosen, E. D., Barroso, I., Ellard, S., Kathiresan, S., O’Rahilly, S., Chatterjee, K., ... Altshuler, D. (2016). Prospective functional classification of all possible missense variants in PPARG. *Nature Genetics*, 48(12), 1570–1575. <https://doi.org/10.1038/ng.3700>
- Marino, R., Chaler, E., Warman, M., Ciaccio, M., Berensztein, E., Rivarola, M. A., & Belgorosky, A. (2003). The Serum Growth Hormone (GH) Response to Provocative Tests Is Dependent on Type of Assay in Autosomal Dominant Isolated GH Deficiency because of an ARG183HIS (R183H) GH-I Gene Mutation. *Clinical Chemistry*, 49(6), 1002–1005. <https://doi.org/10.1373/49.6.1002>
- Martinez, R., & Gomes, F. C. A. (2002). Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49311–49318.

<https://doi.org/10.1074/jbc.m209284200>

- Matsumoto, R., & Takahashi, Y. (2020). Human pituitary development and application of iPSCs for pituitary disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(5), 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03692-8>
- McCabe, M. J., Gaston-Massuet, C., Tziaferi, V., Gregory, L. C., Alatzoglou, K. S., Signore, M., Puelles, E., Gerrelli, D., Farooqi, I. S., Raza, J., Walker, J., Kavanaugh, S. I., Tsai, P.-S., Pitteloud, N., Martinez-Barbera, J.-P., & Dattani, M. T. (2011). Novel FGF8 Mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), E1709–E1718. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0454>
- Meazza, C., Lausch, E., Pagani, S., Bozzola, E., Calcaterra, V., Superti-Furga, A., Silengo, M., & Bozzola, M. (2013). 3-M syndrome associated with growth hormone deficiency: 18 year follow-up of a patient. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-21>
- Mehta, A., & Dattani, M. T. (n.d.). Congenital disorders of the hypothalamic-pituitary axis. In *Clinical Pediatric Endocrinology* (pp. 67–89). Blackwell Publishing Ltd. Retrieved June 15, 2022, from <http://dx.doi.org/10.1002/9780470987117.ch4>
- Mendonca, B. B., Osorio, M. G. F., Latronico, A. C., Estefan, V., Lo, L. S. S., & Arnhold, I. J. P. (1999). Longitudinal Hormonal and Pituitary Imaging Changes in Two Females with Combined Pituitary Hormone Deficiency due to Deletion of A301,G302 in the PROP1 Gene1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(3), 942–945. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5537>
- Meyts, I., Bosch, B., Bolze, A., Boisson, B., Itan, Y., Belkadi, A., Pedergnana, V., Moens, L., Picard, C., Cobat, A., Bossuyt, X., Abel, L., & Casanova, J.-L. (2016). Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 957–969. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.003>
- Meza, G., Acuña, D., & Escobar, C. (1996). Development of vestibular and auditory function: Effects of hypothyroidism and thyroxine replacement therapy on nystagmus and auditory evoked potentials in the pigmented rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(4), 515–522. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(95\)00100-x](https://doi.org/10.1016/0736-5748(95)00100-x)
- Ming, J. E., Roessler, E., & Muenke, M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular Medicine Today*, 4(8), 343–349. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(98\)01299-4](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(98)01299-4)
- Miyakoshi, T., Kajiya, H., Miyajima, K., Takei, M., Tobita, M., Takekoshi, S., & Osamura, R. Y. (2009). The expression of wnt4 is regulated by estrogen via an estrogen receptor alpha-dependent pathway in rat pituitary growth hormone-producing cells. *ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA*, 42(6), 205–213. <https://doi.org/10.1267/ahc.09033>
- Miyata, I., Cogan, J. D., Prince, M. A., Kamijo, T., Ogawa, M., & Phillips, J. A. (1997). Detection of growth hormone gene defects by dideoxy fingerprinting (ddf). *Endocrine Journal*, 44(1), 149–154. <https://doi.org/10.1507/endocrj.44.149>
- Miyata, R., Hayashi, M., Miyai, K., Akashi, T., Kato, M., & Kohyama, J. (2009). Analysis of the hypothalamus in a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG). *Brain and Development*, 31(6), 456–460. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.08.008>
- Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., Cheng, S. H., Joyner, A. L., & Hui, C. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*, 124(1), 113–123. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.113>
- Mortensen, A. H., Schade, V., Lamonerie, T., & Camper, S. A. (2014). Deletion of OTX2 in neural ectoderm delays anterior pituitary development. *Human Molecular Genetics*, 24(4), 939–953. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu506>
- Mullen, R. D., Colvin, S. C., Hunter, C. S., Savage, J. J., Walvoord, E. C., Bhangoo, A. P. S., Ten, S., Weigel, J., Pfäffle, R. W., & Rhodes, S. J. (2007). Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.019>

