



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA –  
ESPECIALIDAD SANITARIA

# **La titina en el diagnóstico genético de cardiopatías familiares**

21/01/2013

Iria Gómez Díaz

Empresa: Health in code S.L.

Tutor: Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias

## **CONTENIDO**

1. Introducción	
1.1. La empresa y su campo de trabajo	pág. 3
1.2. Titina. La proteína gigante	pág. 5
2. Objetivos	pág. 10
3. Material y métodos	
3.1. Fase bioinformática	pág. 11
3.2. Fase de laboratorio	pág. 15
4. Resultados y discusión	pág. 19
5. Conclusiones	pág. 27
6. Referencias bibliográficas	pág. 28

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. La empresa y su campo de trabajo**

Health In Code (HIC) es una empresa de base biotecnológica, que surge como una “spin off” de la Universidad de A Coruña y que está situada en el edificio de “O Fortín” del Hospital Marítimo de Oza. Está especializada en el diagnóstico genético de enfermedades cardiovasculares y en la interpretación de los resultados, para así ofrecer a los clínicos la oportunidad de realizar una medicina individualizada para cada paciente.

Su principal área de trabajo dentro de las enfermedades cardiovasculares son las cardiopatías familiares, que engloban la mayor parte de causas de muerte súbita en individuos jóvenes y deportistas, aunque también son causa importante en pacientes de mayor edad. Estas cardiopatías comparten una serie de características comunes:

- Tienen una base genética y una presentación familiar, es decir, si un miembro de la familia padece la enfermedad existe la posibilidad de que el resto de familiares también estén afectados.

- La muerte súbita puede ser la primera manifestación de estas enfermedades. Sin embargo, si existen síntomas previos suelen ser muy heterogéneos y su evolución difícil de predecir, ya que existen cientos de mutaciones descritas en genes que están asociadas con estas enfermedades. Por ello es fundamental realizar un diagnóstico genético que permita individualizar tanto el diagnóstico, como el pronóstico, el tratamiento de la enfermedad y la toma de medidas eficaces de prevención.

Las cardiopatías familiares incluyen:

- *Miocardopatías*.- Enfermedades que afectan al miocardio, como por ejemplo: hipertrófica, dilatada, no compactada, restrictiva,...

- a) La Miocardopatía Hipertrófica (MHC) es una enfermedad hereditaria del músculo cardíaco que se caracteriza por la presencia de un engrosamiento anormal de las paredes del corazón sin causa aparente. Es la causa más frecuente de muerte súbita.

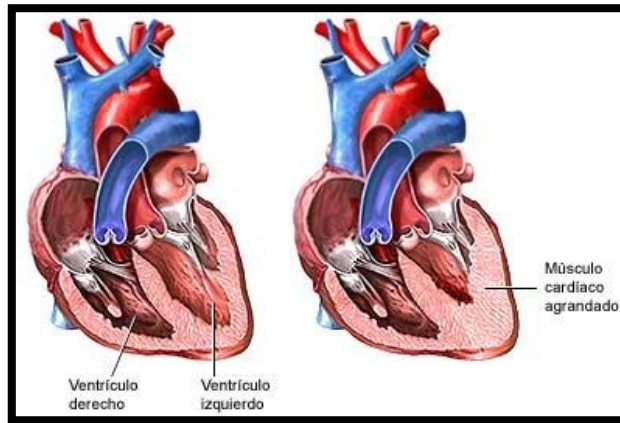


Imagen 1. Corazón sano frente a corazón enfermo MHC.  
<http://medicinainterna.wikispaces.com/Miocardiopatia>

b) La Miocardiopatía Dilatada (MCD) se define por la presencia de dilatación y disfunción sistólica ventricular izquierda en ausencia de condiciones anormales de sobrecarga. Afecta a 1 de cada 3000 individuos y representa la tercera causa más común de fallo cardíaco, siendo la primera causa de trasplante.

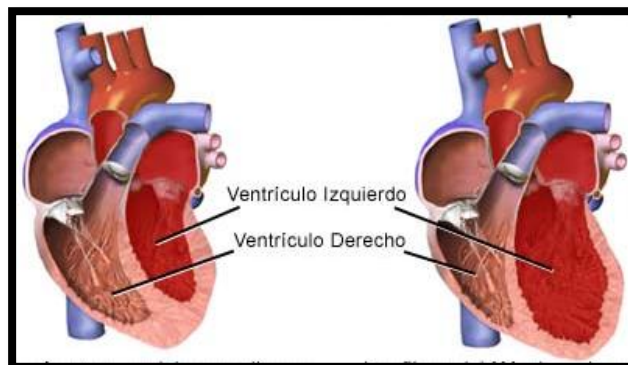


Imagen 2. Corazón sano frente a corazón enfermo MCD.  
<http://cuidatusaludcondiane.com/miocardiopatia-hipertrofica/>

- *Canalopatías*.- Enfermedades que afectan a los canales del corazón, responsables de la transmisión de los impulsos eléctricos, como por ejemplo:

- ✓ Síndrome de QT largo
- ✓ Síndrome de QT corto
- ✓ Síndrome de Brugada

- *Otros síndromes* de afección vascular que también se caracterizan por tener una base genética y una presentación familiar, como por ejemplo el síndrome de Marfan.

Por lo tanto, Health In Code estudia los genes que codifican las proteínas implicadas en la función del músculo cardíaco en busca de las mutaciones responsables de enfermedades cardíacas hereditarias.

## 1.2. Titina. La proteína gigante.

La titina es la proteína más grande encontrada en mamíferos (varía entre 2970 y 4200 kD según la isoforma), codificada por un único gen que está ubicado en el brazo largo del cromosoma 2 (región 2q31), constituida por 368 exones y 7 isoformas (según el NCBI, 11 isoformas según Uniprot). Se localiza tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético y, estructuralmente, se sitúa en el interior de los sarcómeros donde se une e interactúa con otras proteínas importantes, principalmente con la actina y miosina.

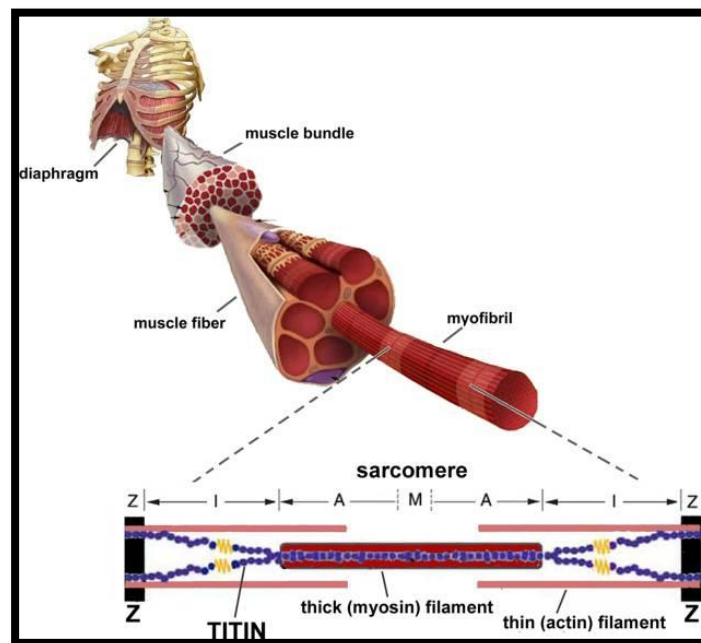


Imagen 3. Localización de la titina.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043808/figure/F1/>

### - Estructura

Se trata de una proteína estructuralmente compleja, con cerca de 1  $\mu\text{m}$  de largo, que se extiende desde la línea Z hasta la línea M del sarcómero. De este modo, la titina abarca 4

zonas distintas del sarcómero, lo que conlleva a dividirla en 4 regiones que se corresponden con la línea M, la banda A, la banda I y la línea Z.

