



Supplementary material

Molecular Analysis of BMPR2, TBX4, and KCNK3 and Genotype-Phenotype Correlations in Spanish Patients and Families With Idiopathic and Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension

Paula Navas ^{a,b,◇}, Jair Tenorio ^{c,d,◇}, Carlos Andrés Quezada ^a, Elvira Barrios ^e, Gema Gordo ^{c,d}, Pedro Arias ^{c,d}, Manuel LÓPEZ Meseguer ^{c,f}, Alejandro Santos Lozano ^{g,h}, Julian Palomino Doza ^{b,i}, Pablo Lapunzina ^{c,d,◇} and Pilar Escribano Subías ^{a,b,◇,*}

^a*Red de Investigación Cardiovascular, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España*

^b*Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España*

^c*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España*

^d*Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, España*

^e*Servicio de Cardiología Pediátrica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España*

^f*Servicio de Neumología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España*

^g*Grupo de Investigación en Discapacidad Física y Sensorial (GIDFYS), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Europea Miguel de Cervantes, Valladolid, España*

^h*Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, España*

ⁱ*Unidad de Cardiopatías Familiares, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España*

MATERIAL SUPLEMENTARIO

ANEXO 1

Extracción de ADN y protocolos de secuenciación y Multiplex ligation probe amplification (MLPA).

Para ello, hemos diseñado y utilizado el siguiente protocolo de PCR, con las siguientes condiciones: 1- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos con los siguientes pasos: 1) Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, 2) Alineamiento con temperatura específica de oligo durante 30 segundos y 3) una extensión a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el kit Illustra ExoProStar (GE Healthcare, GB) seguido de una secuenciación mediante el kit BigDye Terminator 3.1 (Life Technologies, EU) para, finalmente, precipitar las secuencias mediante la técnica de bolitas magnéticas usando el Kit Agencourt CleanSeq (Beckman-Coulter, EU) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó utilizando el secuenciador 3730XL (Life Technologies, USA). Para poder analizar los electroferogramas se utilizó el software Sequencher Portable v4.1.4 (GeneCodes, EU).

Para realizar el estudio de posibles reordenamientos genómicos en el gen *BMPR2* se utilizó el kit comercial p093-C1 (MRC-Holland, Holanda) que incluye sondas para detectar ganancias y pérdidas de material genético no solo en *BMPR2* sino también en los genes *ENG* y *ALK1*, relacionados con la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o Síndrome de Rendu-Weber-Osler (MIM #187300) que comparte algunas características clínicas con la Hipertensión Pulmonar. El análisis de los electroferogramas se realizó utilizando el Software Coffalyser (MRC-Holland, Holanda). Para delimitar más en profundidad y con mayor especificidad los puntos de rotura de los reordenamientos hallados por MLPA se realizó un Array-cGH de 12x135k (Roche, EU). Este formato está diseñado con 135 mil sondas repartidas por todo el genoma y permite analizar a la vez 12 muestras. Permite la detección de ganancias y pérdidas de ADN de hasta 100kb. El protocolo de trabajo se realizó mediante la guía del fabricante¹. Para escanear los cristales del array se utilizó el software “Data Collection Software” (Roche, EU). Posteriormente, la extracción y el análisis de los datos se realizó con la herramienta informática Deva versión 1.2 (Roche, EU).

ANEXO 2

Clasificación de variantes encontradas. Análisis de patogenicidad.

Se consideraron **variantes patogénicas** las mutaciones radicales (*nonsense*, *frameshift* o probable efecto sobre el *splicing*) aquellas con evidencia previa publicada de asociación con enfermedad, con evidencia de cosegregación o aquellas localizadas en residuos con variantes previamente asociadas a enfermedad. Se consideraron **posiblemente patogénicas** mutaciones que no cumplieran las condiciones anteriores pero se encontraban en regiones con evidencia previa de asociación con enfermedad y/o un efecto deletéreo sugerido por los predictores bioinformáticos. Se consideraron **variantes de significado incierto** aquellas variantes ausentes en población general que no cumplieran las condiciones anteriores. Finalmente, se consideraron **no patogénicas** las mutaciones de significado incierto en las que se descartó cosegregación con la enfermedad.

