

36.106

C/201

16097452

19944330

T.D.
C/201

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR



GENÉTICA MOLECULAR DE LA CAVERNOMATOSIS CEREBRAL FAMILIAR

Tesis doctoral presentada por
Alzenira de Fátima Costa Martins

Sevilla, 2003

TD
C/201

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Departamento de
de
de
de

Consejo de
EL DIRECTOR DE

del

525

464

13-11-2003

El Jefe del Servicio de Tests

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Lucas Lucas'.

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

D. Miguel Lucas Lucas, Jefe de Servicio de Biología Molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena y profesor titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Certifica que:

Alzenira de Fátima Costa Martins, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección en este departamento la tesis doctoral titulada "**Genética Molecular de la Cavernomatosis Cerebral Familiar**", reuniendo todas las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Sevilla, 27 de febrero del 2003.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Lucas Lucas'.

VºBº del Director

Dr. Miguel Lucas Lucas

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alzenira de Fátima Costa Martins'.

El interesado

Alzenira de Fátima Costa Martins

AGRADECIMENTOS

Este trabajo no habría salido a la luz sin el ánimo y la colaboración de muchas personas. Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que han posibilitado la realización de este trabajo y de forma especial:

Al Dr. Miguel Lucas, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Médica y director de esta tesis por su confianza, su constante apoyo y por toda la ayuda prestada para la consecución del trabajo.

A Francisca Solano, Técnico de laboratorio, por su compañerismo diario y su apoyo moral, por las inúmeras ocasiones en las que me presto generosamente su ayuda, compartiendo las ideas y haciéndome recomendaciones y sugerencias para la mejora del trabajo.

A mis compañeras María Dolores Zayas, Amail Chadli, Luminita Dinca y Antonio Jiménez, por su amistad y estímulo constante hacia la investigación y su cooperación a lo largo del periodo de realización del trabajo.

A la Dra María Luz Bellido, a Hada Matcher, a Cristina Sánchez, a Francisco Torrico y a José Luis Navarro por su prestigiosa ayuda en la corrección del texto.

A la empresa Biomol y en especial a su director el Sr. Emilio Rodríguez por proporcionarme los productos necesarios para la realización de los experimentos y por compartir momentos agradables con todo el grupo.

A todos mis profesores que desde muy temprano me despertaron el interés por la biología y de forma especial al Dr. Antonio Augusto Vieira Lopes por me haber guiado y aconsejado en mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

A todas las familias de cavernomatosis cerebral familiar que facilitaron el estudio.

A todos los médicos del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla especialmente al Dr. Guillermo Izquierdo y al Dr. José Manuel García Moreno.

A Emilio Onorato Gutiérrez quiero expresar mi más sincero agradecimiento, por haberme prestado su ayuda de forma fiel y generosa en todos los momentos difíciles, posibilitándome mi estancia en España para la realización de este trabajo.

Finalmente un agradecimiento especial a mi familia, especialmente a mis padres y hermanas y sabiendo que es imposible nombrar a todos aquellos - científicos, estudiantes y amigos - que me han ayudado a formular mis ideas a través de estimulantes discusiones; agradezco profundamente a las fuerzas de la naturaleza que los hizo cruzar en mi camino en un dado momento.

En recuerdo

a mis padres y a mi hijo Anthony Érico

ÍNDICE

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
I – INTRODUCCIÓN.....	3
1- ASPECTOS CLÍNICOS.....	3
1.1 - Definición.....	3
1.2 - Incidencia.....	3
1.3 - Etiología.....	4
1.4 - Histopatología.....	4
1.5 - Clasificación.....	5
1.6 - Síntomas clínicos.....	5
1.7 - Historia natural.....	5
1.8 - Diagnóstico.....	6
1.8.1 - Diagnóstico prenatal.....	6
1.9 - Tratamiento.....	7
1.10 – Terapia Génica.....	7
2 - GENÉTICA DE LA CAVERNOMATOSIS.....	8
2.1 - Descubrimiento de la proteína KRIT-1.....	8
2.2 - Estructura.....	8
2.3 - Análisis por ordenador de la proteína KRIT-1.....	8
2.4 - Función.....	10
2.4.1 - Interacción con la proteína Krev1/Rap 1a.....	10
2.4.2 - Interacción con la proteína Icap 1.....	11
2.5 - Expresión génica.....	13
2.6 - Patrón de herencia.....	13
2.7- Penetrancia.....	13
2.8 - Anticipación.....	14
3 - ASPECTOS MOLECULARES DE LA CAVERNOMATOSIS.....	17
3.1 - Localización cromosómica, marcadores y mapa físico de la región.....	17
3.2 – Heterogeneidad genética.....	17
3.3 – Análisis de ligamiento.....	17
3.4 - Asociación entre cavernomatosis cerebral familiar y malformaciones.....	

vasculares cutáneas hiperqueratósicas.....	18
3.5 - Mutaciones.....	19
3.5.1 - Mutación 1283→T.....	19
3.5.2 - Mutación 1 BP del, 1342A.....	19
3.5.3 - Mutación 1 BP ins, 1271C.....	19
3.5.4 - Mutación 1 BP ins, 247C.....	19
3.5.5 - Mutación 261G→A.....	19
3.5.6 - Mutación 1012 del (26 BP).....	20
3.5.7 - Mutación 615G→.....	20
3.5.8 - Mutación 681 del(GAAT).....	20
3.5.9 - Mutación 84 BP del, 1348.....	20
3.5.10 - Mutación -12nt/1430G→A.....	20
3.5.11 - Mutación 1 BP del, 436A.....	20
3.5.12 - Mutación 1 BP del, 633T.....	20
3.5.13 - Mutación 742C→T, Gln248Ter.....	20
3.5.14 - Mutación 1 BP del, 103G.....	20
3.5.15 - Mutación IVS2, T→C, +2.....	21
3.5.16 - Mutación 1089 del A.....	21
3.5.17 - Mutación 1314 del T.....	21
3.5.18 Mutación 990 T→A.....	21
3.5.19 - Mutación IVS4+1G→A.....	21
3.5.20 - Mutación IVS8-2A→G.....	21
3.5.21 - Mutación 281C→G.....	21
3.6 - Contribución del análisis molecular al diagnóstico de la cavernomatosis cerebral familiar.....	21
II - MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
1 - SUJETOS DE ESTUDIO.....	23
1.1 - Obtención de muestras de sangre.....	23

2 - REACTIVOS.....	23
3 - PROCEDIMIENTOS.....	23
3.1 - Extracción de DNA.....	23
3.1.1 - Extracción de DNA por el método Dextrano-salino.....	23
3.1.2 - Extracción de DNA con fenol.....	24
3.2 - Medida de la concentración de DNA.....	24
3.3 - PCR.....	24
3.3.1 - Amplificación del locus CCM1.....	25
3.3.2 - Análisis del producto amplificado.....	26
3.3.3 - Electroforesis en gel de agarosa.....	26
3.3.4 - Tinción con bromuro de etidio.....	26
3.3.5 - Purificación de DNA.....	26
3.4 - SSCP.....	28
3.4.1 - Detección de polimorfismos en el locus CCM1.....	29
3.4.2 - Electroforesis en minigel acrilamida.....	29
3.4.3 - Tinción con SYBR Gold.....	30
4 - RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.....	30
4.1 - Digestión del DNA con endonucleasa de restricción.....	31
4.2 - Digestión del DNA con la enzima <i>Mse I</i>	31
4.3 - Digestión del DNA con enzima <i>Rsa I</i>	32
5 - SECUENCIACIÓN DEL LOCUS CCM1.....	32
5.1 - Secuenciación automática.....	35
5.2 - PCR de secuenciación.....	35
5.3 - Cebadores marcados con IRD-800.....	35
5.4 - Electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante.....	36
5.5 - Captación de imagen.....	37
5.6 - "Focus" y "auto gain".....	37
5.7 - Análisis automático de las secuencias.....	38
5.8 - Ambigüedades.....	38

6 - ÁRBOLES GENEALÓGICOS.....	41
6.1 - Simbología básica del árbol genealógico.....	41
6.2 - Árboles genealógicos de las familias estudiadas.....	42
7 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
III - RESULTADOS.....	57
1 - ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS DEL GEN CCM1.....	57
1.1 - Secuencia de aminoácidos del gen CCM1.....	57
1.2 - Secuencia exónica completa del gen CCM1.....	59
2 - ESTUDIO DE POLIMORFISMO DEL GEN CCM1 POR SSCP.....	64
3 - RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL EMPLEO DE SSCP SECUEN- CIACIÓN AUTOMÁTICA.....	64
3.1 - Exón 3.....	65
3.1.1 - Familia CV 59.....	65
3.2 - Exón 4.....	69
3.2.1 - Familia CV 66.....	69
3.3 - Exón 6.....	72
3.3.1 - Familia CV 36.....	72
3.3.2 - Estudio comparativo de la mutación 742T→C entre españo- les y americanos para verificar efecto fundador.....	73
3.4 - Exón 10.....	80
3.4.1 - Familia CV 10.....	80
3.5 - Exones 1, 2, 5, 7, 8, 9, 11 y 12.....	83
4- ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN CCM1 EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y PORTUGUESA.....	88

IV - DISCUSIÓN.....	92
1 - Localización de KRIT-1.....	92
2 - Expresión del gen KRIT-1.....	92
3 - Función de la proteína KRIT-1.....	93
4 - Pérdida de función de la proteína KRIT-1.....	93
5 - Función de los nuevos exones.....	94
6 - Búsqueda de mutaciones.....	94
6.1 - Polimorfismo conformacional de hebra simple - SSCP.....	94
7 - Estudio de las familias afectadas.....	95
8 - Familia CV 36 - Exón 6.....	96
9 - Mecanismo de Knudson.....	96
10 - Efecto fundador en familias de Iberoamérica.....	97
11 - Familia CV 59 - Exón 3.....	97
12 - Familia CV 66 - Exón 4.....	97
13 - Familia CV 10 - Exón 10.....	98
14 - Diagnóstico molecular.....	98
15 - Uso de la secuenciación automática en el diagnóstico de CCM.....	98
16 - Perspectivas de futuro.....	99
V - CONCLUSIONES.....	100
VI - BIBLIOGRAFÍA.....	101
VII - ABREVIATURAS.....	107
VIII - ANEXOS.....	109

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades neurológicas comprenden un amplio conjunto de patologías algunas de las cuales están mediadas por proteínas anómalas debido a que hay una alteración en la secuencia de DNA (ácido desoxirribonucleico) que las codifica.

La cavernomatosis cerebral familiar (CCFM - *Cerebral Cavernous Family Malformation*) es una malformación vascular cerebral, con herencia autosómica dominante, producida por mutaciones en secuencias de DNA localizadas en los locus CCM1, CCM2 y CCM3. El gen CCM1 codifica una proteína denominada KRIT-1, cuya función no se conoce todavía.

Los cambios producidos en la secuencia de la proteína KRIT-1 provocan alteraciones en el mecanismo de angiogénesis y/o vasculogénesis cerebral y acaban dando origen a los cavernomas. Estas alteraciones provocan un cuadro clínico característico en los pacientes afectados.

La proteína KRIT-1 interactúa específicamente con Krev-1/rap1a (Kirsten Reverter virus/ Ras-related protein), una proteína con actividad supresora tumoral y probablemente una alteración en KRIT-1 altera todo el mecanismo en que está implicada Krev-1.

Los cavernomas cerebrales producen un cuadro clínico característico con ataques epilépticos, migrañas y hemorragias y pueden producir alteraciones de la sensibilidad, de la función motora y alteraciones visuales. El conocimiento de la genética de la cavernomatosis permitirá comprender la base de las mutaciones que generan la cavernomatosis a nivel molecular, desvelando el secreto de la patogenia de la enfermedad. Para el diseño racional de tests diagnósticos y terapéuticos es necesario conocer los procesos moleculares que ocurren durante el desarrollo de la enfermedad.