La región de la línea Z contiene el dominio amino-terminal y dominios kinasa, mientras que en la región de la línea M está ubicado el dominio carboxilo-terminal y regiones de secuencia única. La región de la banda A contiene la mayor parte de la molécula de titina que, en esta zona, se encuentra formada por dominios semejantes a la fibronectina-3 (llamados Fn3) y a la inmunoglobulina (llamados dominios Ig), además representa un componente integrante del filamento grueso, por lo tanto, esta región no es extensible y su constitución es semejante en las diferentes isoformas de la molécula. Por el contrario, la región de la banda I es muy extensible, presentando capacidad de alargarse o enrollarse, funcionando así como una unión elástica entre el filamento grueso y la línea Z. Estructuralmente, la región de la banda I es la más compleja ya que está constituida por dominios Ig, dominios N2 y segmentos PEVK (ricos en prolina (P), glutamato (E), valina (V) y lisina (K)).

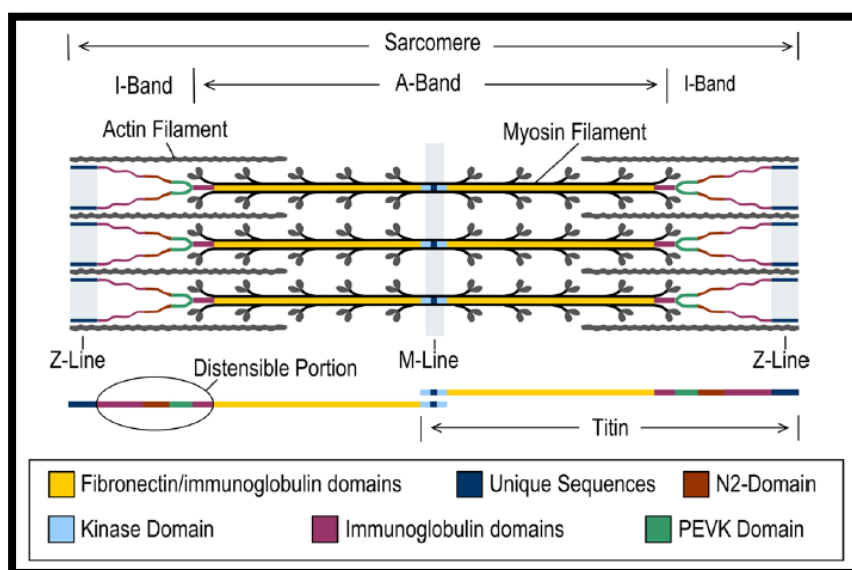


Imagen 4. Estructura de la titina. Catro-Ferreira *et al.* The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications Arq Bras Cardiol 2011;96:332-339

### - Isoformas

En el corazón adulto, de las 7 isoformas que puede presentar esta macromolécula, sólo se expresan dos de ellas, N2B y N2BA, de las cuales la más común es N2B. La diferencia entre ambas isoformas reside en la banda I, concretamente en el dominio N2.

La isoforma N2B contiene en el dominio N2 el elemento N2B, este elemento está constituido por una región con 3 dominios Ig y una región única de 572 residuos. Sin embargo, la isoforma N2BA está formada por un elemento N2B junto con uno N2A, este último está compuesto por una región con 4 dominios Ig y una región única de 106 residuos.

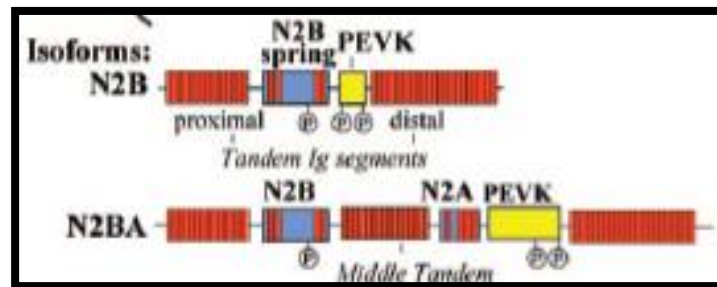


Imagen 6. Diferencias entre la isoforma N2B y N2BA.  
Martín LeWinter *et al.* Cardiac titin: A multifunctional giant.  
*Circulation* 2010, 121:2137-2145

### - ¿Cómo funciona?

Inicialmente, la región extensible de la titina, la banda I, se encuentra en su estado acortado mientras el sarcómero está en fase de reposo. Sin embargo, a medida que se va estirando el sarcómero también lo hace junto a él la titina, generando así una fuerza en la proteína que se conoce como fuerza pasiva, y que tenderá al reposo. A continuación, el sarcómero se acorta por debajo del tamaño que presenta en estado de reposo, lo que provoca que el filamento grueso entre en contacto con la región de la línea Z. Esta situación crea en la titina otra fuerza, conocida como fuerza de restauración, que provoca que la región de la banda I se extienda ahora en dirección opuesta.

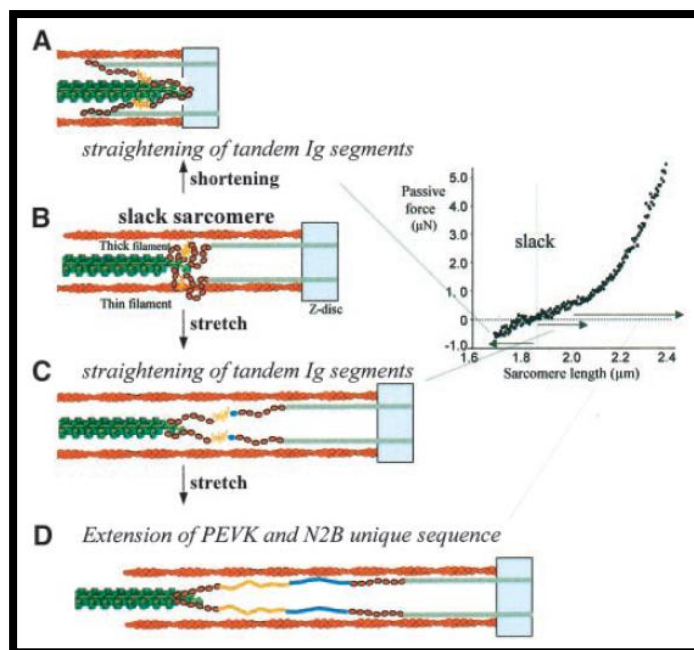


Imagen 5. Mecanismo de generación de fuerza pasiva y de restauración.  
 Henk L. Granzier *et al.* The giant protein titin: A major player in myocardial mechanics, signaling, and disease *Circulation Research* 2004;94:284-295

La isoforma N2BA al poseer un elemento más en la región de la banda I es más extensible y menos rígida que N2B. De este modo, los cardiomiocitos que expresan mayores cantidades de la isoforma N2B son más rígidos que aquellos que expresan una mayor proporción relativa de la isoforma N2BA. Esto conlleva que los cardiomiocitos con un elevado grado de expresión de N2B no sólo ejercen una mayor tensión pasiva durante el estiramiento, sino que también generan una mayor fuerza para recuperar el largo de reposo después de la contracción y que el sarcómero vuelve al reposo. De ese modo, en los ventrículos con elevadas proporciones de N2B se acorta la duración de la fase inicial de diástole permitiendo la formación de un fenómeno de “succión ventricular” que provoca el aumento del llenado ventricular, lo que puede ser importante en las situaciones de ejercicio físico u otras situaciones de taquicardia.

La propiedad elástica además de permitir la regulación del largo del sarcómero que influye en la función cardíaca diastólica, también interviene en la función sistólica por el efecto que ejerce en la modulación de la relación de Frank-Starling. Según la ley de Frank-Starling el corazón posee una capacidad intrínseca de adaptarse a volúmenes crecientes de sangre, es decir, cuanto más se llena de sangre un ventrículo durante la diástole, mayor será el volumen de sangre expulsado en la siguiente contracción sistólica ya que la fuerza de



contracción aumentará. La titina, como determinante de la rigidez ventricular y de las propiedades pasivas del ventrículo, influye en la relación presión-volumen telediastólica.