Tabla 1S

Mutaciones identificadas en *BMPR2*.

Mutaciones halladas en *BMPR2* en pacientes con HAPH

Cambio ADNc	Cambio proteico	Tipo de mutación	Referencia
c.1259G>T	p.Cys420Phe	<i>missense</i>	Este estudio
c.1325delA	p.Asn442ThrfsX31	<i>frameshift</i>	Este estudio
C.101G>T	p.Cys34Phe	<i>missense</i>	Este estudio
c.1472G>A	p.Arg491Gln	<i>missense</i>	Machado et al 2009 ^{6S}
c.1472G>A	p.Arg491Gln	<i>missense</i>	Machado et al 2009 ^{6S}
Duplicación Exón 2	-	duplicación	Cogan et al 2006 ^{7S}

Mutaciones halladas en *BMPR2* en pacientes con HAPI

Cambio ADNc	Cambio proteico	Tipo de mutación	Referencia
c.961C>T	p.Arg321Stop	<i>nonsense</i>	Koehler et al 2004 ^{8S}
c.353G>A	p.Cys118Tyr	<i>missense</i>	Machado et al 2006 ^{9S}
c.1459G>C	p.Asp487His	<i>missense</i>	Este estudio
c.1138DelAT	p.Ile380GlnfsX18	<i>frameshift</i>	Este estudio
c.377A>G	p.Asn126Ser	<i>missense</i>	Machado et al 2009 ^{6S}
c.77-5_77-2delTTTA	-	<i>splice change</i>	Este estudio
c.1471C>T	p.Arg491Trp	<i>missense</i>	Deng et al 2000 ^{10S}
Dup*	p.Tyr218_Arg225	duplicación	Este estudio
c.1094G>A	p.Arg365His	<i>missense</i>	Este estudio
Deleción completa de BMPR2	-	deleción	Este estudio
Duplicación exón 2	-	duplicación	Cogan et al 2006 ^{7S}
Deleción de los exones 11, 12, 14	-	deleción	Este estudio
c.1277-3G	-	<i>splice change</i>	Este estudio
c.38G>A	p.Trp13Stop	<i>nonsense</i>	Chida et al 2012 ^{11S}

Dup*: duplicación c.653_676dupATAAAGGCTCCTTGGATGAGCG

Tabla 2S

Mutaciones en *KCNK3* y *TBX4*.

Mutaciones halladas en <i>TBX4</i> en pacientes con HAP idiopática y hereditaria					
Cambio ADNc	Cambio proteico	Tipo de mutación	Referencia	Patrón de herencia	Exón Afecto
c.1351A>G	p.Met451Val	Missense	Este estudio	Heterocigosis	Exón 8
c.1423A>C	p.Asn475His	Missense	Este estudio	Heterocigosis	Exón 8
c.310_312insAAG	p.Val104Glu	Inserción	Este estudio	Heterocigosis	Exón 3

Mutaciones halladas en <i>KCNK3</i> en pacientes con HAP idiopática					
c.641T>G	p.Leu214Arg	Missense	Este estudio	Heterocigosis	Exón 2
c.316G>C	p. Gly106Arg	Missense	Este estudio	Homocigosis	Exón 2
			Este estudio	Heterocigosis	Exón 2

HAP: hipertensión arterial pulmonar

Tabla 3S

Características clínicas basales según tipo de mutación en BMPR2.