Desde que en 1999 se comprobó que efectivamente el desarrollo de los cavernomas estaba directamente relacionado con mutaciones en el gen CCM1, se están llevando a cabo grandes esfuerzos en el sentido de intentar elucidar el mecanismo patogénico de la enfermedad para en el futuro intentar desarrollar técnicas para diagnóstico de laboratorio y tratamiento basado en la evidencia diagnóstica.

Para ello hemos planteado los siguientes objetivos:

A) OBJETIVOS GENERALES:

Análisis de mutaciones en el gen CCM1 y su implicación en el desarrollo de la cavernomatosis cerebral familiar, mediante técnicas de genética molecular.

B) OBJETIVOS CONCRETOS:

Los objetivos concretos del trabajo fueron los siguientes:

1. Recolección de familias diagnosticadas de cavernomatosis cerebral.
2. Extracción de DNA y almacenamiento de muestras para formar un banco de DNA.
3. Mantenimiento de datos clínicos y demográficos de familias de cavernomatosis cerebral.
4. Separación de formas familiares y esporádicas.
5. Puesta a punto de técnicas de genética molecular:
 - PCRs específicas del gen KRIT-1.
 - Análisis de polimorfismos de conformación.
 - Secuenciación manual y automática del gen KRIT-1.
6. Identificación de las mutaciones responsables de la cavernomatosis cerebral familiar en población española y portuguesa.

El estudio de mutaciones se realizó con el DNA (ácido desoxirribonucleico) de personas sanas utilizadas como controles y pacientes de cavernomatosis cerebral familiar.

Los individuos participantes del estudio fueron agrupados de la siguiente manera:

- Controles sanos
- Casos familiares de cavernomatosis, familias con 2 o más afectados de cavernomatosis o sintomáticos
- Casos esporádicos

INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

El primer caso de cavernomatosis fue descrito por Luschka en 1854 (Luschka, 1854). En 1928, Hugo Friedrich Kufs relaciona la cavernomatosis con la herencia genética por primera vez, a través del estudio de la autopsia de un anciano de 81 años de edad, cuyo hijo a los 17 empezó a presentar síntomas neurológicos. Desde entonces solamente dos casos fueron descritos hasta la llegada de la tomografía computarizada y de la resonancia magnética de imagen (MRI), cuando el número de casos publicados aumentó enormemente (Siegel et al, 1998).

En 1998, Labauge et al demostraron la asociación entre datos clínicos y genéticos en cavernomatosis cerebral familiar en 57 familias francesas. En 1999, se demostró la existencia de mutaciones en el gen CCM1, en formas familiares de cavernomatosis (Labauge et al, 1999; Sahoo et al, 1999; Erola et al, 2000; Zhang et al, 2000). En 2001 Lucas et al demostraron la aparición en línea germinal de mutaciones causantes de cavernomatosis.

1 - ASPECTOS CLÍNICOS

1.1 - DEFINICIÓN

Los cavernomas son anomalías vasculares del cerebro caracterizadas por la dilatación de los vasos capilares, que pueden causar un cuadro de alteraciones neurológicas con ataques epilépticos, migrañas y hemorragias. Son lesiones formadas por la agrupación de vasos sanguíneos dilatados y recubiertos por células endoteliales sin la parti-

cipación del parenquima (Rigamonti, 1991).

Además de cavernomas, también pueden ser llamados angiomas cavernosos, hemangiomas cavernosos o hemangiomas capilares. Ocurren en el cerebro, medula espinal y meninges.

Recientemente se han descrito mutaciones en CCM1, un gen que codifica la proteína KRIT-1, en pacientes de angiomas cavernosos hereditarios (Laberge, 1999; Sahoo, 1999). KRIT-1 es una proteína descrita como miembro de la familia Ras de las GTPasas con actividad supresora de tumores.

1.2 - INCIDENCIA

Representan de un 5 a 15% de todas las malformaciones vasculares del sistema nervioso central y aunque los síntomas pueden desarrollarse a cualquier edad y que se han encontrado casos de cavernomatosis en la infancia, los síntomas clínicos suelen aparecer entre la segunda y tercera década de vida (Curling et al, 1991; Zabramnski et al, 1994). Hombres y mujeres son afectados igualmente. Es difícil estimar la verdadera incidencia de los cavernomas debido a que estas lesiones pueden estar mezcladas con otros tipos de malformaciones vasculares. Los estudios de Gil-Nagel (1996) y de Sahoo et al (1999), indican una incidencia de 0,1 a 0,5% en la población general. Curling (1991) y Robinson (1991) encontraron una incidencia de 0,39% y 0,47% en la misma población. Estos datos son relativamente idénticos a los encontrados en una serie de estudios realizados en autopsias (McCormick, 1984; Otten 1989; Zabramski, 1991) y representan entre 18 a 22 millones de personas afectadas en todo el mundo (Johnson et al, 1995).

1.3 - ETIOLOGÍA

Los mecanismos de desarrollo del angioma cavernoso no son bien conocidos. Casos de cavernomas en recién nacidos apoyan la hipótesis de origen congénita (Gangemi et al, 1989, Yasargil et al, 1987). Se creó que aparecen debido a un defecto congénito causado por una diferenciación mesodérmica desordenada entre la tercera y octava semanas de gestación. De hecho existe una fuerte evidencia de que algunas lesiones vasculares del sistema nervioso central (SNC) ocurren debido a traumas, radiaciones u otras agresiones. (Zabramski et al, 1999; Sahoo, 1999).

Recientemente se ha descrito la formación de nuevas lesiones (*de novo*) en formas familiares y esporádicas. Detwiler et al, (1997). Zabramski et al, (1994) compararon una serie de MRI de individuos no emparentados entre sí, obtenidos en un intervalo de 6 a 12 meses y documentaron la formación de 17 nuevos casos en un periodo de 2,2 años.

Otros factores también pueden estar asociados a la formación de nuevas lesiones, como infecciones virales, angiogénesis reactiva tras microhemorragia (Awad et al, 1993; Awad et al, 1986; Floks et al, 1965; Gross et al, 1970; Wilmore et al, 1978) y radiaciones (Larson et al, 1998; Pozzati et al, 1989).

La formación de cavernomas múltiples en ratones de laboratorio, inducida por infecciones con poliovirus podría explicar la formación de nuevas lesiones en algunos pacientes (Flocks et al, 1965; Gross et al, 1970; Wilmore et al, 1978).

Recientemente Laberge (1999) y Sahoo (1999) demostraron que mutaciones en el gen CCM1 pueden ser la causa de angioma cavernoso hereditario. Los estudios de Craig et al (1998) demostraron la asociación de cavernomatosis a los loci CCM2 y CCM3.

Los estudios de nuestro grupo de investigación, (Lucas et al, 2001), han demostrado que los cavernomas también pueden ser causados por mutaciones no heredadas, que tienen lugar en células de línea germinal o en las primeras etapas de la embriogénesis.

1.4 - HISTOPATOLOGÍA

Histologicamente los cavernomas están caracterizados por un complejo de canales vasculares dilatados (*cavernas*) y bien delimitados, con una única capa de endotelio vascular rodeada por una fina capa de tejido fibroso denso, con hemorragia microscópica y con poca o ninguna intervención del parenquima (Davis et al, 1997; Hoang et al, 1994; Hsu et al, 1993; Kondziolka et al, 1995; Maraire et al, 1999). Las paredes de los vasos están desprovistas de músculo liso y tejido elástico, siendo muy comunes las gliosis y la aparición de macrófagos cargados de hemosiderina y calcificaciones.

También pueden presentarse como focos de calcificación y áreas con una apariencia hialinizada que tampoco contienen elastina ni músculo liso. La membrana basal, situada bajo el endotelio en los capilares normales, está ausente y muchos de los vasos dilatados contienen trombos (Maraire et al, 1995; Rengachary et al, 1996; Rigamonti et al, 1988; Zabramski et al, 1994).

Episodios recurrentes de trombosis y hemorragia llevan al depósito gradual de hierro en forma de hemosiderina y otros subproductos de la sangre en el tejido cerebral cercano a la lesión (Zabramski et al, 1999).

Las lesiones pueden variar de tamaño desde pocos milímetros hasta algunos centímetros de diámetro, siendo mayor en pacientes clínicamente sintomáticos. Su crecimiento y reaparición pueden estar relacionados con sangrados repetidos y proliferación capilar (Laberge, 1999).

1.5 - CLASIFICACIÓN

Puede ocurrir de dos formas:

Forma Esporádica: son lesiones típicamente solitarias y sin historia de cavernomatosis cerebral familiar.

Forma Familiar: También denominada forma múltiple, se caracteriza por la presencia de un número variable de cavernomas y es heredada como forma autosómica dominante con penetrancia variable (Hayman et al, 1982; Dobyns et al, 1987; Rigamonti et al, 1988; Allard et al, 1989; Malik et al, 1992; Zabramski et al, 1994).

Aproximadamente un 50% de los pacientes presentan en la forma familiar (Laberge et al, 1999), siendo esta la forma predominante en la población hispánica y en la población en general (Detwiler et al, 1997; Gunel et al, 1996; Maraire et al, 1995; Polymepoulos, 1997). Un estudio reciente sugiere que el 75% de las lesiones esporádicas son en realidad de miembros de una familia afectada, con lesiones asintomáticas que enmascaran el patrón de segregación autosómico dominante (Labauge et al, 1998).

1.6 - SÍNTOMAS CLÍNICOS

Los pacientes suelen presentar un cuadro neurológico significativo con ataques epilépticos, migrañas y hemorragias. Los déficits neurológicos pueden presentarse como debilidad muscular, parálisis, pérdida o deficiencia de tacto, audición o visión. Un rasgo clínico muy significativo es la gran variabilidad en el cuadro clínico.

Los ataques epilépticos son el síntoma clínico más común en pacientes de cavernomatosis cerebral familiar resultando estar presente en el 40% al 70% de los sintomáticos (Zabramski et al, 1994; Johnson et al, 1995), seguidos por déficits neurológicos focales presentes en 35% a 50% y dolores de cabeza inespecíficos presentes en un 10 a 30% de los pacientes (Voight et Yasa-gil 1976; Simart et al, 1986; Rigamonti et al, 1988; Villani et al, 1989; Curling et al, 1991; Robinson et al, 1991; Zabramski et al, 1994).

Es común la presencia de pequeñas hemorragias con episodios de sangrados separados por meses o años pudiendo llevar a la muerte como consecuencia de la hemorragia (Hayman et al, 1982; Gil-Nagel, 1995).

Factores como la presión sanguínea, pueden desempeñar algún papel en el crecimiento de la lesión y en la determinación de la severidad clínica de los cavernomas.

1.7 - HISTORIA NATURAL

La sintomatología suele aparecer entre 20 o 30 años de edad, aunque es muy variable.

En la cavernomatosis, las hemorragias pueden ocurrir como un evento clínico mínimo o simplemente ser observado como un aumento en el tamaño de la lesión sin ninguna secuela clínica.

Existe una marcada discrepancia entre los porcentajes de hemorragia publicados por distintos autores. En dos estudios recientes realizados en un gran número de pacientes, que fue seguido por un intervalo de tiempo relativamente corto se sugirió que el riesgo anual de hemorragia era de 0,7 % por lesión por año en un estudio y de 0,25% por lesión por año en el otro. Otros estudios han sugerido que el actual porcentaje de hemorragia recurrente es alto, en torno de 2% al año (C. Ogilvy, 2001). Kondzzielka et al (1995) estimó que el riesgo anual de hemorragia varía entre un 0,6% para los pacientes sin hemorragia previa hasta un 5% para los casos en que el cavernoma está situado en el tronco cerebral y hayan sufrido una hemorragia anteriormente. Zabramski estimó en 1,1% la tasa de riesgo de lesión por año. Este resultado concuerda con el 0,7 % publicado con Robinson et al (1991), pero es considerablemente mayor que el 0,1% publicado por Curling et al (1991). Varios estudios han demostrado que la edad puede jugar un papel importante en las hemorragias, siendo común en pacientes más jóvenes (Farmer et al, 1988; Vaquero et al, 1989).