Entre sus diversas acciones también destaca su papel como sensor biomecánico, dada su capacidad de distenderse y acortarse, es sensible al grado de estiramiento del cardiomiocito, siendo capaz después de transmitir esa señal biomecánica por la unión e interacción que establece con varias proteínas estructurales y señalizadoras, por lo tanto, está implicada en mecanismos de señalización intracelular.

Además la titina mantiene también la estructura del sarcómero permitiendo el correcto alineamiento de los miofilamentos de actina y miosina, así la pérdida de la titina origina una organización anormal del sarcómero.

A la par, comienza a investigarse la implicación de la titina en el proceso de doblaje de proteínas, regulación de la expresión de genes y regulación de varios canales iónicos.

#### **- Regulación**

Por otro lado, las funciones de la titina pueden ser moduladas por alteraciones a largo plazo, mediante la modificación de la proporción relativa entre las dos isoformas, o a corto plazo, por alteraciones post traslacionales, como la alteración del estado de fosforilación de la titina o de su unión al ión calcio. Tales alteraciones le permiten al miocardio modificar su elasticidad en razón de las diversas alteraciones hemodinámicas a que está sujeto.

#### **- Implicación en enfermedades cardíacas**

Igualmente, la titina por medio de la modificación de la proporción de sus isoformas y/o de su estado de fosforilación, parece ser un elemento clave en la fisiopatología de varias enfermedades cardíacas como la cardiomiopatía dilatada (CMD), cardiomiopatía hipertrófica (CHM) y la insuficiencia cardíaca diastólica (ICD).

Se ha demostrado que enfermos con ICD presentan una alteración en la proporción relativa de las isoformas de titina, con aumento de la isoforma N2B (más rígida) lo que parece explicar el aumento de la rigidez ventricular observado en esos enfermos. De tal manera que, mientras que en un corazón humano sano la proporción N2BA:N2B normal es aproximadamente de 30:70, en los enfermos con ICD esa relación era de 17:83. También

se demostró que la hipofosforilación del segmento N2B parece contribuir significativamente al aumento de la tensión pasiva verificada en los casos de ICD.

Además en enfermos con cardiomiopatía dilatada se observó una alteración de la relación entre las isoformas de la titina, con un aumento relativo de la isoforma más distensible, la N2BA. Es también en la cardiomiopatía dilatada o hipertrófica donde parece ocurrir alteraciones en la fosforilación de la titina.

Con todo ello, la titina parece ser un potencial blanco de manipulación farmacológica constituyendo así un nuevo blanco terapéutico.

## **2. OBJETIVOS**

La finalidad de un buen diagnóstico genético de cardiopatías familiares consiste en identificar la enfermedad, ayudar al pronóstico clínico del paciente e identificar, en el caso de que existan, a otros familiares afectados y, de este modo, tomar medidas eficaces de prevención.

El método actual validado para el diagnóstico genético de pacientes es la secuenciación automática de Sanger. Sin embargo, las pruebas genéticas que se obtienen por Sanger presentan problemas de rendimiento, automatización y rentabilidad, especialmente al tratarse de enfermedades multigénicas como las cardiopatías. Esto provoca que en un diagnóstico clínico rutinario sólo se evalúen los genes que están habitualmente afectados por la enfermedad, lo que limita el significado de los resultados.

Por el contrario, las nuevas técnicas de ultrasecuenciación o NGS se presentan como una estrategia que ha ido abaratando costes y aumentando la capacidad y velocidad de secuenciación, asimismo permite realizar pruebas con todos los genes conocidos implicados en la enfermedad para establecer una mejor predicción de los resultados.

Existen numerosas publicaciones que apoyan y describen la importancia de NGS e incluso su aplicación en miocardiopatías, sin embargo las técnicas de NGS todavía no están validadas para emitir diagnósticos clínicos concluyentes. Por este motivo se siguen empleando las técnicas de secuenciación por Sanger para confirmar los hallazgos obtenidos con NGS.

En este proyecto, se pretende confirmar por Sanger mutaciones que se han detectado por NGS en la proteína de la titina. En Health In Code hasta este momento no se habían diagnosticado mutaciones en dicha proteína y, por lo tanto, requiere de su puesta a punto en el laboratorio.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Fase bioinformática**

Se introducen en la base de datos “HIC mutaciones” de Health In Code las 27 variantes encontradas por NGS que se quieren confirmar por Sanger (Tabla 1). De estas variantes sólo se tiene la posición a nivel cromosómico, con el fin de poder agilizar el trabajo, se convierten estas posiciones para obtener la posición a nivel proteico y genómico de laboratorio (Tabla 2).

<b>Muestra</b>	<b>P. cr. Inicial</b>	<b>P. cr. Final</b>	<b>Referencia</b>	<b>Observada</b>
1445	179397091	179397091	C	G
1445	179610806	179610806	G	A
1492	179399406	179399406	G	C
1391	179542397	179542399	TTC	-
1494	179495936	179495941	ATCTGC	-
1300	179436261	179436263	TGT	-
1300	179644761	179644761	T	A
1701	179400016	179400016	-	ATCTGAAGG
1701	179400027	179400027	-	CTGAAGGCT
1701	179469756	179469756	G	A

1377	179584550	179584550	C	A
1498	179444915	179444915	A	G
1498	179623903	179623903	C	T
1625	179476342	179476342	C	G
1711	179542397	179542399	TTC	-
1711	179438710	179438710	T	C
1711	179454177	179454177	C	T
1711	179538378	179538378	C	G
1711	179407293	179407293	A	G
1381	179414512	179414512	T	C
1381	179643761	179643761	G	A
1446	179395623	179395623	C	T
1446	179469980	179469980	G	C
1629	179418306	179418306	C	T
1668	179395251	179395251	T	C
1390	179399451	179399451	C	T
1287	179454177	179454177	C	T

Tabla 1. Variantes que se han encontrado en las diferentes muestras por NGS. *P.cr. inicial* hace referencia a la posición cromosómica donde empieza la variación observada y *P.cr. final* a la posición cromosómica donde finaliza. *Referencia* refleja el nucleótido/s que hay en la posición indicada en la secuencia de referencia. *Observada* muestra el nucleótido/s que hay en la muestra.

Muestra	P. cr. Inicial	P. cr. Final	P. genómica de laboratorio	Cambio aa.
1445	179397091	179397091	g.275060G>C	p.A25686P
1445	179610806	179610806	g.61345C>T	p.R5441X
1492	179399406	179399406	g.272745C>G	p.P24914R
1391	179542397	179542399	g.129752_129754delGAA	p.10170_10170del
1494	179495936	179495941	g.176210_176215delGCAGAT	p.5547_5548del
1300	179436261	179436263	g.235888_235890delACA	p.15801_15801del
1300	179644761	179644761	g.27390A>T	p.D1186V
1701	179400016	179400016	g.272135_272136insCCTTCAGAT	p.P24711delinsPSDP
1701	179400027	179400027	g.272124_272125insAGCCTTCAG	p.K24707delinsKPSE
1701	179469756	179469756	g.202395C>T	p.R8985C
1377	179584550	179584550	g.87601G>T	p.R6646I
1498	179444915	179444915	g.227236T>C	p.S13302P
1498	179623903	179623903	g.48248G>A	Intrónica
1625	179476342	179476342	g.195809G>C	p.A7807P
1711	179542397	179542399	g.129752_129754delGAA	p.10170_10170del
1711	179438710	179438710	g.233441A>G	p.E14985G
1711	179454177	179454177	g.217974G>A	p.E11694K

1711	179538378	179538378	g.133773G>C	p.E10289Q
1711	179407293	179407293	g.264858T>C	Intrónica
1381	179414512	179414512	g.257639A>G	p.N21581S
1381	179643761	179643761	g.28390C>T	p.R1304C
1446	179395623	179395623	g.276528G>A	p.R26175Q
1446	179469980	179469980	g.202171C>G	p.T8910S
1629	179418306	179418306	g.253845G>A	p.R20744Q
1668	179395251	179395251	g.276900A>G	p.E26299G
1390	179399451	179399451	g.272700G>A	p.R24899H
1287	179454177	179454177	g.217974G>A	p.E11694K

Tabla 2. Posición de las variantes que se han encontrado en las diferentes muestras por NGS. *P.cr. inicial* hace referencia a la posición cromosómica donde empieza la variación observada y *P.cr. final* a la posición cromosómica donde finaliza. *P. genómica de laboratorio* la posición genómica de la variante junto al cambio nucleotídico. *Cambio aa.* muestra el cambio aminoacídico, en los casos en los que se hace la anotación *intrónica* indica que el cambio no ha tenido lugar dentro del exón y, por lo tanto, no hay cambio aminoacídico, pero se estudiará igualmente porque puede afectar al splicing de la proteína.