- Muzzio, M., Motti, J. M. B., Paz Sepulveda, P. B., Yee, M., Cooke, T., Santos, M. R., Ramallo, V., Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Bailliet, G., Bravi, C. M., Bustamante, C. D., & Kenny, E. E. (2018). Population structure in Argentina. *PLOS ONE*, *13*(5), e0196325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196325>
- Nakaguma, M., Correa, F. A., Santana, L. S., Benedetti, A. F. F., Perez, R. V., Huayllas, M. K. P., Miras, M. B., Funari, M. F. A., Lerario, A. M., Mendonca, B. B., Carvalho, L. R. S., Jorge, A. A. L., & Arnhold, I. J. P. (2019). Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: Novel pathogenic variants in *GLI2*, *OTX2* and *GHRHR*. *Endocrine Connections*, *8*(5), 590–595. <https://doi.org/10.1530/ec-19-0085>
- Navardauskaite, R., Dusatkova, P., Obermannova, B., Pfaeffle, R. W., Blum, W. F., Adukauskiene, D., Smetanina, N., Cinek, O., Verkauskiene, R., & Lebl, J. (2014). High Prevalence of PROP1 Defects in Lithuania: Phenotypic Findings in an Ethnically Homogenous Cohort of Patients With Multiple Pituitary Hormone Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *99*(1), 299–306. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3090>
- Ness, G. C., & Lopez, D. (1995). Transcriptional regulation of rat hepatic low-density lipoprotein receptor and cholesterol 7 α hydroxylase by thyroid hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *323*(2), 404–408. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.0061>
- Niewiadomski, P., Kong, J. H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E. W., Khan, S., Teruel, M. N., Novitch, B. G., & Rohatgi, R. (2014). Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate hedgehog signaling. *Cell Reports*, *6*(1), 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.003>
- Niewiadomski, P., Niedziółka, S. M., Markiewicz, Ł., Uśpieński, T., Baran, B., & Chojnowska, K. (2019). Gli proteins: Regulation in development and cancer. *Cells*, *8*(2), 147. <https://doi.org/10.3390/cells8020147>
- Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., & Itoh, N. (2000). FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 iiib in mouse multi-organ development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *277*(3), 643–649. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3721>
- Oitz, M. (1997). Behavioral and neuroendocrine responses controlled by the concerted action of central mineralocorticoid (MRS) and glucocorticoid receptors (GRS). *Psychoneuroendocrinology*, *22*, S87–S93. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(97\)00020-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00020-6)
- Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R., & Wondisford, F. E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, *10*(10), 582–591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.143>
- Otto, A. P., França, M. M., Correa, F. A., Costalonga, E. F., Leite, C. C., Mendonca, B. B., Arnhold, I. J. P., Carvalho, L. R. S., & Jorge, A. A. L. (2014). Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: A long term follow-up of patients from a single center. *Pituitary*, *18*(4), 561–567. <https://doi.org/10.1007/s11102-014-0610-9>
- Pan, Y., & Wang, B. (2007). A novel protein-processing domain in *gli2* and *gli3* differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(15), 10846–10852. <https://doi.org/10.1074/jbc.m608599200>
- Pantel, J. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(3), 760–768. <https://doi.org/10.1172/jci25303>
- Patel, C. R., Fernandez-Miranda, J. C., Wang, W.-H., & Wang, E. W. (2016). Skull base anatomy. *Otolaryngologic Clinics of North America*, *49*(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.09.001>
- Paulo, S. S., Fernandes-Rosa, F. L., Turatti, W., Coeli-Lacchini, F. B., Martinelli, C. E., Jr, Nakiri, G. S., Moreira, A. C., Santos, A. C., de Castro, M., & Antonini, S. R. (2014). Sonic Hedgehog mutations are not a common cause of congenital hypopituitarism in the absence of complex midline cerebral defects. *Clinical Endocrinology*, *82*(4), 562–569. <https://doi.org/10.1111/cen.12565>
- Pellegrini-Bouiller, I., Bélicar, P., Barlier, A., Gunz, G., Charvet, J. P., Jaquet, P., Brue, T., Vialettes, B.,

- & Enjalbert, A. (1996). A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *81*(8), 2790–2796. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.8.8768831>