Lesiones nuevas suelen aparecer en un 29% de los pacientes debido a la proliferación capilar o hemorragias focales o la combinación de estos dos factores (Pozzati et al, 1989; Rigamonti et al, 1990).

Un 19% de los afectados presentan cambios en el tamaño de la lesión y un 38% de los pacientes presen-

tan cambios en la intensidad de la señal, indicando que los cavernomas son lesiones dinámicas que tienden a aumentar de tamaño hasta llegar a una hemorragia y pueden bajar de tamaño durante periodos aquiescentes (Zabramski et al, 1994).

El tamaño y la localización de la lesión son determinantes en la severidad de la enfermedad. Los cavernomas localizados en el tronco cerebral suelen tener un curso especialmente agresivo.

Poca información se tiene sobre la historia natural y riesgos para pacientes asintomáticos.

1.8 - DIAGNÓSTICO

Generalmente el diagnóstico en un paciente con sintomatología de cavernomatosis se hace con resonancia magnética por imagen (MRI). Antes de la aparición de la tomografía computarizada y de la MRI, el patrón clínico de cavernomatosis era frecuentemente diagnosticado como un proceso desmielinizante. De hecho algunos pacientes que habían sido diagnosticados de esclerosis múltiple resultaban tener un cavernoma como etiología de su episodio de disfunción neurológica.

La reciente disponibilidad de marcadores genéticos ha mejorado mucho la estrategia diagnóstica de la enfermedad. La estimación correcta de los portadores asintomáticos es de gran importancia para el consejo genético de estos individuos.

1.8 1 - DIAGNÓSTICO PRENATAL

El alto riesgo de que un portador del gen mutado pueda transmitir la

enfermedad a su descendencia y la dificultad del tratamiento hace especialmente relevante el diagnóstico prenatal de la cavernomatosis.

La situación ideal para la realización de un diagnóstico prenatal es disponer de un estudio molecular previo de la mutación, por enzima de restricción de la pareja o de la familia. El estudio molecular de la familia es siempre aconsejado debido a la existencia de portadores asintomáticos que varía entre un 20 a 30% de los afectados.

En cualquier caso, tanto el diagnóstico presintomático como el prenatal debe hacerse de acuerdo con las normas del Comité General para la Enfermedad de Huntington.

1.9 - TRATAMIENTO

El tratamiento y la conducta a seguir en general, en los cavernomas intracraneales es tremendamente controvertida y todavía está por darse la última palabra. Aunque su prevalencia sea alta, por razones desconocidas (Houtteville, 1999), sólo algunos pacientes siguen un curso clínico agresivo y por ello las diferentes estrategias deben tener en cuenta la evolución natural de las lesiones (Vilalta, 1999).

La cirugía debe ser considerada en todo paciente con episodios de hemorragias recurrentes, con deterioro neurológico progresivo o epilepsia intratable.

Otra alternativa es la radiocirugía. Sus resultados son difíciles de analizar y efectivamente los trabajos de Amin-Hajani et al (1998) y de Karlson et al (1998) advierten sobre los riesgos de secuelas neurológicas e incluso de la

continuidad de la patología. Es difícil decidir sobre el tratamiento en pacientes en que la lesión ha disminuido de tamaño después del sangrado, simplemente por la reabsorción de la sangre alrededor de la misma. El único test fiable para saber si una radiocirugía tuvo éxito será el control del paciente durante un largo intervalo de tiempo.

En pacientes mayores con lesiones de difícil acceso quirúrgico el tratamiento paliativo parece ser el apropiado. Sin embargo, para pacientes jóvenes con lesiones más accesibles, extirpar la lesión puede ayudar en el control de la epilepsia, reducir el empeoramiento del déficit neurológico y prevenir hemorragias subsecuentes. Para lesiones con localizaciones críticas, pueden ocurrir complicaciones en el tratamiento y la posibilidad de esas complicaciones debe ser cuidadosamente valorada en función de la historia natural de la propia lesión.

1.10 - TERAPIA GÉNICA

Aunque la terapia génica todavía está en su infancia y solo está comenzando a influir en la vida de los pacientes, la posible curación de enfermedades genéticas por medio de técnicas de DNA recombinante ha suscitado un gran interés. Constituye un área de investigación muy activa y aunque su uso ha estimulado la función inmunitaria en pacientes con deficiencia de ADA (adenosina desaminasa) y ha reducido los niveles de colesterol en pacientes con hipercolesterolemia familiar. No está muy claro en estos momentos que la terapia génica llegue a proporcionar un tratamiento o curación segura a un costo razonable puesto que todavía nadie se ha curado con terapia génica. A pesar de estas reservas, la investigación en este campo está apor-

tando nuevas intuiciones de importancia biológica fundamental. Al igual que en muchos otros caminos de la investigación médica, el potencial de la investigación en terapia génica es considerable.

2 - GENÉTICA DE LA CAVERNOMATOSIS

2.1 - EL DESCUBRIMIENTO DE LA PROTEÍNA KRIT-1

Serebriskii et al (2000), investigaban proteínas que interactuaban con Krev-1, un miembro de la familia Ras de las GTPasas con actividad supresora tumoral, con el objetivo de elucidar la regulación básica del control del crecimiento celular y entender porqué la proteína Krev-1 puede funcionar tanto como oncogen y como antioncogen. Utilizaron el gen *krev-1* como cebador en el chequeo de híbridos para identificar proteínas que podrían producir pistas o indicio de su función. Se aislaron dos grupos de proteínas que interactuaban específicamente con Krev-1. Una clase correspondía al oncogen Raf, que ya estaba identificado como pareja de la proteína Krev-1 y la segunda clase estaba representada por 7 clones independientes del nuevo gen. Uno de los ocho, interactuó con afinidad intermedia y probó ser un cDNA parcial de la oncoproteína Raf, (Nassar et al, 1995). Los otros siete clones interactuaron muy fuertemente con Krev-1 y pertenecían a una nueva proteína que ha sido denominada **KRIT-1**, del inglés - **Krev-1 Interaction Trapped 1**.

2.2 - ESTRUCTURA

El cDNA inicialmente aislado carecía de una metionina para la inicia-

ción de la traducción y, además, se suponía que era un cDNA parcial. Serebriiski et al (2000) extendió el clon de KRIT-1 con cDNA de hígado humano y el resultado fue la adición de 398 pares de bases a la nueva secuencia. El cDNA ensamblado comprendía 1986 pares de base con una cola de poli-A adicional de 18 pares de bases. El codón de la metionina localizado en el 26 par de base de la extremidad 5' de la secuencia ensamblada inicia la traducción de 529 aminoácidos de un marco de lectura abierto (ORF - *Open Reading Frame*), seguido por aproximadamente 370 pares de bases de la secuencia 3' no traducida, conteniendo un "repeat" miembro de la familia Alu.

El alineamiento de la secuencia del cDNA de KRIT-1 con la secuencia genómica BAC RG161K23 del GENBANK (Washington University Genome Sequencing Center) reveló que el ORF está dividido en 12 exones extendidos en 37,7 Kb de DNA genómico (Sahoo 1999; Laberge-le Couteulx 1999).

2.3 - ANÁLISIS POR ORDENADOR DE LA PROTEÍNA KRIT-1

Para mejor entendimiento de la organización de KRIT-1 se realizó una búsqueda de dominios proteicos en la base de datos SMART (*Simple Modular Architecture Research*). Este estudio realizado por Sahoo et al (1999) reveló que KRIT-1 contiene por lo menos 3 dominios ankirina, empezando en el aminoácido 80 y terminando en aminoácido 177 y un dominio FERM (family *Erzin, Radixin and Miosin*) que empieza en aminoácido 209 y termina en el 433 (Fig. 1).

Los dominios ankirina intermedian relaciones entre proteínas y son encontrados en más de 400 moléculas representando una gran variedad de actividades biológicas (Sedgwick et al, 1999). Los dominios FERM son encontrados en 51 proteínas y sirven de mediadores entre proteínas citoplásmicas y membranas (Tsukita et al, 1997).

Además, la composición de este dominio parece ser única de KRIT-1, pues ninguna otra proteína de la base de datos SMART posee ambos dominios ankirina y FERM. Serebriiski et al (1997) y Laberge-le Couleulx et al (1999), detectaron 4 dominios ankirina en la proteína KRIT-1, pero utilizando criterios estrictos de SMART, Sahoo et al (1999) identificaron solamente 3 dominios ankirina.

Sin embargo, dificultades con la expresión de la proteína KRIT-1 recombinante y otras incongruencias sugerían que la secuencia de aminoácidos publicada podría estar incompleta.

- El mRNA detectado por "*Northern blotting*" era mayor que lo esperado basado en la secuencia.
- La proteína KRIT-1 recombinante presentaba un sistema de expresión irregular.
- No se encontraron mutaciones en KRIT-1 en varias familias que presumiblemente deberían estar ligadas al locus CCM1 (Eerola et al, 2000; Sahoo et al, 1999; Serebriiski et al, 1997).

Análisis por ordenador de la secuencia génica de KRIT-1 sugirió la presencia de aminoácidos adicionales que podrían extender la secuencia de cDNA en 621 pb en la extremidad 5'. Experimentos con la técnica de la RT-

PCR (*Polimerase Chain Reaction - Retrotranscription*) confirmaran la existencia de por lo menos 4 exones codificantes adicionales. La secuencia completa de la proteína KRIT-1 poseía, por tanto, 736 aminoácidos, 207 aminoácidos adicionales a los 539 previamente publicados por Laberge-le Couleulx en 1999.

KRIT-1 contiene un gran porcentaje de residuos aromáticos, particularmente tirosinas. Posee regiones hidrófobas, particularmente en la extremidad carboxi-terminal (Serebriiski, 1997) y un único dominio transmembránico en los aminoácidos 339 - 359 (Hofmann y Stoffel, 1993). No es fuertemente homóloga a ninguna proteína previamente descrita.

KRIT-1 interactúa con Krev-1 a través de su región carboxi-terminal (aminoácido ~280 - 433). Puede estar fuertemente relacionada a la familia de proteínas citoesqueléticas y proteínas asociadas a la membrana como la proteína eritrocítica 4.1 (Comboy et al, 1986), incluyendo entre otras la miosina, la azrina y la merlina (Trofatter, 1993). La extremidad N-terminal de KRIT-1 (aminoácido ~ 83-215) contiene 3 o 4 dominios ankirina (Bork, 1993, Serebriiski, 1999, Sahoo, 1999). (Fig. 1). Se demostró que los dominios ankirina son interactivos y pueden mediar la asociación de krev-1 con otras células. Estos dominios son extremadamente abundantes en proteínas de membranas y proteínas citoesqueléticas. La conocida localización de Krev-1 en compartimentos endosomiales (Beranger, 1991; Pizón et al, 1994) y la presencia de múltiples dominios ankirina sugiere que KRIT-1 podría similarmente estar asociada a membranas intracelulares.

La secuencia completa de CCM1 no interactúa con Krev-1, sino que presenta una fuerte asociación con una proteína asociada a la integrina citoplásmica - $\text{icap1}\alpha$. La nueva extremidad N-terminal de CCM1 contiene tres dominios NPXY (asparagina, prolina, cualquier aminoácido, tirosina) en los residuos 191-194, 231-234 y 250-253, pero solamente uno de ellos, el 250-253 es requerido para interactuar con icap1 , un modulador de la transmisión de señales en la integrina $\beta 1$ (J. Zhang et al, 2001).

Las integrinas son proteínas heterodiméricas que poseen dos subunidades a y b localizadas en la superficie celular y participan en el mecanismo de transmisión de señales (Howe, 1998), Brooks (1996), David (1999). Tal como se pensó en las investigaciones iniciales con Krev-1, se supone que las integrinas influyen en la angiogénesis, la morfología y la integridad vascular (Hemler, 1998; Brooks, 1996), pero esto no está claro todavía.