Se descarga del *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) la secuencia completa de titina y se localiza a qué exón pertenece cada variante para, posteriormente, diseñar los primers correspondientes.

Existen algunos exones que debido a su gran tamaño no se van a poder amplificar, por lo tanto, en estos casos se dividen en amplicones de 500 pb aproximadamente y se le asigna a cada fragmento del exón, en función de su posición, una letra. Se consideran amplicones de 500pb porque lo máximo que es capaz de discriminar correctamente el secuenciador es 700pb aproximadamente. Asimismo, se observa que hay dos variantes que están repetidas en dos muestras diferentes, por lo tanto, se diseñarán finalmente 25 primers.

Se diseñan los primers para cada variante, mediante el programa “*Primer Express® v2.0*”, del siguiente modo:

- ✓ los primers deben amplificar el exón  $\pm 20$  nucleótidos flanqueantes del intrón que se considera que afectan al splicing de la proteína.
- ✓ la longitud de cada primer debe de encontrarse entre 19-24pb.
- ✓ la  $T_m$  no debe de ser muy baja y debe de ser similar entre ambos primers, con una diferencia máxima de 5°C.
- ✓ el contenido en C/G debe de situarse en torno al 45-60%.
- ✓ se debe tratar de eludir las zonas repetitivas.

- ✓ se debe de evitar la formación de una horquilla en el extremo 3' para que el primer no autoanille.
- ✓ también se debe de evitar que se formen más de 3 enlaces C/G entre cada pareja de primers para que no autoanillen entre sí.

The image shows a screenshot of a primer design tool. On the left, a DNA sequence is displayed with several lines. Two primers are highlighted: a forward primer (CACCCAAGTGAACCCACAGAA) and a reverse primer (AGTTGGAAGTGGGACAGCTCT). To the right, the primers are shown with their corresponding diagrams: a forward primer with a 3' end that does not form a hairpin, and a reverse primer with a 3' end that also does not form a hairpin. Below the sequence, a table provides the following data:

Forward Primer					
Sequence	CACCCAAGTGAACCCACAGAA				
Tm	59°	%GC	52	Start	2061
Length	21				
Reverse Primer					
Sequence	AGTTGGAAGTGGGACAGCTCT				
Tm	57°	%GC	52	Start	2690
Length	21				
Amplicon					
Tm	75°	%GC	41	Length	630
Ta	55°				

Imagen 7. Diseño de los primers del exón 97 de N2B.

Una vez finalizado el diseño, se confirma que los primers son específicos y que no van a amplificar con otras zonas del genoma, para ello se emplea un programa de búsqueda de similitud de secuencias como BLAT de *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>). Al mismo tiempo se emplea la herramienta “PCR in silico” para comprobar el tamaño del amplicón, este dato será necesario a la hora de realizar electroforesis.

BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser</a> <a href="#">details</a>	YourSeq	21	1	21	21	100.0%	2	-	179476510	179476530	21

BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser</a> <a href="#">details</a>	YourSeq	21	1	21	21	100.0%	2	+	179475901	179475921	21

Imagen 8. BLAT de los primers Fw y Rv del exón 97 de N2B.

```
>chr2:179475901-179476530 630bp CACCCAAGTGAACCCACAGAA AGTTGGAACTGGGACAGCTCT
CACCCAAGTGAACCCACAGAAatcctatccattgaagatccaacaagtaa
gtagtgtctgattatacacaagatattgtctagaacttgatgagactgtgg
atatgaatatcttcaactcttttctcaggtcctccctcaccacccttgacc
tacatgtgactgatgctgggagaaaaacacattgccattgcttggagcct
ccagagaaaaatggtggaagtcctatcataggataccatgttgaaatgtg
tccagtaggcaactgagaaatggatgagagtttaattctcgccaataaagg
acttgaaatccaaggttgaagaaggtgttctcctgacaaagaatatgtc
ctgagagtgagagcagtcfaatgctatgggtgcagcgagccatctgaaat
ctctgaaaaatgtggttgccaaagaccagactgtaagagcacaaggtctt
ttatagttaataaaaataccctttattcatgcattgcatcttgacatactc
tgttttttgctcttttgaatgatattctacaggcaagccaacaattgacc
tgggagactcatgacattattgttattgaaggtgaaaagtttaagcattcct
gttcctctcAGAGCTGTCCAGTTCCAAT
```

Imagen 9. PCR in silico del exón 97 de N2B.

Se introduce en una tabla de la base de datos el nombre de cada uno de los exones o fragmentos para los que se han diseñado los primers, el tamaño del amplicón, la posición genómica dónde empieza y termina cada exón/fragmento, así como la posición dónde empieza el exón menos 20 pb y la posición dónde termina cada exón más 20 pb (esto último sólo se realizará en caso de que no se dividiera el exón en fragmentos).

A continuación se crean los test de PCR y secuencia para cada uno de los exones/fragmentos, se activan y se hacen simulaciones, de esta manera cuando se optimicen los primers se podrán analizar las muestras con total normalidad.

### 3.2. Fase de laboratorio

Una vez se reciben en el laboratorio los primers que se han diseñado, se resuspenden a una concentración de 100µM y se preparan diluciones a 5µM para PCR y reacciones de secuencia.

En el caso de las diluciones de PCR se incluyen en una mix los primers forward y reverse, de tal forma que se añade en un eppendorf 180µl de H<sub>2</sub>O miliQ, 10µl de forward y 10µl de reverse. Sin embargo, para las reacciones de secuencia se preparan 2 eppendorfs distintos, uno para el primer forward y otro para el reverse, de tal modo que, se añade en un eppendorf 95µl de H<sub>2</sub>O miliQ y 5µl de forward o de reverse.

Para poner a punto los primers de PCR, se utilizan 3 muestras de ADN control del laboratorio y una vez que se conozcan las condiciones óptimas se repiten dichas PCR con los ADN problema.

Con dicho fin, se prepara una mix por cada primer, que incluye los siguientes volúmenes por pocillo: 6,25µl de buffer + enzima (“*Kapa2G Ready mix*” de *Kapa Biosystems*), 1,5µl del mix de primers, 1µl de solución Q y 2,25µl de H<sub>2</sub>O autoclavada. Se dispensan las mixes en una placa de 96 pocillos de *Bio-Rad* y después se le añade a cada pocillo 1,5µl del ADN correspondiente, manteniendo siempre para cada primer un control negativo, que incluirá 1,5µl de H<sub>2</sub>O autoclavada adicional.