- Pelletier, F., Perrier, S., Cayami, F. K., Mirchi, A., Saikali, S., Tran, L. T., Ulrick, N., Guerrero, K., Rampakakis, E., van Spaendonk, R. M. L., Naidu, S., Pohl, D., Gibson, W. T., Demos, M., Goizet, C., Tejera-Martin, I., Potic, A., Fogel, B. L., Brais, B., ... Bernard, G. (2020). Endocrine and growth abnormalities in 4H leukodystrophy caused by variants in POLR3A, POLR3B, and POLR1C. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *106*(2), e660–e674. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa700>
- Pérez Millán, M. I., Brinkmeier, M. L., Mortensen, A. H., & Camper, S. A. (2016). PROP1 triggers epithelial-mesenchymal transition-like process in pituitary stem cells. *ELife*, *5*. <https://doi.org/10.7554/elife.14470>
- Pérez Millán, M. I., Vishnopolska, S. A., Daly, A. Z., Bustamante, J. P., Seilicovich, A., Bergadá, I., Braslavsky, D., Keselman, A. C., Lemons, R. M., Mortensen, A. H., Marti, M. A., Camper, S. A., & Kitzman, J. O. (2018). Next generation sequencing panel based on single molecule molecular inversion probes for detecting genetic variants in children with hypopituitarism. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *6*(4), 514–525. <https://doi.org/10.1002/mgg3.395>
- Pernasetti, F., Toledo, S. P. A., Vasilyev, V. V., Hayashida, C. Y., Cogan, J. D., Ferrari, C., Lourenço, D. M., & Mellon, P. L. (2000). Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301–302delag) in the prophet of pit-1 gene1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(1), 390–397. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.1.6324>
- Pfaeffle, R. W., Hunter, C. S., Savage, J. J., Duran-Prado, M., Mullen, R. D., Neeb, Z. P., Eiholzer, U., Hesse, V., Haddad, N. G., Stobbe, H. M., Blum, W. F., Weigel, J. F. W., & Rhodes, S. J. (2008). Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *93*(3), 1062–1071. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1525>
- Pfaeffle, R. W., Savage, J. J., Hunter, C. S., Palme, C., Ahlmann, M., Kumar, P., Bellone, J., Schoenau, E., Korsch, E., Brämwig, J. H., Stobbe, H. M., Blum, W. F., & Rhodes, S. J. (2007). Four novel mutations of the LHX3 gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *92*(5), 1909–1919. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2177>
- Prasad, R., Nicholas, A. K., Schoenmakers, N., & Barton, J. (2019). Haploinsufficiency of *NKX2-1* in brain-lung-thyroid syndrome with additional multiple pituitary dysfunction. *Hormone Research in Paediatrics*, *92*(5), 340–344. <https://doi.org/10.1159/000503683>
- Prokop, J. W., May, T., Strong, K., Bilinovich, S. M., Bupp, C., Rajasekaran, S., Worthey, E. A., & Lazar, J. (2018). Genome sequencing in the clinic: The past, present, and future of genomic medicine. *Physiological Genomics*, *50*(8), 563–579. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00046.2018>
- Pulichino, A., Lamolet, B., Vallette-Kasic, S., Poulin, G., Chu, K., Gillemot, F., Tsai, M., & Drouin, J. (2004). *Tpit*^{-/-}*NeuroD1*^{-/-} mice reveal novel aspects of corticotroph development. *Endocrine Research*, *30*(4), 551–552. <https://doi.org/10.1081/erc-200043625>
- Pulichino, A.-M., Vallette-Kasic, S., Tsai, J. P.-Y., Couture, C., Gauthier, Y., & Drouin, J. (2003). *Tpit* determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes & Development*, *17*(6), 738–747. <https://doi.org/10.1101/gad.1065703>
- Pusapati, G. V., Kong, J. H., Patel, B. B., Krishnan, A., Sagner, A., Kinnebrew, M., Briscoe, J., Aravind, L., & Rohatgi, R. (2018). CRISPR Screens Uncover Genes that Regulate Target Cell Sensitivity to the Morphogen Sonic Hedgehog. *Developmental Cell*, *44*(2), 271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.002>
- Radovick, S., Nations, M., Du, Y., Berg, L. A., Weintraub, B. D., & Wondisford, F. E. (1992). A mutation in the pou-homeodomain of pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*, *257*(5073), 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1115>

- Rajab, A., Kelberman, D., de Castro, S. C. P., Biebermann, H., Shaikh, H., Pearce, K., Hall, C. M., Shaikh, G., Gerrelli, D., Grueters, A., Krude, H., & Dattani, M. T. (2008). Novel mutations in LHX3 are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. *Human Molecular Genetics*, *17*(14), 2150–2159. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn114>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G. W., Philpott, M. P., Esterbauer, H., Hauser-Kronberger, C., Frischauf, A.-M., & Aberger, F. (2004). Activation of the BCL2 promoter in response to hedgehog/gli signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Research*, *64*(21), 7724–7731. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-1085>
- Regl, G., Neill, G. W., Eichberger, T., Kasper, M., Ikram, M. S., Koller, J., Hintner, H., Quinn, A. G., Frischauf, A.-M., & Aberger, F. (2002). Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene*, *21*(36), 5529–5539. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205748>