	<i>MISSENSE</i> (n = 8)	<i>DUPLICACIÓ</i> N (n = 5)	<i>FRAMESHIFT</i> (n = 3)	<i>NONSENSE</i> (n = 3)	<i>DELECIÓN</i> (n = 2)	<i>SPLICE</i> <i>CHANGE</i> (n = 2)
Edad (años)	35,11±16,60	32,80± 10,96	32,33 ±15,14	48,33 ±20,92	35,50 ±10,60	38,50 ± 0,707
Sexo masculino (%)	33,3	0	66,62	33,3	50	50
NYHA al diagnóstico	44,4% NYHA I-II	20% NYHA I-II	66,6%NYHA I	33,3% NYHA I-II	50% NYHA I-II	50% NYHA III
	44,4% NYHA III	60% NyHA III	33,3% NYHA II	66,6% NYHA III	50% NYHA III	50% NYHA IV
	11,1% NYHA IV	20% NYHA IV	----	---	----	----
Síncope al diagnóstico (%)	22,2	40	66,6	33,3	0	0
Respondedor crónico (%)	11,1	0	0	0	0	0
CVF (%)	97,11 ± 9,71	93,96 ± 12,12	93,00 ± 7, 21	93,33 ± 10,21	94 ± 9,90	105,50 ± 3,53
FEV1 (%)	97,11 ± 9,71	92,52 ± 8,66	96, 33 ± 9,60	100,66 ± 8,08	92 ± 15,55	105,00 ± 2,82
DLCO (%)	77,71 ± 22,07	74,28 ± 6,4	89, 8 ± 19,3	84 ± 18,88	64	88,50 ± 0,707
T6M (m)	440,25 ± 120,85	290,75 ± 6,5	514, ± 15,5	439 ± 26,88	396,9 ±203.64	536,00 ± 90,51
PAD (mmHg)	7,12 ± 5,1	8,80 ± 4,14	4,33 ±4,1	4,33 ± 2,51	9 ±4,24	11 ± 1,41
PAPm (mmHg)	55,44 ± 13,87	63,80 ± 10,87	54, 33 ± 18,44	53,33, ± 22,03	71, 50 ± 27,55	66,00 ± 2,82
RVP (UW)	10,49 ± 2,48	18,39 ± 5,19	14,18 ± 7, 46	16.73± 14,29	22,88 ± 5,48	22,76± 0,65
IC (l/m /m2)	2,37 ± 0,78	2, 03 ± 0, 531	2, 65 ± 1, 07	2,37 ± 0,37	1,96 ± 0,055	1,48 ± 0,14

CVF: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; FEV1: volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada; IC: índice cardiaco; NYHA: clase funcional de la *New York Heart Association*; PAD: presión en aurícula derecha; PAPm: presión media en arteria pulmonar; RVP: resistencia vascular pulmonar arteriolar; T6M: distancia recorrida en el test de 6 minutos; UW: unidades Wood.

Tabla 4SCaracterísticas de familiares portadores de mutaciones en *BMPR2*.

Código paciente	Sexo	Edad	Gen afectado	Mutación	Cambio proteico	Presencia de HAP
Familia 1-1	Masculino	19	<i>BMPR2</i>	c.1325delA	p.Asn442ThrfsX31	Sí
Familia 3-1	Femenino	21	<i>BMPR2</i>	c.1259G>T	p.Cys420Phe	No
Familia 4-1	Femenino	43	<i>BMPR2</i>	c.961C>T	p.Arg321Stop	No
Familia 4-2	Femenino	39	<i>BMPR2</i>	c.961C>T	p.Arg321Stop	No
Familia 4-3	Femenino	70	<i>BMPR2</i>	c.961C>T	p.Arg321Stop	No
Familia 4-4	Femenino	41	<i>BMPR2</i>	c.961C>T	p.Arg321Stop	Sí
Familia 5-1	Femenino	37	<i>BMPR2</i>	c.353G>A	p.Cys118Tyr	No
Familia 8-1	Femenino	42	<i>BMPR2</i>	c.353G>A	p.Cys34Phe	No
Familia 9-1	Masculino	9	<i>BMPR2</i>	c.1138DelAT	p.Ile380GlnfsX18	No
Familia 10-1	Femenino	50	<i>BMPR2</i>	c.77-5_77-2delTTTA	--	No
Familia 10-2	Femenino	37	<i>BMPR2</i>	c.77-5_77-2delTTTA	--	No
Familia 11-1	Femenino	54	<i>BMPR2</i>	Dup_ex2	--	No
Familia 11-2	Masculino	32	<i>BMPR2</i>	Dup_ex2	--	No
Familia 11-3	Femenino	28	<i>BMPR2</i>	Dup_ex2	--	Sí
Familia 11-4	Femenino	19	<i>BMPR2</i>	Dup_ex2	--	Sí
Familia 12-1	Femenino	84	<i>BMPR2</i>	c.377A>G	p.Asn126Ser	No