Se pone en un termociclador “*Veriti 96-well*” de *Applied Biosystems* que nos permite seleccionar una Ta diferente cada dos columnas, de este modo, en una sola placa se hacen todas las PCRs. Las Ta (°C) de cada primer, así como el tamaño del amplicón (pb), son las que se muestran en la tabla:

<b>Nombre del exón/fragmento</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
TTN-Ex108-N2B	54	547
TTN-Ex132E-N2B	53	691
TTN-Ex143-N2A	56	606
TTN-Ex146-N2B	52	667
TTN-Ex147-N2A	51	361
TTN-Ex154E-N2B	56	608
TTN-Ex154H-N2B	56	653
TTN-Ex154J-N2B	57	561
TTN-Ex154L-N2B	54	619
TTN-Ex162-N2B	54	640
TTN-Ex166-N2B	54	629
TTN-Ex177-N2B	54	678
TTN-Ex186B-N2B	55	423
TTN-Ex186C-N2B	55	731
TTN-Ex186H-N2B	56	690
TTN-Ex186K-N2B	55	665
TTN-Ex21-N2B	53	510
TTN-Ex23-N2B	53	546
TTN-Ex43-N2B	53	588
TTN-Ex46M-Novex3	54	428
TTN-Ex46P-Novex3	55	282



TTN-Ex65-N2B	52	425
TTN-Ex79-N2A	56	774
TTN-Ex86-N2B	54	321
TTN-Ex97-N2B	55	630

Tabla 3. Listado de primers a optimizar.

El programa que se utiliza en el termociclador “Veriti 96-well” de *Applied Biosystems* para esta enzima es el que recomienda la casa comercial *Kapa Biosystems*:

Programa PCR	Temperatura (°C)	
Desnaturalización inicial	95°C 1 minuto	
Desnaturalización	35 ciclos	95°C 10 segundos
Anillamiento		Ta 10 segundos
Extensión		72°C 1 minutos
Extensión final	72°C 30 segundos	

Tabla 4. Programa del termociclador para PCR.

Una vez que el termociclador finaliza el programa, se realiza una electroforesis con los productos de PCR. Para ello, se prepara un gel de agarosa al 2% en el que se carga en un pocillo 3µl de marcador de peso molecular y en los demás pocillos la mezcla de 7,5µl de tampón de carga + 2µl de producto de PCR. Se corre durante 30 minutos a 300V y 150mA. Posteriormente se revelan las fotos del gel y se comprueba que los amplicones tengan el tamaño indicado en la Tabla 3.

Se observa que existen 2 fragmentos (TTN-Ex65-N2B y TTN-Ex186C-N2B) en los que se observa una estela detrás de la banda y 3 fragmentos (TTN-Ex186H-N2B, TTN-Ex143-N2A y TTN-Ex154J-N2B) que presentan unas bandas muy tenues. En el caso de los 2 primeros fragmentos se repite la electroforesis y se deja correr 40 minutos a 300V y 150mA. Por otro lado, para los 3 últimos fragmentos indicados, se comprueba que las bandas se observan nítidas cambiando las condiciones de la mix de PCR: 6,25µl de buffer + enzima (“*Kapa2G Ready mix*” de *Kapa Biosystems*), 2µl del mix de primers, 1µl de solución Q y 1,75µl de H<sub>2</sub>O autoclavada.

Una vez que se ha visto que todas las bandas de los productos de PCR son correctas, se introducen en la base de datos las condiciones de las mixes utilizadas así como las Ta a las que se ha programado el termociclador.

Con el fin de eliminar los primers y dNTs sobrantes, y así purificar los productos de PCR, se prepara en un eppendorf la siguiente mix (los volúmenes que se señalan son los correspondientes a un pocillo): 0,28µl de Exonucleasa I de *Thermo scientific*, 0,55µl de Fastap de *Thermo scientific* y 2,2µl H<sub>2</sub>O autoclavada. Se dispensan 3µl de la mezcla en cada pocillo de la placa de *Bio-Rad*, y 1,4µl de cada producto de PCR en un pocillo diferente.

Se pone en un termociclador “*Veriti 96-well*” de *Applied Biosystems* con el siguiente programa:

Programa purificación	Temperatura (°C)
Desfosforilación rápida	37°C 15 minutos
Inactivación completa	85°C 15 minutos

Tabla 5. Programa del termociclador para la purificación de PCR.

A continuación, para preparar la reacción de secuencia se mezcla en un eppendorf (los volúmenes que se señalan son los correspondientes a un pocillo): 0,25µl de BDTs (*BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* de *Applied Biosystems*), 1,75µl de buffer de secuencia (*BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* de *Applied Biosystems*) y 6,25µl H<sub>2</sub>O autoclavada. En una placa de 96 pocillos de *Bio-Rad* se dispensan 8,2 µl por pocillo de la mix, seguidamente se añade 1µl de primer forward o 1µl de primer reverse según corresponda en cada pocillo y finalmente 1µl del producto de PCR purificado.

Se pone en un termociclador “*Veriti 96-well*” de *Applied Biosystems* con el siguiente programa

Programa secuencia	Temperatura (°C)	
Desnaturalización inicial	96°C 1 minuto	
Desnaturalización	25 ciclos	96°C 10 segundos
Anillamiento		58°C 5 segundos
Extensión		60°C 4 minutos

Tabla 6. Programa del termociclador para una reacción de secuencia.

Posteriormente, se purifica la reacción de secuencia y para ello se prepara la mezcla a continuación descrita (los volúmenes que se señalan son los correspondientes a un pocillo): 5µl de BigDye XTerminator (*BigDye® XTerminator Purification Kit* de *Applied Biosystems*), 22,5µl de SAM solution (*BigDye® XTerminator Cycle Purification Kit* de *Applied Biosystems*) y 27,5µl H<sub>2</sub>O autoclavada. Se le añade a cada pocillo de la anterior placa 55µl, se cubre con un film y se envuelve en papel de aluminio para que no incida sobre ella la luz.

Se agita durante 30 minutos e inmediatamente se centrifuga a 1000g durante 2 minutos, acto seguido se le retira el film a la placa y se le coloca un septa, se dispone en un soporte y se introduce en el secuenciador 3730 de *Applied Biosystems*.

Finalmente, se crea un archivo para el secuenciador en el cual se le indica qué muestra y qué exón/fragmento corresponde a cada pocillo, y se comienza la secuenciación.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tras llevar a cabo todas las pruebas pertinentes para confirmar por Sanger las variantes en los distintos exones o fragmentos de titina, se puede afirmar que tras los ensayos realizados en el laboratorio se ha comprobado que las condiciones óptimas de amplificación de los primers son:

- ✓ Para TTN-Ex186H-N2B, TTN-Ex143-N2A y TTN-154J-N2B.

	Volumen (µl)
Buffer + enzima	6,25
Primer	2
Solución Q	1
H <sub>2</sub> O	1,75
ADN	1,5

Tabla 7. Condiciones de PCR para los fragmentos arriba indicados.

- ✓ Para todos los demás exones y fragmentos se ha visto que las condiciones de PCR son:

	Volumen (µl)
Buffer + enzima	6,25
Primer	1,5
Solución Q	1
H <sub>2</sub> O	2,25
ADN	1,5

Tabla 8. Condiciones de PCR generales.

Comparando las diferencias entre ambas condiciones de PCR se puede apreciar que éstas residen únicamente en el volumen del primer (Tabla 9). Por lo tanto, se puede pensar que las bandas tenues que se observaban eran debidas, simplemente, a que el volumen dispensado de estos primers no era suficiente para amplificar las muestras.

	Tabla 7. Condiciones específicas	Tabla 8. Condiciones generales
Buffer + enzima	6,25 µl	6,25 µl
Primer	2 µl	1,5 µl
Solución Q	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	1,75 µl	2,25 µl
ADN	1,5 µl	1,5 µl

Tabla 9. Comparación de las distintas condiciones de PCR.

A continuación se muestran las fotos de las electroforesis realizadas, donde se puede comprobar lo anteriormente citado en el apartado 3.2.