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2018). CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D886–D894. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>
- Reynaud, R., Gueydan, M., Saveanu, A., Vallette-Kasic, S., Enjalbert, A., Brue, T., & Barlier, A. (2006). Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: Experience in 195 patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91*(9), 3329–3336. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2173>
- Rhodes, S. J., Chen, R., DiMattia, G. E., Scully, K. M., Kalla, K. A., Lin, S. C., Yu, V. C., & Rosenfeld, M. G. (1993). A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the pit-1 gene. *Genes & Development*, *7*(6), 913–932. <https://doi.org/10.1101/gad.7.6.913>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riepe, F. G., Partsch, C.-J., Blankenstein, O., Mönig, H., Pfäffle, R. W., & Sippell, W. G. (2001). Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(9), 4353–4357. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.9.7828>
- Rochette, C., Jullien, N., Saveanu, A., Caldagues, E., Bergada, I., Braslavsky, D., Pfeifer, M., Reynaud, R., Herman, J.-P., Barlier, A., Brue, T., Enjalbert, A., & Castinetti, F. (2015). Identifying the deleterious effect of rare LHX4 allelic variants, a challenging issue. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126648>
- Roessler, E., Du, Y.-Z., Mullor, J. L., Casas, E., Allen, W. P., Gillissen-Kaesbach, G., Roeder, E. R., Ming, J. E., Altaba, A. R. i, & Muenke, M. (2003). Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(23), 13424–13429. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235734100>
- Roessler, E., Ermilov, A. N., Grange, D. K., Wang, A., Grachtchouk, M., Dlugosz, A. A., & Muenke, M. (2005). A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Human Molecular Genetics*, *14*(15), 2181–2188. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi222>
- Rughani, A., Zhang, D., Vairamani, K., Dauber, A., Hwa, V., & Krishnan, S. (2020). Severe growth failure associated with a novel heterozygous nonsense mutation in the GHR transmembrane domain leading to elevated growth hormone binding protein. *Clinical Endocrinology*, *92*(4), 331–337. <https://doi.org/10.1111/cen.14148>
- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F. T., Law, M. L., Seunanez, H. N.,

- O'Brien, S. J., & Vogelstein, B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Molecular and Cellular Biology*, 8(8), 3104–3113. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.8.3104>
- Salvatori, R., Hayashida, C. Y., Aguiar-Oliveira, M. H., Phillips, J. A., III, Souza, A. H. O., Gondo, R. G., Toledo, S. P. A., Conceição, M. M., Prince, M., Maheshwari, H. G., Baumann, G., & Levine, M. A. (1999). Familial Dwarfism due to a Novel Mutation of the Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Gene1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(3), 917–923. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5599>
- Santos, N., & Reiter, J. F. (2014). A central region of Gli2 regulates its localization to the primary cilium and transcriptional activity. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.139253>
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: Implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, 126(17), 3915–3924. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3915>
- Scala, M., Accogli, A., Allegri, A. M. E., Tassano, E., Severino, M., Morana, G., Maghnie, M., & Capra, V. (2019). Familial ROBO1 deletion associated with ectopic posterior pituitary, duplication of the pituitary stalk and anterior pituitary hypoplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(1), 95–99. <https://doi.org/10.1515/jpem-2018-0272>
- Schanke, J. T., Conwell, C. M., Durning, M., Fisher, J. M., & Golos, T. G. (1997). Pit-1/Growth hormone factor 1 splice variant expression in the rhesus monkey pituitary gland and the rhesus and human placenta1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(3), 800–807. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.3.3791>
- Schneider, M. J., Fiering, S. N., Pallud, S. E., Parlow, A. F., St. Germain, D. L., & Galton, V. A. (2001). Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Molecular Endocrinology*, 15(12), 2137–2148. <https://doi.org/10.1210/mend.15.12.0740>
- Schwartzentruber, J., Buhas, D., Majewski, J., Sasarman, F., Papillon-Cavanagh, S., Thiffaut, I., Sheldon, K. M., Massicotte, C., Patry, L., Simon, M., Zare, A. S., McKernan, K. J., Michaud, J., Boles, R. G., Deal, C. L., Desilets, V., Shoubridge, E. A., & Samuels, M. E. (2014). Mutation in the nuclear-encoded mitochondrial isoleucyl-trna synthetase*2* in patients with cataracts, growth hormone deficiency with short stature, partial sensorineural deafness, and peripheral neuropathy or with leigh syndrome. *Human Mutation*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/humu.22629>