Hasta el momento ninguna otra proteína posee ambos dominios ankirina y FERM.

2.4 - FUNCIÓN

Hasta el momento la función de KRIT-1 no ha sido todavía determinada. Se creó que es un fuerte candidato como regulador de la función directa de krev-1 y que puede funcionar como supresor tumoral (Serebriiski et al, 1997).

El gen humano Krev-1/ rap1a codifica una pequeña proteína ligada a GTP relacionada al oncogen Ras. Inicialmente se pensó que Krev-1 era un oncogen debido a que su sobreexpresión

puede inhibir parcialmente Ras y a que puede ligarse a la GTPasa Ras y activar la proteína "in vitro". Más recientemente se ha sugerido que Krev-1 también puede funcionar como un oncogen en algunas células. Cuando la esclerosis tuberosa tipo 2 (TSC2), fue identificada como lesión genética, también se demostró la función de la tuberina como proteína GAP (*GTPase activating protein*) para Krev-1. La mutación de un gen cuya función normal es regular la actividad catalítica de Krev-1 produce un crecimiento celular anormal, sugiriendo la idea de que Krev-1 también puede actuar como oncogen en seres humanos (Golemis 1995).

2.4.1 - INTERACCIÓN DE KRIT-1 CON KREV-1/RAP1a

Krev-1 es una proteína que está implicada en la morfogénesis y diferenciación celular y que también interactúa con B-Raf, una proteína cuya deficiencia lleva a apoptosis endotelial en ratones (Boss, 1998; Wojnowski et al, 1997; Asha et al, 1999; Pizón et al, 1996).

Se especula sobre el hecho de que los cavernomas podrían ser "tumores vasculares benignos" que se desarrollan debido a una alteración en el mecanismo de control de transmisión de señales de Krev-1/ rap1a . Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que el mecanismo de krev-1/ rap1a también está alterado en esclerosis tuberosa tipo 2 (TSC2), una enfermedad autosómica dominante caracterizada por tumores neurocutáneos benignos. En TSC2, como en los cavernomas son frecuentes los ataques epilépticos. La tuberina, el producto del gen TSC2, funciona como supresor tumoral y actúa como una proteína activadora de las GTPasas (GAP) (Wielnelce, 1995). La inactiva-

ción somática o pérdida de heterogeneidad en los alelos de la tuberina en TSC2 asociados a tumores llevan a activación de Krev-1/rap1a y al crecimiento descontrolado (Mahehwar et al, 1996; Soucek et al, 1997).

La naturaleza de los cavernomas cerebrales sugiere que estos "tumores vasculares" pueden desarrollarse debido a la pérdida del alelo silvestre en el desarrollo de los vasos cerebrales. La función supresora tumoral de KRIT-1 podría ser similar al del mecanismo de la tuberina en TSC2 y por lo tanto estar asociada a los tumores.

Todas las proteínas que interactúan con Krev-1 hasta ahora definidas también interactúan en mayor o menor grado con Ras.

Para definir el dominio de KRIT-1 requerido para su interacción con Krev-1, se comparó la habilidad de una serie de derivados truncados de KRIT-1 para interactuar con Krev-1. Una pequeña delección de la extremidad carboxi-terminal de la proteína KRIT-1 (aminoácido 483 - 529) resultó en la pérdida casi total de la interacción proteica, mientras que la sustitución de dos mutaciones sin sentido en el aminoácido 368 y 363 causaba alguna disminución en la interacción.

Análisis de "Western Blot" confirmaron que todas las proteínas derivadas de KRIT-1 eran expresadas en niveles similares.

Estos resultados indicaron que KRIT-1 interacciona preferentemente con krev-1, mientras que Raf interacciona preferentemente con Ras. La región carboxi-terminal de KRIT-1 es necesaria para mediar la interacción con krev-1, mientras que el dominio amino-terminal ankirina contiene una

región que puede ser utilizada en la asociación con proteínas celulares adicionales.

2.4.2 - INTERACCIÓN DE KRIT-1 CON ICAP 1 α

Estudios recientes han demostrado la existencia de una nueva región N-terminal que contiene tres dominios NPXY (asparagina, prolina, cualquier aminoácido, tirosina) en los aminoácidos 191-194, 231-234 y 250-253 (Jung Zhang, 2001).

Cuando se utilizó la nueva proteína KRIT-1 en experimentos con Krev-1 no hubo interacción entre las dos proteínas como acontecía al principio. La extensión de la región N-terminal de KRIT-1 produce una fuerte interacción con la integrina icap1 (*integrin cytoplasmic domain-associate protein-1*). Las integrinas son proteínas de la membrana celular que en su mayoría interactúan con la matriz celular. Constituyen un grupo de aproximadamente 20 moléculas distintas y estructuralmente relacionadas (Pérez et al, 2001). (Howe et al, 1998; Brooks et al, 1996; David et al, 1999). Están formadas por dos cadenas o subunidades alfa y beta. Su papel específico todavía no está claro.

Igual que la integrina $\beta 1$, KRIT-1 interactúa con los 200 aminoácidos isofórmicos de icap1 α , pero no con los 150 aminoácidos que resultaron de un "splicing" alternativo. La expresión de KRIT-1 disminuye la interacción entre icap1 α y la integrina $\beta 1$. Esto sugiere que la integrina $\beta 1$ y KRIT-1 compiten por el mismo sitio en icap1 α , sugiriendo que quizás constituyan mecanismo de regulación.

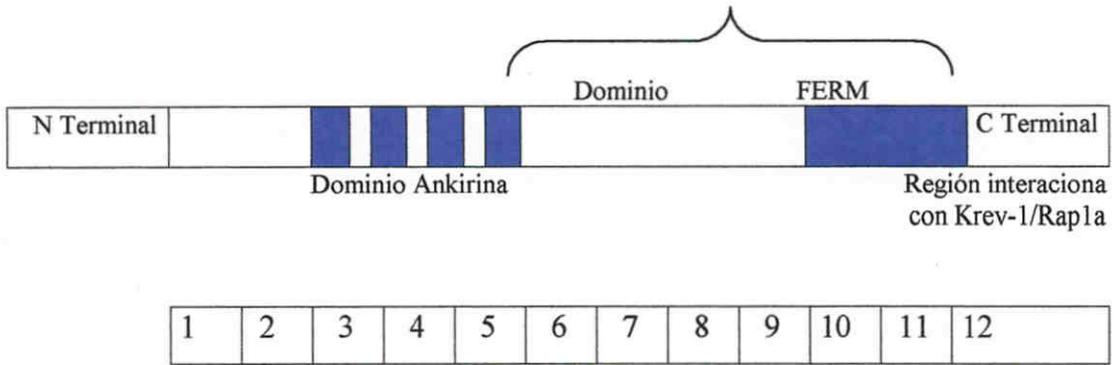


Fig. 1 - Esquema representativo de la estructura parcial del gen CCM1. En la parte superior se ve las regiones N' y C' terminal, el dominio ankirina (aa 80 a 177) y la región que interacciona con Krev-1/Rap1a. En la parte inferior se representa los 12 exones previamente identificados.

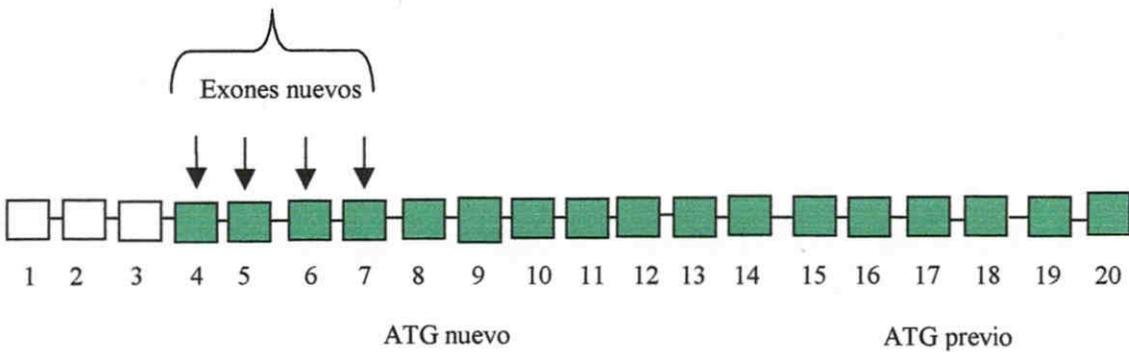


Fig. 2 - Representación esquemática de la estructura genómica total del gen CCM1. Los nuevos exones predichos por el programa Genscan (CCR.081.mit.edu.GENSCAN.html) están representados bajo la llave. Las cajas cerradas representan las secuencias codificantes, las cajas abiertas representan las secuencias no codificantes.

Existen tres dominios NPXY en la secuencia completa de KRIT-1, pero solamente el dominio codificado por los aminoácidos 191-194 es esencial para la interacción con icap1 α .

2.5 - EXPRESIÓN GÉNICA

Se ha demostrado varios niveles de expresión en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado esqueleto, riñón y páncreas, sugiriendo que la expresión de KRIT no es exclusiva del epitelio vascular o tejido cerebral. Análisis mediante "Northern Blot" demostraron que la expresión de KRIT-1 es más fuerte en corazón, músculo y cerebro.

Como la cavernomatosis puede presentarse en el nacimiento, la enfermedad puede desarrollarse en el útero, mucho antes de la aparición de cualquier síntoma clínico (Sahoo, 1999), pero el patrón de expresión de KRIT-1 durante el desarrollo todavía es desconocido. Es necesario conocer la expresión de KRIT-1 en el contexto anatómico y en el desarrollo para entender por qué el desarrollo de la cavernomatosis es casi exclusivo de vasos del cerebro.

2.6 - PATRÓN DE HERENCIA

Análisis de varios cientos de individuos demostraron que la cavernomatosis cerebral familiar se transmite siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante (Siegel, 1998). Existen varias evidencias a favor de esta hipótesis. Los estudios de Siegel (1998) indican que 69% de los afectados son descendientes de un progenitor afectado. Otro hallazgo que apoya dicha transmisión es la ausencia de saltos de generación en familias afectadas.

El patrón de herencia recesivo está descartado por la transmisión regular de la enfermedad de una generación a la siguiente y por la ausencia de múltiples afectados procedentes de progenitores sanos, mientras que la transmisión de la enfermedad de varón a varón invalida una herencia ligada al cromosoma X.

La herencia mitocondrial también puede ser excluida por la existencia de descendientes afectadas de un varón afectado.

2.7 - PENETRANCIA

La cavernomatosis es una enfermedad neurodegenerativa bastante frecuente en la vida adulta.

Aunque la evidencia para la herencia dominante es convincente, el fenotipo no es completamente penetrante. Las informaciones existentes son claramente insuficientes para el análisis. Aunque se hayan publicado varios trabajos que determinaron la penetrancia de la enfermedad no se puede calcular una tasa exacta debido a que los análisis normalmente se limitan a los familiares portadores de primer grado. Los valores para penetrancia calculados probablemente son inferiores a la penetrancia real, debido a la existencia de casos asintomáticos que no se contabilizan (Siegel et al, 1998) y que solamente un 38% de asintomáticos se someten al escáner. De estos 38%, un 50% son positivos. Según Siegel et al, (1998) la tasa de individuos asintomáticos es de un 24% y según Robinson et al (1991) es de un 30%.

Los valores para tasa de la penetrancia publicados varían bastante según el autor. Los estudios realizados por Craig et al (1988) calcularon una tasa de 88%. Jan Dubovsky et al (1995)

calcularan una penetrancia de 95%, claramente inferior a la penetrancia real debido a que en sus estudios 16 individuos que eran portadores obligatorios presentaban MRI negativa.

Basándose exclusivamente en la observación del pedigrí Polymeropoulos et al (1997) demostraron un penetrancia de 76%.