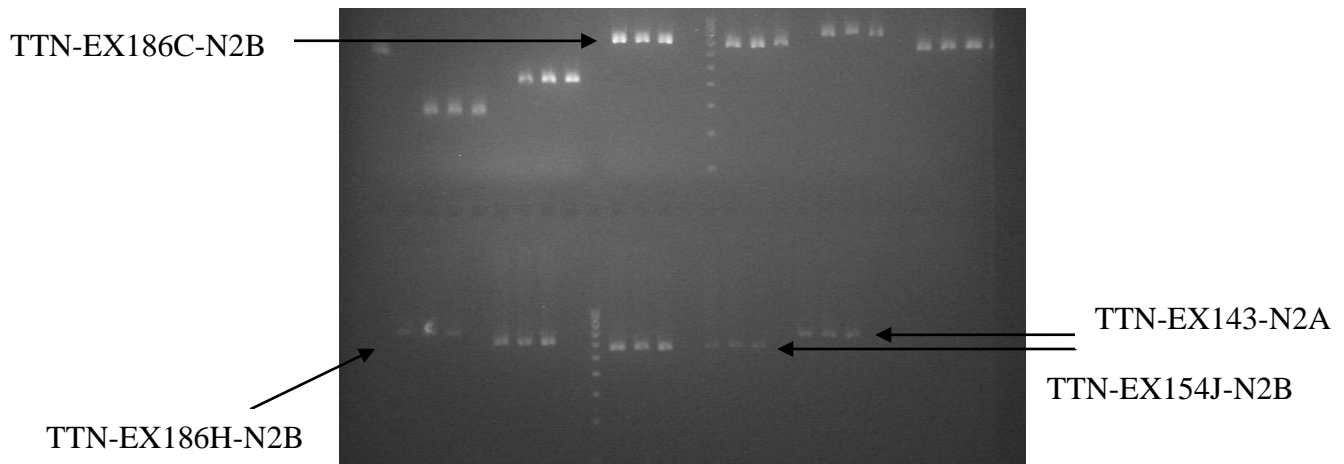


Imagen 10. Electroforesis (parte 1).

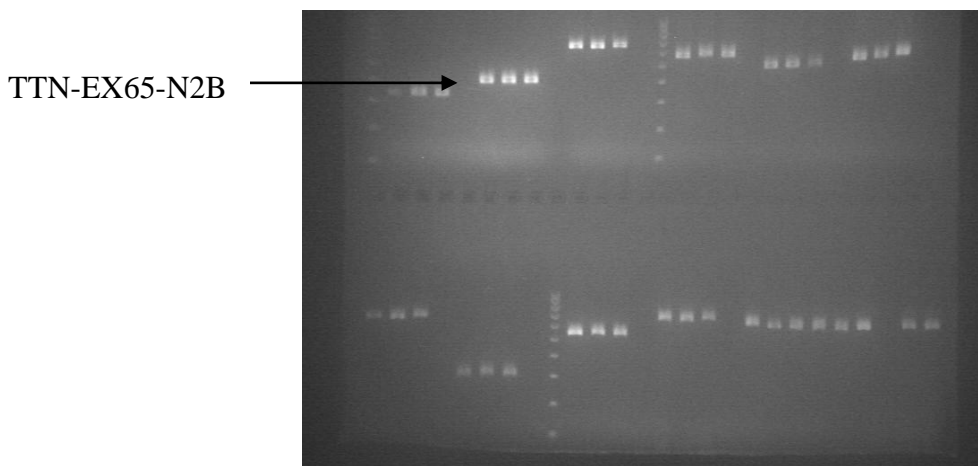


Imagen 11. Electroforesis (parte 2).

Tal y como se señala en las fotografías (Imagen 10 y 11), las bandas de los fragmentos TTN-Ex186H-N2B, TTN-Ex143-N2A y TTN-Ex154J-N2B presentan unas bandas demasiado tenues como para esperar que la lectura del secuenciador sea correcta. Asimismo los fragmentos TTN-Ex186C-N2B y TTN-Ex65-N2B muestran una estela tras la banda. Se repite la electroforesis de estos dos con un tiempo de carrera de 40 minutos, y se observa lo siguiente:

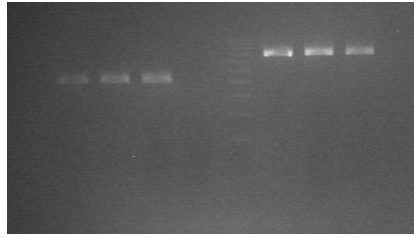


Imagen 12. Electroforesis de TTN-EX65-N2B (izquierda) y TTN-Ex186C-N2B (derecha).

Como se muestra en la imagen de electroforesis para los fragmentos TTN-Ex65-N2B y TTN-Ex186C-N2B (Imagen 12), con una carrera mayor han desaparecido las estelas que se observaban tras las bandas. Probablemente haya ocurrido porque al aumentar el tiempo, en esta ocasión, ha migrado mejor.

Seguidamente se muestra la electroforesis de los 3 fragmentos, TTN-Ex186H-N2B, TTN-Ex143-N2A y TTN-Ex154J-N2B, a los que se les asignó unas condiciones de PCR específicas (tabla 7):

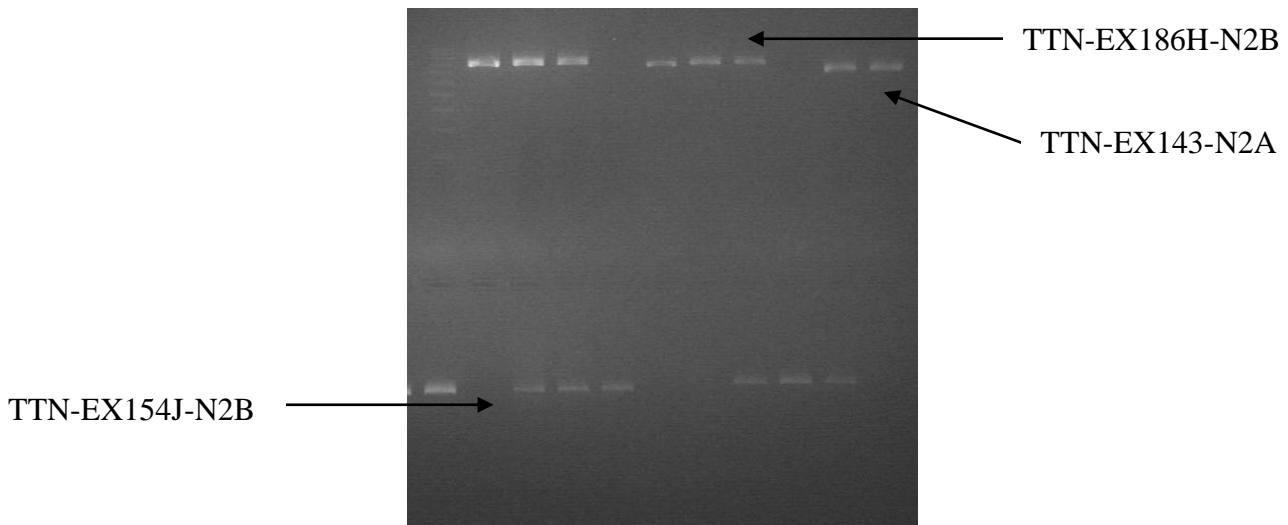


Imagen 13. Electroforesis de PCR con condiciones específicas.

En esta ocasión, las bandas de los fragmentos señalados (Imagen 13) se observan con la calidad suficiente como para continuar el proceso de optimización.

Para finalizar, el siguiente y último punto de observación de resultados es el análisis de los datos obtenidos por el secuenciador 3730 de *Applied Biosystems* mediante la aplicación informática de *Variant Reporter*, también de *Applied Biosystems*. *Variant Reporter* recoge los datos que exporta el secuenciador al finalizar el análisis de las muestras y facilita su

análisis, comparando los resultados de cada secuencia con una secuencia de referencia y señalando las variaciones que presenta respecto a ésta, además también permite hacer comparaciones entre diferentes secuencias o indicar en qué región del exón/intrón se está analizando.