- Scotti, M. M., & Swanson, M. S. (2015). RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics*, 17(1), 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.3>
- Seczynska, M., Bloor, S., Cuesta, S. M., & Lehner, P. J. (2021). Genome surveillance by HUSH-mediated silencing of intronless mobile elements. *Nature*, 601(7893), 440–445. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04228-1>
- Selmer, K. K., Bryne, E., Rødningen, O. K., & Fannemel, M. (2012). A de novo 163 kb interstitial 1q44 microdeletion in a boy with thin corpus callosum, psychomotor delay and seizures. *European Journal of Medical Genetics*, 55(12), 715–718. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.08.005>
- Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L. M., Small, K. W., Datson, N. A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B. U., Carey, J. C., & Murray, J. C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, 14(4), 392–399. <https://doi.org/10.1038/ng1296-392>
- Shi, C., Wang, F., Tong, A., Zhang, X.-Q., Song, H.-M., Liu, Z.-Y., Lyu, W., Liu, Y.-H., & Xia, W.-B. (2016). NFKB2 mutation in common variable immunodeficiency and isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency. *Medicine*, 95(40), e5081. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000005081>
- Shimo, N., Yasuda, T., Kitamura, T., Matsushita, K., Osawa, S., Yamamoto, Y., Kozawa, J., Otsuki, M., Funahashi, T., Imagawa, A., Kaneto, H., Nishida, K., & Shimomura, I. (2014). Aniridia with a Heterozygous &PAX6 Mutation in which the Pituitary Function was Partially Impaired. *Internal Medicine*, 53(1), 39–42. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.1184>
- Simioni, M., Araujo, T. K., Monlleo, I. L., Maurer-Morelli, C. V., & Gil-da-Silva-Lopes, V. L. (2014).

- Investigation of genetic factors underlying typical orofacial clefts: Mutational screening and copy number variation. *Journal of Human Genetics*, 60(1), 17–25.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2014.96>
- Simm, F., Griesbeck, A., Choukair, D., Weiß, B., Paramasivam, N., Klammt, J., Schlesner, M., Wiemann, S., Martinez, C., Hoffmann, G. F., Pfäffle, R. W., Bettendorf, M., & Rappold, G. A. (2018). Identification of SLC20A1 and SLC15A4 among other genes as potential risk factors for combined pituitary hormone deficiency. *Genetics in Medicine*, 20(7), 728–736.
<https://doi.org/10.1038/gim.2017.165>
- Sjödal, M., & Gunhaga, L. (2008). Expression patterns of Shh, Ptc2, Raldh3, Pitx2, Isl1, Lim3 and Pax6 in the developing chick hypophyseal placode and Rathke's pouch. *Gene Expression Patterns*, 8(7–8), 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.06.007>
- Slabaugh, M. B., Lieberman, M. E., Rutledge, J. J., & Gorski, J. (1981). Growth hormone and prolactin synthesis in normal and homozygous snell and ames dwarf mice*. *Endocrinology*, 109(4), 1040–1046. <https://doi.org/10.1210/endo-109-4-1040>
- Sloop, K. W., Meier, B. C., Bridwell, J. L., Parker, G. E., Schiller, A. M., & Rhodes, S. J. (1999). Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct DNA binding properties. *Molecular Endocrinology*, 13(12), 2212–2225.
<https://doi.org/10.1210/mend.13.12.0395>
- Smith, J. D., Hing, A. V., Clarke, C. M., Johnson, N. M., Perez, F. A., Park, S. S., Horst, J. A., Mecham, B., Maves, L., Nickerson, D. A., & Cunningham, M. L. (2014). Exome sequencing identifies a recurrent de novo ZSWIM6 mutation associated with acromelic frontonasal dysostosis. *The American Journal of Human Genetics*, 95(2), 235–240.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.07.008>
- Sobrier, M.-L., Tsai, Y.-C., Pérez, C., Leheup, B., Bouceba, T., Duquesnoy, P., Copin, B., Sizova, D., Penzo, A., Stanger, B. Z., Cooke, N. E., Liebhaber, S. A., & Amselem, S. (2015). Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: A novel etiology for IGHD. *Human Molecular Genetics*, 25(3), 472–483.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv486>
- Soemedi, R., Cygan, K. J., Rhine, C. L., Wang, J., Bulacan, C., Yang, J., Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., & Fairbrother, W. G. (2017). Pathogenic variants that alter protein code often disrupt splicing. *Nature Genetics*, 49(6), 848–855. <https://doi.org/10.1038/ng.3837>
- Sornson, M. W., Wu, W., Dasen, J. S., Flynn, S. E., Norman, D. J., O'Connell, S. M., Gukovsky, I., Carrière, C., Ryan, A. K., Miller, A. P., Zuo, L., Gleiberman, A. S., Andersen, B., Beamer, W. G., & Rosenfeld, M. G. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384(6607), 327–333.