Familia 12-2	Masculino	56	BMPR2	c.377A>G	p.Asn126Ser	No
Familia 13-1	Femenino	50	BMPR2	c.1459G>C	p.Asp487His	No

HAP: hipertensión arterial pulmonar

Tabla 5SCaracterísticas de familiares portadores de mutaciones en *TBX4* y *KCNK3*

CÓDIGO PACIENTE	SEXO	EDAD	GEN AFECTO	MUTACIÓN	CAMBIO PROTEICO	PRESENCIA DE HAP
Familia 20-1	Masculino	66	<i>KCNK3</i>	c.641T>G	p.Leu214Arg	No
Familia 20-2	Femenino	38	<i>KCNK3</i>	c.641T>G	p.Leu214Arg	No
Familia 21-1	Masculino	66	<i>TBX4</i>	c.1351A>G	p.Met451Val	No
Familia 21-2	Femenino	36	<i>TBX4</i>	c.1351A>G	p.Met451Val	No
Familia 21-3	Masculino	34	<i>TBX4</i>	c.1351A>G	p.Met451Val	No
Familia 22-1	Masculino	56	<i>TBX4</i>	c.1423A>C;	p.Asn475His	No
Familia 23-1	Femenino	35	<i>TBX4</i>	c.310_312insAAG	p.Val104Glu	Sí
Familia 23-2	Femenino	28	<i>TBX4</i>	c.310_312insAAG	p.Val104Glu	No
Familia 24-1	Masculino	5	<i>KCNK3</i>	c.316G>C	p.Gly106Arg	Sí

BIBLIOGRAFÍA SUPLEMENTARIA

- 1S. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA [Accesed May 2015] available at: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
- 2S. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491:56–65.
- 3S. Exome Aggregation Consortium: Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, KE Samocha, Banks E, Fennell T, et al.. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv preprint first posted online Oct. 30, 2015*.
- 4S. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248–9.
- 5S. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361–2.
- 6S. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S32–42.
- 7S. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, et al. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:590–8.
- 8S. Koehler R, Grunig E, Pauciulo MW, Hoeper MM, Olschewski H, Wilkens H, et al. Low frequency of BMPR2 mutations in a German cohort of patients with sporadic idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2004;41:e127.
- 9S. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2006;27:121–32.
- 10S. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737–44.
- 11S. Chida A, Shintani M, Yagi H, Fujiwara M, Kojima Y, Sato H, et al. Outcomes of childhood pulmonary arterial hypertension in BMPR2 and ALK1 mutation carriers. *Am J Cardiol*. 2012;110:586–93.
- 12S. Liu D, Eyries M, Wu WH, Yuan P, Zhang R, Soubrier F, et al. Molecular genetics and clinical features of Chinese idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension patients. *Eur Respir J*. 2012;39:597–603.
- 13S. Morisaki H, Nakanishi N, Kyotani S, Takashima A, Tomoik H, Morisaki T. *BMPR2* Mutations Found in Japanese Patients With Familial and Sporadic Primary Pulmonary Hypertension. *Hum Mutat*. 2004;23:632.
- 14S. Pfarr N, Szamalek-Hoegel J, Fischer C, Hinderhofer K, Nagel C, Ehlken N, et al. Hemodynamic and clinical onset in patients with hereditary pulmonary arterial hypertension and BMPR2 mutations. *Respir Res*. 2011;12:99.
- 15S. Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Lane KB, Morgan NV, Wheeler L, et al. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet*. 2001;68:92–102.