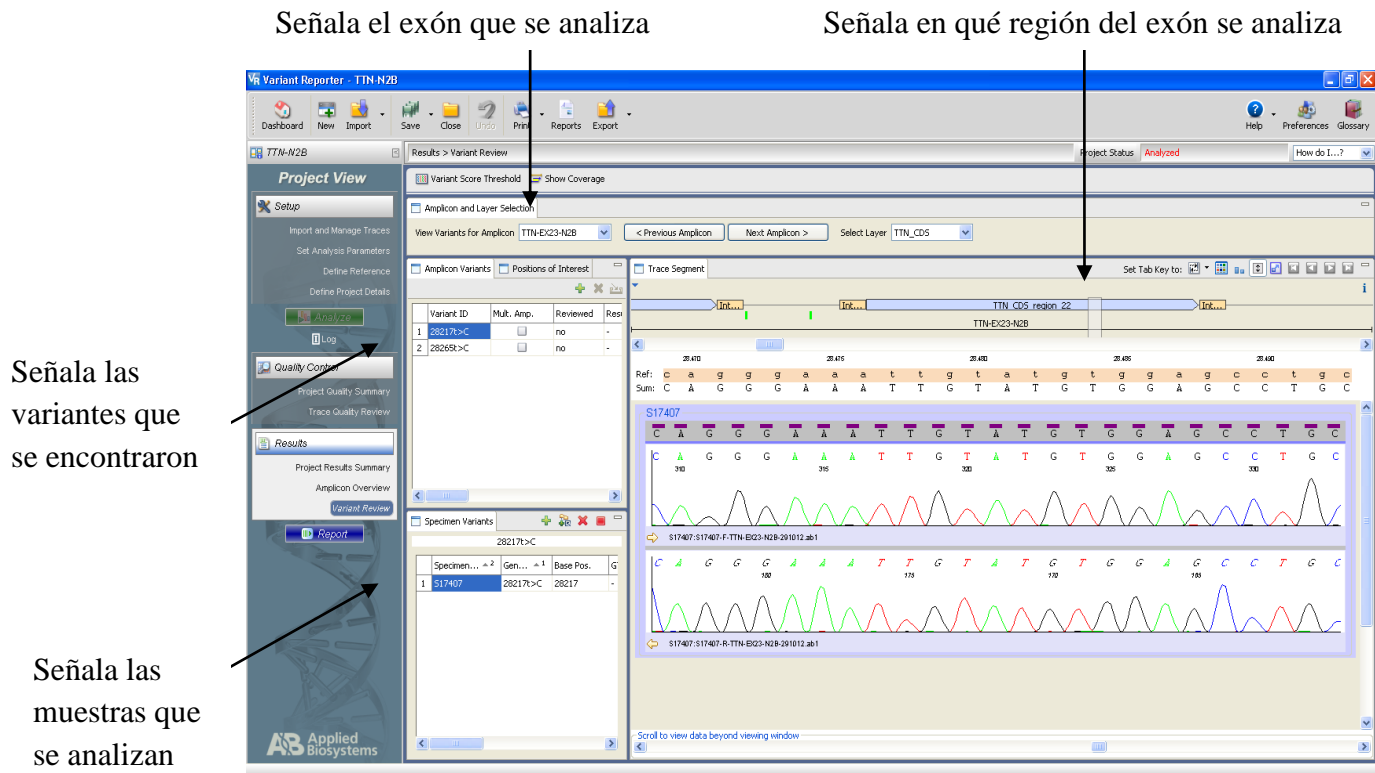


Imagen 14. Software de *Variant Reporter*.

Con ayuda del *Variant Reporter* se analizan todas las secuencias, es decir, se va comprobando que tanto la secuencia forward de la muestra como la reverse coincida con la secuencia de referencia, si no es así se anota cuál es la variante o variantes que presenta.

Además, al ser la primera vez que se secuencian estos fragmentos de titina, se comprueba que la región de lectura sea del tamaño esperado.

Las variaciones que se pueden encontrar habitualmente en una secuencia son:

- ✓ Cambios nucleotídicos sinónimos o no sinónimos
- ✓ Inserciones que no modifican la pauta de lectura
- ✓ Deleciones que no modifican la pauta de lectura
- ✓ Frameshifts, cambios en la pauta de lectura provocados por inserciones o deleciones

Igualmente, se pueden encontrar en los 20pb de las regiones intrónicas flanqueantes variaciones que pueden afectar al splicing de la proteína. Para predecirlo se emplea un programa informático *Alamut*, de *Interactive Biosoftware*, que compara en diferentes bases de datos.

A continuación se muestra el ejemplo de una secuencia que no presenta ninguna variante en el exón TTN-Ex23-N2B. En la línea indicada como *Ref* muestra la secuencia de referencia con la que se compara, la línea *Sum* señala el sumatorio de la secuencia forward y reverse de la muestra problema. Las bandas moradas que aparecen debajo de *Ref* y *Sum* hacen referencia a la calidad con la que se da el resultado de cada nucleótido. Por último se muestra el electroferograma de la secuencia forward y reverse

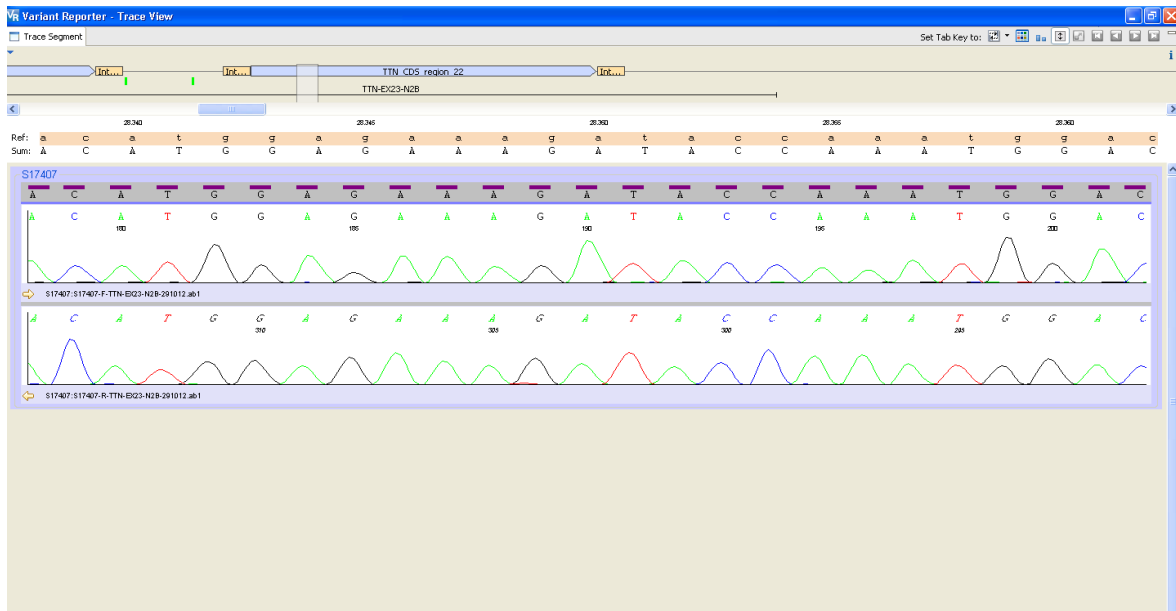


Imagen 15. Software de *Variant Reporter*. Análisis del exón TTN-Ex23-N2B de una muestra.

En el siguiente caso se muestra como se visualizan 2 muestras a la vez para el exón TTN-Ex21-N2B. En la primera muestra (situada en la parte superior) se observa que no presenta variantes para dicho exón. Sin embargo, la segunda muestra (situada en la parte inferior de la imagen) presenta, en la posición señalada, 2 picos en el electroferograma: uno de color negro correspondiente a la G y otro verde correspondiente a la A, lo que está indicando que este paciente presenta una variante en heterocigosis.