Este grupo encontró dos individuos asintomáticos con MRI positiva, tres individuos con MRI negativa y análisis genéticos positivos y otros siete individuos asintomáticos con análisis positivos, pero que no les fue posible realizar el MRI (Polymeropoulos et al, 1997).

Los estudios de Detwiler (1997) encontraron una penetrancia de 100% utilizando criterios exclusivos de imagen de resonancia magnética.

En contradicción al previamente publicado por Zabramski et al (1994) Polymeropoulos (1998) encontró inequívocas evidencias de un salto de generación en una mujer asintomática de 29 años, con dos MRIs negativas que tenía cuatro hermanos que estaban afectados por cavernomatosis y que eran descendientes de padre asintomático.

Según Polymeropoulos (1999), no es frecuente que un individuo afectado presente los cuatro síntomas a la vez (migraña severa, hemorragia cerebral, hemiparesías y ataques epilépticos). Normalmente un tercio de los afectados son monosintomáticos para migrañas o ataques epilépticos. Y además no es frecuente la existencia de individuos sintomáticos con MRI negativa, pero este criterio no es completamente fiable (Polymeropoulos, 1998).

Los análisis de Zhang et al (2000) documentaron individuos que portaban la mutación, pero que no presentaban el fenotipo enfermo en el "screening" inicial concordando con una penetrancia incompleta o dependencia de la edad. Sería interesante seguir estos individuos para ver si desarrollarán la cavernomatosis o si la penetrancia en esta enfermedad es verdaderamente incompleta.

En nuestros estudios (Lucas et al, (2002 - *in press*) se ha dado el caso de una familia que un paciente de 4 años de edad debutó con hemorragia cerebral, cuya abuela de 82 años presentaba múltiples cavernomas y que sin embargo un hermano de 18 años de edad presentaba MRI negativa y análisis genéticos positivos, ilustrando perfectamente la penetrancia variable de la enfermedad.

Según los estudios de Eerola et al (2000) un 38% de los individuos afectados portadores de mutaciones en el gen CCM1 también están afectados por lesiones cutáneas vasculares.

2.8 - ANTICIPACIÓN

El fenómeno de anticipación se refiere a la aparición cada vez más temprana de los síntomas y al aumento de la severidad en generaciones sucesivas en una enfermedad hereditaria (McInnis, 1996). Recientes estudios de genética molecular han demostrado la existencia de un aumento en el número de trinucleótidos inestables en la secuencia en varias enfermedades neurológicas como la distrofia miotónica, la enfermedad de Huntington, ataxias espino-cerebrales, etc.

Aunque todavía no ha sido detectado un trinucleótido en tandem en los enfermos de cavernomatosis cerebral familiar este es el mecanismo más

observado en este tipo de fenómeno. Ninguna evidencia de anticipación ha sido observada en los estudios de Siegel et al (1998). A pesar de esto este autor considera que existen varias razones para tener en cuenta el fenómeno de la anticipación en la cavernomatosis, como por ejemplo la dificultad en definir y comparar la severidad de la manifestación en el SNC, el hecho de que el

mecanismo biológico determinante de los síntomas clínicos todavía no está bien entendido y que el número de cavernomas sea un indicador cuestionable de la severidad de la enfermedad, porque múltiples lesiones no causan necesariamente síntomas más severos que las lesiones únicas, sino su localización.

FUNCIÓN DE KRIT-1

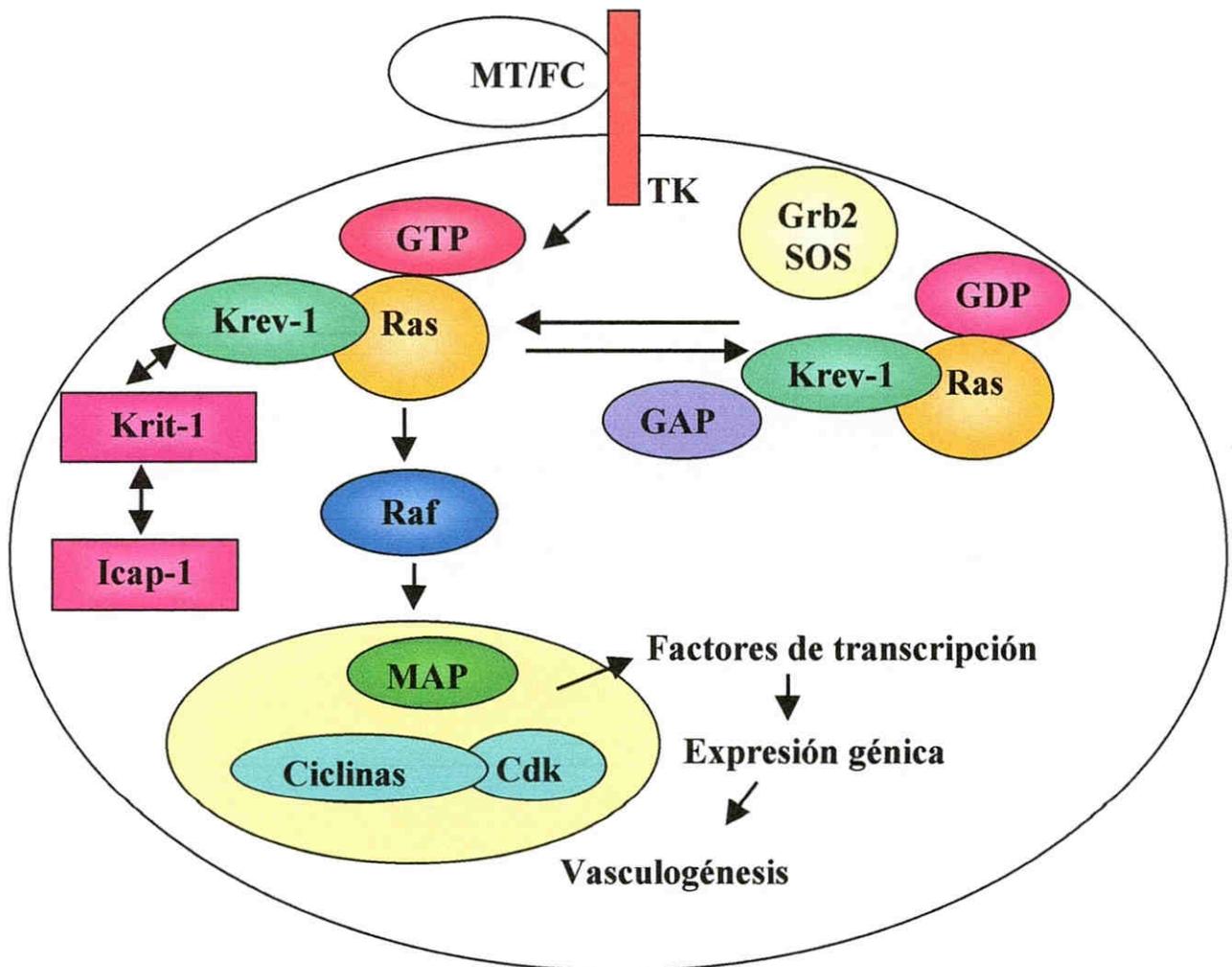


Fig 3: Esquema representativo de la función de KRIT-1. Esta hipótesis propone el papel del complejo GAP/Krev-1 en la transmisión de señales. Si el nivel de GTP en forma de ras aumenta, la cantidad del complejo GAP/Krev-1 se reduce y esto estimulará el crecimiento celular. Un fallo en la interacción entre icap1 y KRIT-1 afectaría toda la cadena de señales, impidiendo el desarrollo normal de la célula.

3 – ASPECTOS MOLECULARES DE LA CAVERNOMATOSIS

3.1 – LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA, MARCADORES Y MAPA FÍSICO DE LA REGIÓN

En 1995 Dubowski et al, mapeó un gen para la cavernomatosis en un intervalo de 33 cM en el brazo largo del cromosoma 7 (7q11-22) limitado por los marcadores D7S502 y D7S821 o D7S479. Este resultado fue confirmado por los grupos de investigadores de la universidad de Duke y de la universidad de Yale. Más tarde, Gil-Nagel et al redujeron este intervalo a 15 cM limitado por los marcadores D7S660 y D7S558/D7S1789.

El locus CCM1 comprendiendo una región de 1,9 Mb fue definido como candidato por la presencia de un haplotipo común en hispanos. Esto permitió construir el mapa físico completo del intervalo CCM1. Se utilizó análisis por ordenador de la secuencia a través de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), un programa diseñado para buscar genes y transcritos o bien el programa GRAIL II, GENESCAN, y MZEF para identificar regiones codificantes dentro de secuencia génica. Los exones identificados por análisis de ordenador de la secuencia génica fueron amplificados y posteriormente secuenciados para identificar la mutación auténtica. Sahoo et al, han identificado y analizado aproximadamente 200 exones candidatos comprendiendo 960 kb de la secuencia génica. Varios genes conocidos como por ejemplo CDK6, KRIT-1, AKAP450, YOTIAO y PFTAIRES que se encuentran en el intervalo CCM1 también fueron analizados. También se ha incluido estrategias para detectar micro o macro deleciones que pueden estar presentes en la región CCM1 del cromosoma 7q utilizando células somáticas híbridas aisladas de pacientes afectados y no afectados.

3.2 - HETEROGENEIDAD GENÉTICA

Los estudios realizados por Gunel et al (1996) identificaron dos familias afectadas por cavernomatosis cuyas mutaciones no se localizaban en el locus CCM1. Un estudio realizado en familias francesas por Labauge et al (1998), demostró que solamente un 50% de las 35 familias estudiadas eran portadoras de mutaciones en el locus CCM1 indicando heterogeneidad genética.

Craig et al (1998) realizaron análisis de ligamiento en 20 individuos caucásicos no hispanos con cavernomatosis cerebral familiar y confirmaron la existencia de dos nuevos loci: CCM2 en 7p15-p13 y CCM3 en 3q25-q27. Los análisis demostraron que 40% estaban ligados a CCM1, 20% ligados a CCM2 y 40% ligados a CCM3; con evidencia altamente significativa para ligamientos a 3 loci.

Análisis multilocus posteriores entre familias con alta probabilidad de ligamiento a cada uno de los 3 loci refinó la localización de CCM2 y CCM3 a un intervalo de 22 cM aproximadamente. El ligamiento a 3 loci puede explicar la herencia de CCM1 en todos los individuos estudiados. También fueron identificadas significativas diferencias en la penetrancia en locus específicos.

3.3 - ANÁLISIS DE LIGAMENTO

Se denomina desequilibrio de ligamiento a la asociación de un determinado alelo o combinación de alelos (haplotipo) con una enfermedad en una población. La existencia de un desequilibrio de ligamiento se debe a la cercanía entre el marcador y el gen o a la presencia de un gen fundador que hace que todos los enfermos de una determinada población hereden la misma mutación.

En 1996, Gunel et al, encontraron un haplotipo común en 6 familias hispano americanas, indicando que un ancestral común era responsable de la mutación.

Los análisis de ligamento en el gen KRIT-1 han sido difíciles debido a la gran variabilidad fenotípica del gen (Polymeropoulos et al, 1997) y a que los individuos afectados pueden presentar síntomas clínicos con lesiones en la resonancia magnética, lesiones en la resonancia magnética y cuadro clínico asintomático y también cuadro clínico sintomático con resonancia magnética de apariencia normal.

Eventos de recombinación en miembros de una misma familia definieron una región crítica de ~2 Mb y un haplotipo compartido asociado con un efecto fundador en familias hispano mexicanas (Sahoo, 1999). Una misma mutación estaba presente en 16 de las 21 familias estudiadas. Estos estudios definieron una región crítica para CCM1, limitada por los marcadores D7S2410 y D7S689 (Johnson et al, 1995).

Otras dos familias estudiadas compartían una porción menor del intervalo sugiriendo una región de ~450 kb dentro de la extremidad telomérica de la región mayor limitada por los marcadores 085-222 en la zona céntrica.