<https://doi.org/10.1038/384327a0>
- Spiegel, R., Shalev, S. A., Adawi, A., Sprecher, E., & Tenenbaum-Rakover, Y. (2010). ANE syndrome caused by mutated RBM28 gene: A novel etiology of combined pituitary hormone deficiency. *European Journal of Endocrinology*, 162(6), 1021–1025. <https://doi.org/10.1530/eje-10-0077>
- Stefan, C. P., Koehler, J. W., & Minogue, T. D. (2016). Targeted next-generation sequencing for the detection of ciprofloxacin resistance markers using molecular inversion probes. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep25904>
- Stephen, J., Vilboux, T., Mian, L., Kuptanon, C., Sinclair, C. M., Yildirimli, D., Maynard, D. M., Bryant, J., Fischer, R., Vemulapalli, M., Mullikin, J. C., Huizing, M., Gahl, W. A., Malicdan, M. C. V., & Gunay-Aygun, M. (2017). Mutations in KIAA0753 cause Joubert syndrome associated with growth hormone deficiency. *Human Genetics*, 136(4), 399–408.
<https://doi.org/10.1007/s00439-017-1765-z>
- Stewart, C. (1983). Septo-optic dysplasia and median cleft face syndrome in a patient with isolated growth hormone deficiency and hyperprolactinemia. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 137(5), 484. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1983.02140310062018>
- Suh, H., Gage, P. J., Drouin, J., & Camper, S. A. (2002). Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: Pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, 129(2), 329–337. <https://doi.org/10.1242/dev.129.2.329>
- Sun, Y., Bak, B., Schoenmakers, N., van Trotsenburg, A. S. P., Oostdijk, W., Voshol, P., Cambridge,

- E., White, J. K., le Tissier, P., Gharavy, S. N. M., Martinez-Barbera, J. P., Stokvis-Brantsma, W. H., Vulsma, T., Kempers, M. J., Persani, L., Campi, I., Bonomi, M., Beck-Peccoz, P., Zhu, H., ... Bernard, D. J. (2012). Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nature Genetics*, *44*(12), 1375–1381. <https://doi.org/10.1038/ng.2453>
- Svärd, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergström, Å., Ericson, J., Toftgård, R., & Teglund, S. (2006). Genetic elimination of suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian hedgehog signaling pathway. *Developmental Cell*, *10*(3), 409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.013>
- Swanson, E. A., Gloss, B., Belke, D. D., Kaneshige, M., Cheng, S.-Y., & Dillmann, W. H. (2003). Cardiac Expression and Function of Thyroid Hormone Receptor β and Its PV Mutant. *Endocrinology*, *144*(11), 4820–4825. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0522>
- Synofzik, M., Gonzalez, M. A., Lourenco, C. M., Coutelier, M., Haack, T. B., Rebelo, A., Hannequin, D., Strom, T. M., Prokisch, H., Kernstock, C., Durr, A., Schöls, L., Lima-Martínez, M. M., Farooq, A., Schüle, R., Stevanin, G., Marques, W., Jr., & Züchner, S. (2013). PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhäuser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain*, *137*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1093/brain/awt326>
- Tajima, T., Hattori, T., Nakajima, T., Okuhara, K., Tsubaki, J., & Fujieda, K. (2007). A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocrine Journal*, *54*(4), 637–641. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k06-200>
- Tajima, T., Ohtake, A., Hoshino, M., Amemiya, S., Sasaki, N., Ishizu, K., & Fujieda, K. (2009). OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*(1), 314–319. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1219>
- Takagi, M., Dobashi, K., Nagahara, K., Kato, M., Nishimura, G., Fukuzawa, R., Narumi, S., & Hasegawa, T. (2017). A novel de novo germline mutation Glu40Lys in AKT3 causes megalencephaly with growth hormone deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *173*(4), 1071–1076. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38099>
- Takagi, M., Ishii, T., Inokuchi, M., Amano, N., Narumi, S., Asakura, Y., Muroya, K., Hasegawa, Y., Adachi, M., & Hasegawa, T. (2012). Gradual loss of ACTH due to a novel mutation in LHX4: Comprehensive mutation screening in Japanese patients with congenital hypopituitarism. *PLoS ONE*, *7*(9), e46008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046008>
- Takuma, N., Sheng, H. Z., Furuta, Y., Ward, J. M., Sharma, K., Hogan, B. L., Pfaff, S. L., Westphal, H., Kimura, S., & Mahon, K. A. (1998). Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*, *125*(23), 4835–4840. <https://doi.org/10.1242/dev.125.23.4835>
- Tata, B., Huijbregts, L., Jacquier, S., Csaba, Z., Genin, E., Meyer, V., Leka, S., Dupont, J., Charles, P., Chevenne, D., Carel, J.-C., Léger, J., & de Roux, N. (2014). Haploinsufficiency of *dmx12*, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of *gnrh* neurons in mouse. *PLoS Biology*, *12*(9), e1001952. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001952>
- Tatsi, C., Sertedaki, A., Voutetakis, A., Valavani, E., Magiakou, M.-A., Kanaka-Gantenbein, C., Chrousos, G. P., & Dacou-Voutetakis, C. (2013). Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(4), E779–E784. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3982>