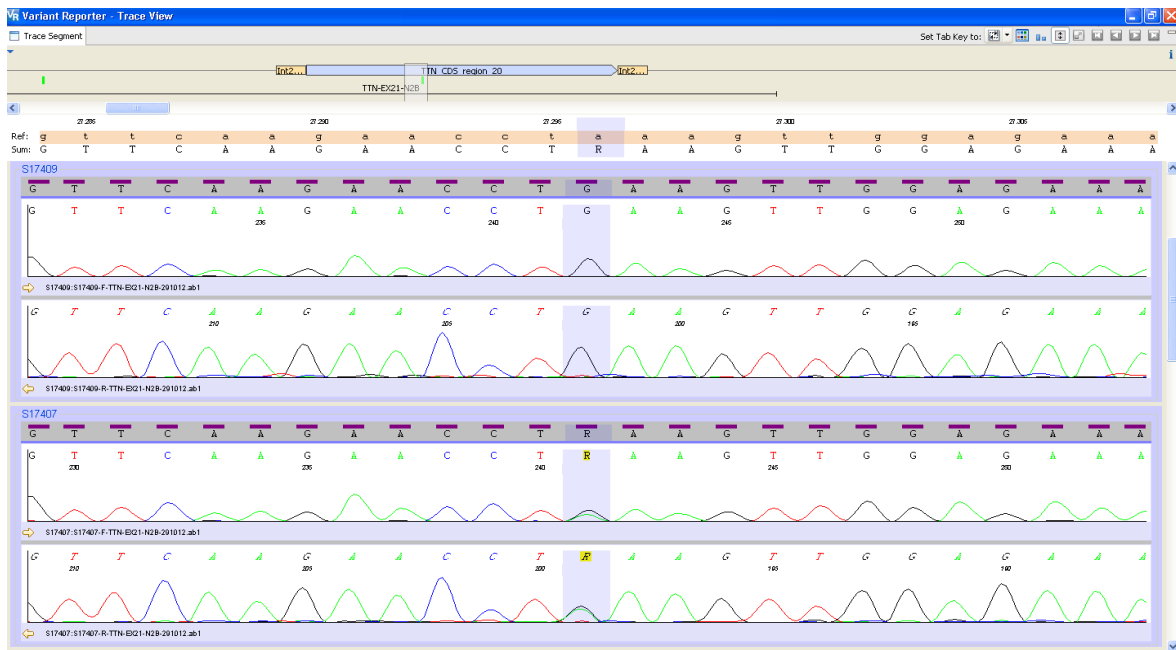


Imagen 16. Software de *Variant Reporter*. Análisis del exón TTN-Ex21-N2B de dos muestras.

Tras analizar con el *Variant Reporter* las secuencias de todas las muestras requeridas se puede afirmar que se han detectado las siguientes variantes:

Muestra	P. genómica de laboratorio	Cambio aa.	Significado del cambio
1445	g.275060G>C	p.A25686P	No sinónimo
1445	g.61345C>T	p.R5441X	Stop
1492	g.272745C>G	p.P24914R	No sinónimo
1391	g.129752_129754delGAA	p.10170_10170del	Delección
1494	g.176210_176215delGCAGAT	p.5547_5548del	Delección
1300	g.235888_235890delACA	p.15801_15801del	Delección
1300	g.27390A>T	p.D1186V	No sinónimo
1701	g.272135_272136insCCTTCAGAT	p.P24711delinsPSDP	Inserción
1701	g.272124_272125insAGCCTTCAG	p.K24707delinsKPSE	Inserción
1701	g.202395C>T	p.R8985C	No sinónimo
1377	g.87601G>T	p.R6646I	No sinónimo
1498	g.227236T>C	p.S13302P	No sinónimo
1498	g.48248G>A	Intrónica	Splicing
1625	g.195809G>C	p.A7807P	No sinónimo
1711	g.129752_129754delGAA	p.10170_10170del	Delección
1711	g.233441A>G	p.E14985G	No sinónimo
1711	g.217974G>A	p.E11694K	No sinónimo
1711	g.133773G>C	p.E10289Q	No sinónimo

1711	g.264858T>C	Intrónica	Splicing
1381	g.257639A>G	p.N21581S	No sinónimo
1381	g.28390C>T	p.R1304C	No sinónimo
1446	g.276528G>A	p.R26175Q	No sinónimo
1446	g.202171C>G	p.T8910S	No sinónimo
1629	g.253845G>A	p.R20744Q	No sinónimo
1668	g.276900A>G	p.E26299G	No sinónimo
1390	g.272700G>A	p.R24899H	No sinónimo
1287	g.217974G>A	p.E11694K	No sinónimo

Tabla 10. Posición de las variantes que se han encontrado en el laboratorio. *P. genómica de laboratorio* es la posición genómica de la variante junto al cambio nucleotídico. *Cambio aa.* muestra el cambio aminoacídico, en los casos en los que se hace la anotación *intrónica* indica que el cambio no ha tenido lugar dentro del exón y, por lo tanto, no hay cambio aminoacídico, pero se estudiará igualmente porque puede afectar al splicing de la proteína. *Significado del cambio* hace referencia a cómo afecta esa variante en la secuencia.

Comparando los resultados de la Tabla 10, que se han obtenido por el método de secuenciación de Sanger, con los de las Tablas 1 y 2, que se han obtenido por NGS, se puede confirmar que los resultados alcanzados son los esperados y, por lo tanto, que los resultados obtenidos por ambos métodos de secuenciación son los mismos.

Basándose en estos datos, y apoyado en numerosos artículos y revisiones científicas, se demuestra que aunque todavía no se realicen diagnósticos genéticos por NGS, parece que la técnica ya está ampliamente desarrollada para su implantación.

## **5. CONCLUSIÓN**

Health In Code cuenta con un laboratorio de análisis genético que emplea tecnología Sanger para el diagnóstico de cardiopatías familiares. Sin embargo, se está iniciando en un nuevo servicio basado en el diagnóstico genético empleando nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS).

El estudio de un paciente con NGS permite analizar gran cantidad de genes a un costo mucho más bajo y detectar miles de variantes genéticas que pueden estar asociadas a otras patologías. Estos son algunas de las ventajas que presentan las técnicas de NGS frente a la ya tradicional técnica de Sanger, y son motivos suficientes para que Health In Code esté muy interesado en adentrarse en el mundo de NGS.

Así, artículos y revisiones, en los cuales se confirman que los resultados obtenidos por Sanger coinciden con los de NGS, son esenciales para poner definitivamente a punto esta técnica y dar el salto al diagnóstico genético por secuenciación masiva.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **5.1. Lecturas principales**

1. Tobias Voelkel, Wolfgang A Linke. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2011;462:143–154
2. Henk Granzier, Siegfried Labeit. Structure–function relations of the giant elastic protein titin in striated and smooth muscle cells. *Muscle Nerve* 2007;36:740–755
3. Martin M LeWinter, Henk Granzier. Cardiac titin: A multifunctional giant. *Circulation* 2010, 121:2137-2145
4. Wolfgang A Linke. Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular research* 2008;77:637-648
5. Henk L. Granzier, Siegfried Labeit. The giant protein titin: A major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circulation Research* 2004;94:284-295
6. Ricardo Castro-Ferreira, Ricardo Fontes-Carvalho, Inês Falcão-Pires, Adelino F Leite-Moreira. The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications. *Arq Bras Cardiol* 2011;96:332-339

### **5. 2. Lectura complementaria**

7. Henk Granzier, Yiming Wu, Labeit Siegfried, Martin LeWinter. Titin: Physiological function and role in cardiomyopathy and failure. *Heart Failure Reviews* 2005;10: 211–223
8. Larissa Tskhovrebova, John Trinick. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;612482:1-7

9. Aikaterini Kontrogianni-Konstantopoulos, Maegen A Ackermann, Amber L Bowman, Solomon V Yap, Robert J. Bloch. muscle giants: Molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev* 2009;89:1217–1267
10. Tskhovrebova L, Trinick J. Role of titin in vertebrate striated muscle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 2002; 357:199–206
11. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, Del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circulation Research* 2004;95:708-716