Estos resultados fueron confirmados por estudios posteriores realizados por Jun Zhang et al (2000) que encontraron cuatro familias hispano americanas portadoras de la misma mutación. Sin embargo, este desequilibrio hasta el momento no ha sido encontrado en otras poblaciones, como por ejemplo los estudios realizados por nuestro equipo de investigación (Lucas et al, 2000) en población española y portuguesa. En los estudios americanos el análisis de la secuencia génica de este fragmento mutado reveló que la mutación 742C→T era compartida por todos los individuos afectados en población hispanoamericana, mientras que la población

española y portuguesa estudiada no presenta esta mutación.

3.4 – ASOCIACIÓN ENTRE CAVERNOMATOSIS CEREBRAL FAMILIAR Y MALFORMACIÓN VASCULAR CUTANEA HIPERQUERATÓSICA

Las malformaciones vasculares cutáneas hiperqueratósicas son lesiones cutáneas raras que ocurren en un pequeño grupo de individuos con cavernomatosis cerebral familiar. Los cavernomas y las lesiones cutáneas tienen una apariencia histopatológica similar. Las malformaciones vasculares son frecuentes en la piel pero pueden ser encontradas en otros tejidos. Análisis genéticos apoyan la hipótesis de que la cavernomatosis cerebral familiar puede estar asociada a malformaciones vasculares cutáneas hiperqueratósicas.

Los estudios de Eerola et al (2000) describen la transición de una T → C, una mutación encontrada en un individuo con cavernomatosis y lesiones cutáneas, que altera el dinucleótido GT, que es el sitio de "splicing" en el exón 2 y la delección de una G (nt 103) en el exón 1, lo que podría causar el truncamiento proteico en el inicio de la transición.

En el estudio realizado por Laberge et al (1999) en 57 familias francesas se encontró 4 familias caracterizadas por la asociación de cavernomatosis con lesiones cutáneas. En estas familias 8 de los 21 individuos diagnosticados de cavernomatosis cerebral familiar por RMI y 2 que no se hicieron la resonancia magnética poseían lesiones cutáneas.

Cada familia poseía un haplotipo distinto y los 8 individuos afectados de lesión cutánea eran portadores del haplotipo CCM de su familia. Las lesiones cutáneas de los 4 pacientes eran malformaciones vasculares predominantemente del tipo

capilar en asociación con lesión hiperqueratósica epidérmica. No existía hiperplasia celular y la proliferación vascular invadía también la hipodermis.

Estos resultados sugieren la asociación de cavernomas y lesiones cutaneas en los miembros de estas familias. Estas lesiones son raras puesto que fueron observadas solamente en 8 de los 21 individuos con MRI positivas en un total de 173 individuos estudiados. Ninguno de los 89 miembros sanos presentaban la lesión fueron observadas en por lo menos 2 miembros de cada familia (Labauge, 1999).

Se supone que la ocurrencia de lesiones cutaneas vasculares en estos pacientes es debido a la misma anomalía genética causante de cavernomatosis. Esta asociación tiene una penetrancia calculada en aproximadamente 38% (Eerola, 2000). De acuerdo con estos estudios en un subgrupo en que la cavernomatosis es causada por mutaciones en el gen CCM1 existe un riesgo adicional de 40% de padecer lesiones cutaneas. Estas mutaciones no fueron encontradas en ninguno de los demás miembros afectados ni en los 50 controles sanos, sugiriendo que la mutación presente en el gen CCM1 era responsable por el desorden expresado como cavernomas asociado con lesiones cutaneas.

3.5 - MUTACIONES

Hasta el momento todas las mutaciones descritas pueden ser clasificadas como mutaciones sin sentido, deleciones e inserciones, cambios en la pauta de lectura o en el sitio de "*splicing*" (corte y empalme) que resultarán en la formación de un codón de terminación prematuro, y consecuentemente en la formación de una proteína truncada con pérdida de función.

3.5.1 - Mutación 1283C→T

En tres individuos con cavernomas, Laberge-le Couteulx et al (1999) encontraron una mutación sin sentido que resultó en un codón de terminación cuya mutación era la transición del nucleótido C a T en la posición 1283. OMIM 116860.

3.5.2 - Mutación 1 BP DEL, 1342A

En cinco individuos con cavernomatosis cerebral familiar, Laberge-le Couteulx et al (1999) encontraron deleciones que cambiaban la pauta de lectura, resultando en un codón terminación prematuro. Uno de ellos era una deleción de un par de bases en el nucleótido 1342. OMIM 116860.

3.5.3 - Mutación 1 BP INS, 1271C

En dos individuos con cavernomatosis, Laberge-le Couteulx et al (1999) encontraron una inserción de una citosina después del nucleótido 1271, que cambiaba la pauta de lectura, produciendo un codón de terminación prematuro. OMIM 116860.

3.5.4.- Mutación 1 BP INS 247C

Esta mutación identificada por Laberge-le Couteulx et al (1999) describe la inserción de una citosina antes de nucleótido 247.

3.5.5 - Mutación 261G→A

Esta mutación describe la transición de una guanina a adenina. (Laberge-le Couteulx, 1999).

3.5.6. - Mutación 1012 DEL(26 BP)

Esta mutación consistía en la deleción de 26 pares de base en el exón 8, que producía un cambio en la pauta de lectura y terminaba un codón terminación. También fue descrita por Laberge-le Couteulx et al en 1999.

3.5.7 - Mutación 615 G→A

La transición de una G a una A en nucleótido 615 produce un codón terminación. (Laberge-le Couteulx, 1999).

3.5.8 - Mutación 681 DEL(GAAT)

La deleción de los cuatro pares de bases GAAT en el posición 681, cambia la pauta de lectura y produce un codón terminación.

3.5.9 - Mutación 84 BP DEL 1348

Laberge-le Couteulx (1999) describe la deleción de 84 pares de base en un individuo portador de cavernomatosis.

3.5.10 - Mutación -12nt/1430 G→A

La amplificación del cDNA de dos pacientes reveló una banda más pequeña de la misma intensidad que las bandas normales, que estaba ausente en los individuos sanos y otros pacientes. Los análisis de la secuencia del producto de la RT-PCR identificaron la deleción del exón 11 (nt 1430-1546), llevando a la producción de una proteína truncada, en la cual faltaban 39 aminoácidos en la región que interactúa con Rap1A. La secuenciación del DNA de este paciente reveló la sustitución de una A→G en el intrón 10, 12 bp antes del sitio de "*splicing*", sugiriendo que el transcrito truncado observado en el paciente podría ser resultado de un "*splicing*" anormal.

El análisis de la secuencia del producto de la RT-PCR del otro paciente re-

veló la deleción de un fragmento de 84 pb (nt 1348-1431) llevando a la producción de una proteína truncada en la cual faltaban 28 aminoácidos en la región que interactúa con Rap1A. La amplificación del DNA genómico y la secuenciación sugieren que esta deleción se debe a una deleción en la extremidad 3' del exón 10 y de la secuencia intrónica que contiene el cebador reverse usado en la secuenciación del exón 10. (Laberge-le Couteulx et al, 1999).

3.5.11 - Mutación 1 BP DEL 436A

Esta mutación consiste en la deleción de una adenina en el nucleótido 436. (Laberge-le Couteulx et al, 1999).

3.5.12 - Mutación 1 BP DEL 633T

Esta mutación consiste en la deleción de una timina en nucleótido 633, produciendo un codón de terminación (Laberge-le Couteulx et al, 1999).

3.5.13 - Mutación 742C→T, GLN248TER

Los análisis realizados por Sahoo et al (1999) en 21 familias mexicomericanas con cavernomatosis, identificaron una mutación en el gen KRIT-1 que consistía de una transición de un par de bases en 742C→T, cambiando una glicina por un codón de terminación prematuro. Esta mutación estaba presente en todos los miembros afectados. La identificación de un haplotipo común en los individuos afectados de esta población sugiere un efecto fundador. OMIM 116860

3.5.14 - Mutación 1 BP DEL, 103G

Eerola et al. (2000) encontraron esta mutación en dos de cuatro individuos de una familia con cavernomatosis que también manifestaban lesiones cutaneas. Todos los 4 individuos afectados fueron heterocigotos para la deleción de un bp de una G después del aminoácido 26 en el

exón 1 que resultó en un cambio de la pauta de lectura y codón de terminación prematuro en el codón 37. OMIM 116860.

3.5.15 - Mutación IVS2, T→C, +2

Eerola et al. (2000) estudió tres generaciones de una familia con cavernomatosis en que los miembros afectados eran heterocigotos para una transición de T →C en el sitio de "splicing" del intrón 2 del gen KRIT-1. Los análisis del producto de RT-PCR de los individuos afectados produjeron un cDNA aberrante, producto del alelo que faltaba en el exón 2 o en ambos exones 2 y 3. OMIM 116860.

3.5.16 - Mutación 1089 DEL A

La delección de una adenina en aminoácido 1089, en el exón 8, resulta en un cambio de la pauta de lectura y codón de terminación prematuro (Sahoo, 1999).

3.5.17 - Mutación 1314 DEL T

La delección de una timina en aminoácido 1314, resulta en un cambio de la pauta de lectura y codón de terminación prematuro en el exón 10 y fue encontrada por Sahoo et al en 1999.

3.5.18 - Mutación 990 T→ A

Encontrada por Sahoo (1999), esta mutación presente en el exón 8 consiste en la transición de una timina a una adenina, convirtiendo una tirosina en un codón de terminación.

3.5.19 M- Mutación IVS4+1G → A

Sahoo et al (1999), encontraron esta mutación en el exón 4. La transición de una guanina a una timina, modifica el sitio de "splicing" de GT a AT.

3.5.20 - Mutación IVS8-2A→ G

Esta mutación encontrada en el intrón 8, modifica el sitio de aceptación de "splicing" de AG a GG (Sahoo et al (1999).

3.5.21 - Mutación 281C →G

Esta mutación encontrada en el exón 3, cambia una serina a un codón de terminación (Sahoo et al 1999).

3.6 - CONTRIBUCIÓN DEL ANÁLISIS MOLECULAR AL DIAGNÓSTICO DE LA CAVERNOMATOSIS CEREBRAL FAMILIAR

Algunas técnicas derivadas de la PCR permiten la identificación rápida y fiable de mutaciones que pueden ser utilizadas en el diagnóstico directo de numerosas enfermedades moleculares. Existen técnicas que están dirigidas a la búsqueda de cualquier mutación en el gen de interés, como por ejemplo el SSCP y técnicas que van dirigidas a la búsqueda de mutaciones concretas, previamente conocidas. Estas técnicas no poseen una sensibilidad del 100%, aunque su sensibilidad depende mucho de la mutación en estudio. Su uso en laboratorios de genética molecular facilitaría mucho el diagnóstico de la cavernomatosis.

En un futuro próximo el análisis para la identificación de mutaciones se realizará mediante sistemas automáticos en que el DNA amplificado del paciente hibrida con una batería de oligonucleótidos unidos a "microchips", que cubren toda la secuencia del DNA amplificado (Skena et al, 1995; Hacia et al, 1996).

El avance en los conocimientos del gen de la cavernomatosis permitiría la identificación de una parte importante de las mutaciones de los afectados. Además

permitiría la identificación de portadores entre los familiares y el diagnóstico prenatal en parejas portadoras.

Para detectar las mutaciones el primer paso sería la amplificación por PCR de la región del gen donde aparece la mutación. El hallazgo de la mutación responsable por la enfermedad en una familia, no solo confirma el diagnóstico clínico, sino que posibilita determinar que individuos

son portadores, establecer diagnóstico pre-sintomáticos y realizar diagnósticos prenatales.