- Tatsi, C., & Stratakis, C. A. (2019). The genetics of pituitary adenomas. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(1), 30. <https://doi.org/10.3390/jcm9010030>
- Tatsumi, K., Miyai, K., Notomi, T., Kaibe, K., Amino, N., Mizuno, Y., & Kohno, H. (1992). Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature Genetics*, *1*(1), 56–58. <https://doi.org/10.1038/ng0492-56>
- Tempé, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.-F., & Concordet, J.-P. (2006). Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 β Phosphorylation Leads to Gli3 Ubiquitination by SCF β TrCP. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(11), 4316–4326.

<https://doi.org/10.1128/mcb.02183-05>

- Tolosa, E. J., Fernandez-Barrena, M. G., Iguchi, E., McCleary-Wheeler, A. L., Carr, R. M., Almada, L. L., Flores, L. F., Vera, R. E., Alfonse, G. W., Marks, D. L., Hogenson, T. L., Vrabel, A. M., Horn, I. P., Koenig, A. N., Safgren, S. L., Sigafos, A. N., Erkan, M., Romecin-Duran, P. A., Sarabia Gonzalez, A., ... Fernandez-Zapico, M. E. (2020). GLI1/GLI2 functional interplay is required to control Hedgehog/GLI targets gene expression. *Biochemical Journal*, *477*(17), 3131–3145. <https://doi.org/10.1042/bcj20200335>
- Treier, M., Gleiberman, A. S., O'Connell, S. M., Szeto, D. P., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Rosenfeld, M. G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes & Development*, *12*(11), 1691–1704. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1691>
- Treier, M., O'Connell, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D. P., Burgess, R., Chuang, P. T., McMahon, A. P., & Rosenfeld, M. G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*, *128*(3), 377–386. <https://doi.org/10.1242/dev.128.3.377>
- Tripathi, K., Mani, C., Barnett, R., Nalluri, S., Bachaboina, L., Rocconi, R. P., Athar, M., Owen, L. B., & Palle, K. (2014). Gli1 protein regulates the s-phase checkpoint in tumor cells via bid protein, and its inhibition sensitizes to DNA topoisomerase 1 inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(45), 31513–31525. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.606483>
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., & Pfaff, S. L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, *79*(6), 957–970. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90027-2)
- Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009). Massively parallel sequencing: The next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics*, *85*(2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022>
- Turner, E. H., Lee, C., Ng, S. B., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2009). Massively parallel exon capture and library-free resequencing across 16 genomes. *Nature Methods*, *6*(5), 315–316. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.248>
- Turton, J. P. G., Reynaud, R., Mehta, A., Torpiano, J., Saveanu, A., Woods, K. S., Tiulpakov, A., Zdravkovic, V., Hamilton, J., Attard-Montalto, S., Parascandolo, R., Vella, C., Clayton, P. E., Shalet, S., Barton, J., Brue, T., & Dattani, M. T. (2005). Novel mutations within the POU1F1 gene associated with variable combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(8), 4762–4770. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0570>
- Vajravelu, M. E., Chai, J., Krock, B., Baker, S., Langdon, D., Alter, C., & De León, D. D. (2018). Congenital hyperinsulinism and hypopituitarism attributable to a mutation in FOXA2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *103*(3), 1042–1047. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02157>
- Valenza, F., Cittaro, D., Stupka, E., Biancolini, D., Patricelli, M. G., Bonanomi, D., & Lazarević, D. (2019). A novel truncating variant of GLI2 associated with Culler-Jones syndrome impairs Hedgehog signalling. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210097>
- Valette-Kasic, S., Brue, T., Pulichino, A.-M., Gueydan, M., Barlier, A., David, M., Nicolino, M., Malpuech, G., Déchelotte, P., Deal, C., Van Vliet, G., De Vroede, M., Riepe, F. G., Partsch, C.-J., Sippell, W. G., Berberoglu, M., Atasay, B., de Zegher, F., Beckers, D., ... Drouin, J. (2005). Congenital Isolated Adrenocorticotropin Deficiency: An Underestimated Cause of Neonatal Death, Explained by TPIT Gene Mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(3), 1323–1331. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1300>
- Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., & Ng, P. C. (2015). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>
- Wallis, M. (2018). Evolution of the POU1F1 transcription factor in mammals: Rapid change of the alternatively-spliced β -domain. *General and Comparative Endocrinology*, *260*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.005>
- Wang, Y., & Ge, W. (2003). Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: Evidence for paracrine action of activin on the oocytes1. *Biology of Reproduction*, *69*(6), 1998–2006. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020826>
- Ward, R. D., Raetzman, L. T., Suh, H., Stone, B. M., Nasonkin, I. O., & Camper, S. A. (2005). Role of

- PROP1 in pituitary gland growth. *Molecular Endocrinology*, *19*(3), 698–710.