Finalmente la construcción de modelos animales podría aportar nuevos conocimientos acerca de la fisiopatología de todos los procesos involucrados en la enfermedad. Además estos modelos abrirían el camino para nuevas terapias génicas o farmacológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 - SUJETOS DE ESTUDIO

Se estudiaron 84 familias españolas y portuguesas diagnosticadas clínicamente de cavernomatosis cerebral familiar y esporádica por MRI, que fueron enviadas para estudio genético por los siguientes servicios: Servicio de Neurología del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla), Servicio de Neurología del Hospital Miguel Servet (Zaragoza) Servicio de Neurología del Hospital de Santa María, Lisboa (Portugal), Servicio de Neurología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada), Servicio de Neurología del Hospital "Verge dels Liris" (Valencia), Hospital del Mar (Barcelona) y Servicio de Neurología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid). También nos han sido enviados pacientes españoles residentes en Alemania y Australia.

Las 84 familias estudiadas constituían un total de 343 individuos. De estos, 163 eran hombres y 180 mujeres.

El diagnóstico clínico con Resonancia Magnética por Imagen (MRI), estaba basado en una evaluación neurológica detallada que incluyó examen clínico, ocurrencia familiar y cuando posible examen histopatológico posquirúrgico. Los individuos adultos asintomáticos con MRI negativa y sin historia de ataques epilépticos, migrañas o déficit neurológicos fueron clasificados como no afectos y utilizados como controles sanos.

1.1 - OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Todos los experimentos fueron realizados a partir de ADN extraído de leucocitos. Diez ml de sangre total fueron extraídos por punción venosa en tubos con heparina litio.

2 - REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados eran de grado biología molecular y se obtuvieron principalmente en siguientes casas comerciales: Merck, Boehringer Mannheim, Sigma, Serva, Pronadisa, Gibco, Pharmacia.

3 - PROCEDIMIENTOS

Los métodos empleados a lo largo de este trabajo se detallan a continuación.

3.1- EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó por el método del dextrano salino y cuando el material presentaba poca cantidad de células se realizaba por el método de extracción con fenol.

3.1.1 - EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO DEL DEXTRANO SALINO

- A 10 ml de sangre extraída en tubo con heparina litio, añadir 2,5 ml de dextrano T500 en suero fisiológico al 6%.
- Agitar el tubo de ensayo suavemente por inversión y dejar reposar una hora.
- Recoger el sobrenadante y centrifugar durante 10 minutos a 3.000 r.p.m.
- Despreciar el sobrenadante.
- Se da un choque hipotónico para eliminar los posibles hematíes que no fueron eliminadas con el dextrano añadiendo 2 ml de suero fisiológico y 6 ml de agua destilada.
- Resuspender el pellet. Vortear durante un minuto y añadir 2 ml de NaCl 3,5% para restaurar la molaridad.
- Centrifugar 10 minutos a 3.000 r.p.m.
- Despreciar el sobrenadante.
- Añadir 100 µl de PBS.

- Añadir 3 ml de tampón de lisis de leucocitos (BLL: 4 ml de NaCl 5M, 200 µl de EDTA 0,5M, 500 µl de Tris-HCl 1M y 45,3 ml de agua destilada).
- Añadir 200 µl de SDS al 10%.
- Añadir 35 µl de proteinasa K (0,2 mg/ml). Después de una agitación rotatoria durante 1 hora y media a 50°C, dejar toda la noche a 37°C.
- Añadir 1 ml de NaCl 6M, para precipitar las proteínas.
- Vortear hasta que se quede homogéneo.
- Centrifugar 30 minutos a 3.000 r.p.m.
- Pasar el sobrenadante a un tubo "Falcon" de 50 ml.
- Añadir 8 ml de etanol frío. Agitar suavemente por inversión.
- Recoger la medusa de DNA con un asa cortada y resuspender en 0,5 ml de Tris-HCl-EDTA (10:1).
- Colocar en agitación suave a 37°C hasta que se disuelva el DNA.
- Medir la absorbancia a 260 y 280 nm y calcular la concentración.
- Preparar las diluciones de trabajo a 20 µg/ml y guardar a -20°C.

3.1.2 - EXTRACCIÓN DE DNA CON FENOL

- Colocar las células en un "eppendorf" de 1,5 ml y añadirles 500 µl de tampón de lisis de leucocitos.
- Añadir 34 µl de SDS al 10% y 6 µl de proteinasa K.
- Incubar 1 hora a 50°C y toda la noche a 37°C.
- Añadir a las células igual volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1).
- Agitar bien. Reposar en hielo durante 15 minutos y centrifugar 10 minutos a 12-13.000 r.p.m.
- Quitar la fase acuosa (parte superior) y pasar a otro tubo.
- Añadir 0,1 volumen de acetato sódico 3M pH 7 e igual volumen isopropanol absoluto.

- Mezclar bien y mantener toda la noche a -20°C.
- Centrifugar 10 minutos a 12-13.000 r.p.m.
- Quitar fase superior y secar a temperatura ambiente.
- Añadir 100 µl de T.E 10:1 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) pH 8.
- Medir la absorbancia a 260 y a 280nm y calcular la concentración.
- Preparar las diluciones de trabajo a 20 µg/ml y guardar a -20°C.

3.2 - MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL DNA

La determinación de la concentración del DNA extraído, se realizó diluyendo 20 µl de la muestra en 600 µl de agua destilada y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a 260 nm y a 280 nm.

Atendiendo a la ley de Lambert Beer que relaciona la densidad óptica con la concentración, una absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble cadena. Por tanto, para calcular la concentración de la muestra se multiplica el valor de la absorbancia obtenida por 50 y por el factor de dilución. El resultado se expresa en µg/ml.

Para comprobar el grado de pureza de la muestra calculase la razón entre la absorbancia de 260 y 280 nm. Cuanto más próximo a 2 más pura será la muestra, mientras que valores inferiores a 1,6 indican contaminación proteica y en este caso se recomienda la realización de una reextracción con fenol.

3.3 - PCR

La PCR - "Polimerase Chain Reaction" - es una técnica artificial rápida y eficaz para replicar una secuencia

corta y específica de DNA, de forma que se produzcan millones de copias de la secuencia a partir de mínimas cantidades de las mismas. Esta técnica que fue ideada por K. Mullis del equipo de H. Erlich de Cetus Corporation, en 1985, ha revolucionado la biología molecular.

Para el proceso se necesitan los cebadores, la enzima DNA polimerasa termoestable, los nucleótidos y el DNA genómico del individuo. Consta de tres pasos básicos: desnaturalización del DNA a alta temperatura, hibridación de los cebadores a baja temperatura y extensión de los cebadores a una temperatura intermedia.

Se fundamenta en la propiedad de la DNA polimerasa de sintetizar secuencias complementarias y en el hecho de que las dos hebras de DNA pueden disociarse y reasociarse continuamente "*in vitro*" por calentamiento y enfriamiento.

El DNA genómico se calienta a una temperatura elevada para desnaturalizarlo y convertirlo en hebra simple. Luego se enfría este DNA a una temperatura entre 35-65°C para que se hibride con las bases complementarias de los cebadores. Nuevamente se calienta el DNA a una temperatura entre 70-75°C. A esta temperatura la DNA polimerasa sintetiza una nueva cadena de DNA, extendiéndose a partir de la secuencia cebadora. Este ciclo de calentamiento y enfriamiento se repite varias veces y a medida que se repite el DNA se va amplificando en proporción geométrica, puesto que las hebras de DNA neosintetizadas también sirven de molde para los cebadores.

3.3.1 - AMPLIFICACIÓN DEL LOCUS CCM1

La amplificación del locus CCM1, que engloba los 12 exones del

gen CCM1 descritos por S. Laberge et al (1999), fue ejecutada en los probandos y en los controles sanos utilizando los 12 cebadores previamente seleccionados y que amplificaban fragmentos desde 181 a 346 pb.

La PCR inicial ha sido realizada en un volumen final de 20 µl conteniendo 100 ng de DNA genómico, 132 ng de cada cebador sentido y antisentido, 5 unidades de Taq polimerasa, 1X Buffer (Tris-HCl 10 mM pH: 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, 200 mM de cada dGTP, dATP, dTTP y dCTP). Después de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, se realizaba 30 ciclos de amplificación con el siguiente perfil:

Desnaturalización	94°C	15 segundos
Hibridación	45°C/50°C	15 segundos
Extensión	72°C	15 segundos

La reacción se completaba con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Mezcla de reacción para un volumen final de 20 µl:

Buffer 10X con MgCl ₂ 15 mM	2 µl
Mezcla de nucleótidos 10 mM	1,6 µl
Cebador Foward 132 ng/µl	1 µl
Cebador Reverse 132 ng/µl	1 µl
Taq Polimerasa 5U/µl	0,2 µl
H ₂ O destilada	9,2 µl
DNA 20mg/µl	5 µl

Para los exones 1, 2, 5, 6, 7, 9 y 11 se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

	94°C	3 minutos
30 ciclos	{	94°C 5 segundos
		45°C 15 segundos
		72°C 15 segundos
	72°C	10 minutos

Para los exones 3, 8, 10 y 12 se utilizó el mismo programa con una temperatura de hibridación de 50°C.

Para el exón 4 se utilizó el siguiente programa:

	95°C	5 minutos
35 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 56^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	30 segundos
		60 segundos
		60 segundos
	72°C	10 minutos

La reacción se completaba con una extensión final de 10 minutos a 72°C y se realizó en termociclador Eppendorf (Modelo Personal cycler).

3.3.2 - ANÁLISIS DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Los fragmentos amplificados en la PCR inicial fueron separados en electroforesis horizontal en un gel de agarosa a 1% en tampón TBE 1%, corriendo en paralelo un marcador de peso molecular de 100 pb.

3.3.3 - ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Preparar el gel de agarosa a la concentración deseada en función de los fragmentos de DNA a separar, en tampón TBE 1X. La agarosa se disuelve mediante calor y se pone en un molde con los extremos sellados y un peine para formar los pocillos.

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 0,560 g de agarosa .
- Disolver en 56 ml de TBE 1X mediante calor, depositar la solución en un molde y dejar solidificar.

- Eliminar el sellado y depositar el gel en una cubeta de electroforesis horizontal con TBE 1X.

- Sacar el peine.

- Añadir 2 µl de sacarosa al 40% a 8 µl de muestra.

- Preparar el marcador de peso molecular: 2 µl del marcador más 2 µl de sacarosa 40% y 6 µl de TE 10:1.

- Cargar la muestra y el marcador de peso molecular en los pocillos.

- Cargar 3 µl de colorante de xilencianol más azul de bromofenol en un pocillo, para controlar el movimiento de los fragmentos.

La electroforesis se realiza en TBE 1X a 100 voltios durante aproximadamente 40 minutos.

3.3.4 - TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO

Terminada la electroforesis depositar el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) y exponer a la luz ultra violeta para visualizar las bandas. Como una segunda opción se puede añadir el bromuro de etidio al TBE o al gel de agarosa antes de volcarlo en el molde.

Los 12 µl restantes de la PCR fueron submetidos a un proceso de purificación para su posterior utilización en la PCR de secuenciación.