<https://doi.org/10.1210/me.2004-0341>
- Ward, R. D., Stone, B. M., Raetzman, L. T., & Camper, S. A. (2006). Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Molecular Endocrinology*, *20*(6), 1378–1390. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0409>
- Waung, J. A., Bassett, J. H. D., & Williams, G. R. (2012). Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(4), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.11.002>
- Weile, J., & Roth, F. P. (2018). Multiplexed assays of variant effects contribute to a growing genotype–phenotype atlas. *Human Genetics*, *137*(9), 665–678.
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-1916-x>
- Welcker, J. E., Hernandez-Miranda, L. R., Paul, F. E., Jia, S., Ivanov, A., Selbach, M., & Birchmeier, C. (2013). Insm1 controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and for recruitment of histone-modifying factors. *Development*, *140*(24), 4947–4958. <https://doi.org/10.1242/dev.097642>
- Wit, J. M., Oostdijk, W., Losekoot, M., van Duyvenvoorde, H. A., Ruivenkamp, C. A. L., & Kant, S. G. (2016). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *European Journal of Endocrinology*, *174*(4), R145–R173. <https://doi.org/10.1530/eje-15-0937>
- Wu, W., Cogan, J. D., Pfäffle, R. W., Dasen, J. S., Frisch, H., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Brown, M. R., Mullis, P. E., Parks, J. S., Phillips III, J. A., & Rosenfeld, M. G. (1998). Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genetics*, *18*(2), 147–149. <https://doi.org/10.1038/ng0298-147>
- Xue, Y., Ankala, A., Wilcox, W. R., & Hegde, M. R. (2015). Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genetics in Medicine*, *17*(6), 444–451.
<https://doi.org/10.1038/gim.2014.122>
- Yu, C., Xie, B., Zhao, Z., Zhao, S., Liu, L., Cheng, X., Li, X., Cao, B., Shao, J., Chen, J., Zhao, H., Yan, Z., Su, C., Niu, Y., Song, Y., Wei, L., Wang, Y., Ren, X., Fan, L., ... Wu, N. (2021). Whole exome sequencing uncovered the genetic architecture of growth hormone deficiency patients. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.711991>
- Zeng, T., & Li, Y. I. (2021). *Predicting RNA splicing from DNA sequence using Pangolin*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.07.06.451243>
- Zhao, L., Bakke, M., & Parker, K. L. (2001). Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *185*(1–2), 27–32.
[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00621-9](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00621-9)
- Zhao, L., Zevallos, S. E., Rizzoti, K., Jeong, Y., Lovell-Badge, R., & Epstein, D. J. (2012). Disruption of SoxB1-Dependent Sonic hedgehog Expression in the Hypothalamus Causes Septo-optic Dysplasia. *Developmental Cell*, *22*(3), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.023>
- Zhao, Y., Mailloux, C. M., Hermes, E., Palkóvits, M., & Westphal, H. (2010). A role of the LIM-homeobox gene Lhx2 in the regulation of pituitary development. *Developmental Biology*, *337*(2), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.002>
- Zipf, W. B., Kelch, R. P., & Bacon, G. E. (2008). Variable X-linked recessive hypopituitarism with evidence of gonadotropin deficiency in two pre-pubertal males. *Clinical Genetics*, *11*(3), 249–254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1977.tb01309.x>