3.3.5 - PURIFICACIÓN DE DNA

Antes de realizar la secuenciación el producto de la PCR inicial fue sometido a un proceso de purificación para eliminar posibles restos de dNTPS, cebadores, tampón o cualquier otra sustancia que no haya sido utilizada en la reacción y que pudiera interferir en el proceso de la PCR de secuenciación. Para ello, hemos utilizado el "kit" co

EXON	SECUENCIA CEBADOR	TAMAÑO PRODUCTO (pb)
Krit 1 - F	GAGCGGATAAAAACTAAT	205
Krit 1 - R	GAGCTAAAATTGATTCAA	205
Krit 2 - F	GCTCTTAATGGGTTTTTG	183
Krit 2 - R	AGCAATGTGGAGTAAAAC	183
Krit 3a - F	GTCCTGTTGTATTTTCA	275
Krit 3a - R	TTTGGAATGAGAACAGTC	275
Krit 4 - F	GTTGTTGTTTTTTGTTTG	194
Krit 4 - R	ACCTGGAAAATAACTTAC	194
Krit 5 - F	ATGTAATGCCTTTTTTCC	181
Krit 5 - R	ATGCCTGGCTCTAACTAT	181
Krit 6 - F	TTGTTAGATTGTGATGTA	238
Krit 6b - R	AACATAATAAAAACTTTC	238
Krit 6S - F	CGAATATACAGAATGGATG	166
Krit 7s - F	TATTCAGTACAGAAGTGC	205
Krit 7s - R	AATTTCTGCCTCTAGTGC	205
Krit 8 - F	TGTAGCCTAATAACCAAA	242
Krit 8 - R	AGCATAGCACAAGACCAT	242
Krit 9 - F	AATTACGTTACTGAAAGC	213
Krit 9 - R	TGTCTTTTCATTTCTAT	213
Krit 10b - F	ATATTTACAAAGGCAAGC	297
Krit 10b - R	TGACATGATTGGTAAAAA	297
Krit 11 - F	GGTGAAGTTTTTAATATG	205
Krit 11 - R	CAATAGTTTATGAAGTCC	205
Krit 12a - F	AATAGATAGGGAACTGCC	184
Krit 12a - R	GTGGCTTGAGTAACAGTT	184

Fig. 4: Secuencia de los cebadores utilizados en las PCRs de los exones 1 al 12 del gen CCM1 (S. Laberge, 1999; T. Sahoo, 1999).

mercial Qiaquick Spin de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

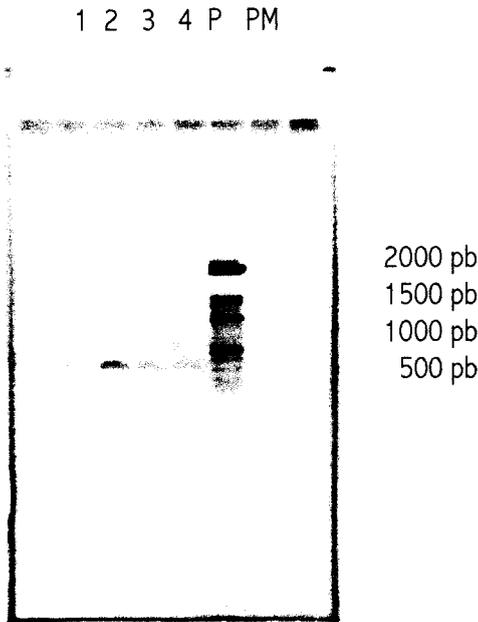


Fig. 5: Producto de PCR del exón 3 de distintos individuos en gel de agarosa al 1%.

PROCEDIMIENTO:

- Añadir 24 ml de etanol 96° al frasco PE.
- Añadir 5 volúmenes de PB al tubo de PCR. Mezclar bien.
- Identificar las columnas.
- Transferir la mezcla producto de PCR + PB a la membrana.
- Centrifugar 30–60 segundos a 1.300 r.p.m.
- Desechar el líquido que pasa a través de la membrana y volver a montar la membrana.
- Añadir 0,75 ml de PE a la membrana para lavar.
- Centrifugar 30–60 segundos a 1.300 r.p.m.

- Desechar el líquido que pasa a través de la membrana y volver a centrifugar por un período adicional de 1 minuto.
- Montar las columnas en tubo eppendorf de 1,5 ml.
- Añadir 30 µl de EB en el centro de la membrana.
- Centrifugar 30 – 60 segundos a 1.300 r.p.m.
- Etiquetar y guardar en frío.

3.4 - SSCP - POLIMORFISMO DE CONFORMACIÓN DE HEBRA SIMPLE

El SSCP - "*Single Strand Conformation Polymorphisms*" - es una técnica para la detección de mutaciones conocidas y no conocidas en productos de PCR, DNA y RNA. Se fundamenta en la variación de la movilidad electroforética en geles de acrilamida no desnaturizante de las moléculas de DNA o RNA.

Los ácidos nucleicos adoptan una conformación que varía según su secuencia y el cambio de una única base puede producir una alteración en esta estructura y por lo tanto un cambio en su movilidad electroforética.

Entre 70% y 90% de mutaciones conocidas y desconocidas pueden ser detectadas en fragmentos cortos. El producto de PCR de doble hebra es desnaturizado a hebra simple.

Cada hebra asume una conformación basada en el apareamiento interno que depende de su secuencia y de las condiciones de temperatura y fuerza iónica. Esto permite distinguir un DNA silvestre de un DNA mutado o diferentes alelos. Estas hebras son separadas en electroforesis en gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturizantes. La sustitución de una única base puede causar un cambio en la con-

formación de la hebra comparada con el tipo silvestre y cambiar su movilidad electroforética. Esto significa que un cambio en la separación patrón comparado con el tipo silvestre indica una mutación. Para detectar el máximo número de mutaciones puntuales en cada fragmento mutado puede ser necesario la optimización individual de las condiciones de electroforéticas. Lo normal es correr las muestras bajo por lo menos dos condiciones diferentes. El rango de temperatura puede variar entre 5 y 30°C, dependiendo del fragmento en estudio.

3.4.1 - DETECCIÓN DE POLIMORFISMO EN EL LOCUS CCM1

Inicialmente se ha hecho un "screening" por SSCP en todos los pacientes enfermos para determinar el exón mutado. Para ello se realizó una PCR en las condiciones descritas anteriormente y para separar las hebras se realizó una electroforesis en un minigel de acrilamida. Una vez encontrado este exón se realizó la secuenciación automática para identificar la mutación.

PROCEDIMIENTO:

- Añadir 10 µl de buffer de carga con formamida a 95%, azul de bromofenol y xilencianol a 0,05% y NaOH 10 mM a 10 µl del producto de PCR.
- Desnaturalizar a 95°C por 5 minutos y meter inmediatamente en hielo.
- Cargar 20 µl en un minigel de acrilamida.
- Realizar la electroforesis en las condiciones adecuadas.
- Teñir el gel con colorante SYBR Gold hasta que las bandas se hagan visibles en luz UV.

3.4.2 - ELECTROFORESIS EN MINIGELES DE ACRILAMIDA

Después de la PCR inicial se realiza la separación de las hebras mediante una electroforesis vertical en minigeles de acrilamida. Antes de preparar los gels, los cristales deben ser lavados con detergente y agua en abundancia. Limpiar con alcohol y secar con papel absorbente. Montar los cristales uniendo uno al otro con el auxilio de unas pinzas, colocando entre ellos un separador. Proceder a la preparación del gel. Para cada cristal se prepara 8-10 ml de gel de la siguiente forma:

PROCEDIMIENTO:

- 10 ml de la solución acrilamida/bisacrilamida.
- Añadir 70 µl de PSA al 10% y 5 µl de TEMED.
- Mezclar bien, verter entre los cristales. Encajar el peine y dejar gelificar por unos 30 minutos.

Realizar una pre-electroforesis de aproximadamente 15 minutos para limpiar y estabilizar el gel.

Debido a que las condiciones de temperatura y fuerza iónica afectan el apareamiento interno de la secuencia, las electroforesis en minigeles de acrilamida fueron realizadas en distintas condiciones de concentración y temperatura, en presencia y ausencia de glicerol al 10% y voltaje, como se detalla a continuación:

- Acrilamida al 6%, urea 7M, 100 voltios a temperatura ambiente.
- Acrilamida al 6%, urea 7mM, 100 voltios a 10°C.
- Acrilamida al 6%, 100 voltios a temperatura ambiente.
-

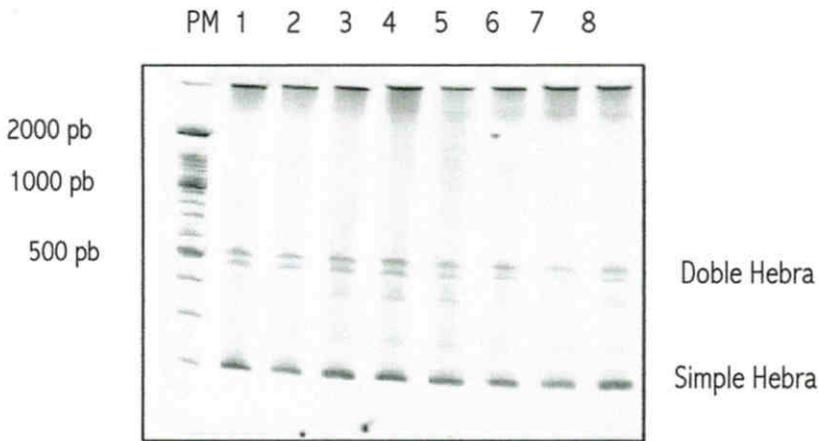


Fig. 6: SSCP del exón 1 del gen CCM1 de distintos individuos en minigel de acrilamida al 6%. Se carece de control positivo.

- Acrilamida al 6%, 100 voltios a 10°C.
- Acrilamida al 10% con glicerol al 10%, 100 voltios a 10°C.

para visualizar las bandas amplificadas mediante PCR.

3.4.3 - TINCIÓN CON SYBR GOLD

Este colorante fluorescente posee una sensibilidad 25 a 100 veces mayor que el bromuro de etidio, que permite también la detección de hebras simples.

Se prepara una solución a 1X en tampón TBE pH 7 donde se sumerge el gel hasta que las bandas se hagan visibles en luz ultra violeta utilizando un transiluminador o el captador de imágenes Molecular Analyst Software (Versión 1,5 BIO-RAD Laboratories)

4 - RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

El fenómeno de restricción fue explicado por Arder y Dussoix en 1962 que postularon que ciertas bacterias contenían endonucleasas capaces de romper el DNA desprotegido y otras poseían un sistema de modificación para la protección de su DNA. Las enzimas de restricción reconocen sitios con secuencia específica de diferentes tamaños y de diferentes composiciones de base a lo largo del DNA. Lo rompen en este sitio generando fragmentos de DNA de diferentes tamaños.

4.1 - DIGESTIÓN DEL DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Después de detectar las mutaciones mediante el análisis del producto de la PCR por SSCP, el paso siguiente fue la búsqueda de una endonucleasa de restricción capaz de reconocer la secuencia mutada.

En el exón III la mutación consistía de la transición de dos pares de bases CC/AT en los aminoácidos 85 y 86. Una arginina – CAC, era sustituida por una glutamina – CAA y una arginina – CGA por un codón de terminación – TGA.

Para este exón no fue posible encontrar ninguna enzima de restricción capaz de reconocer la secuencia mutada.

En el exón IV se identificó la deleción de un par de bases CA en la posición 519. Esta mutación cambia la pauta de lectura de la secuencia, produciendo un cambio de 11 aminoácidos y termina con la formación de un codón de terminación en la posición 155.

Se procedió a la búsqueda de una endonucleasa de restricción capaz de reconocer la secuencia, que resultó ser la enzima *Rsa I*, que posee como sitio de restricción la secuencia GT↓AC.

En el estudio por SSCP del exón VI se encontró una mutación que consistía de una transición 742C→ T. La búsqueda de una enzima de restricción capaz de reconocer esta secuencia, ya sea la normal o la mutada, manualmente y a través de programas de ordenador, no resultó positiva.

En el estudio del exón X se identificó la inserción de una A en el nucleótico 1282. Esta mutación cambia el aminoácido TAT a TAG, un codón de terminación en el aminoácido 453. Se procedió a la búsqueda de una endonucleasa de restricción capaz de reconocer la secuencia mutada, que resultó ser la enzima *Mse I*, que posee como sitio de restricción la secuencia T↓TAA.

4.2 - DIGESTIÓN CON LA ENZIMA *Mse I*

Mezcla de restricción:

Buffer específico	2 µl
Enzima de Restricción <i>Mse I</i>	0,2 µl
H ₂ O destilada	2,8 µl

Añadir 15 µl del producto de PCR a la mezcla de restricción e incubar toda la noche a 37°C.

El producto de PCR del exón VI no digerido consiste de un fragmento de 238 pb y tras la digestión con *Mse I* se divide en dos fragmentos de 210 y 28 pb (fig. 25).

Se separan los fragmentos de DNA obtenidos por electroforesis en gel de acrilamida al 10% en tampón TBE 1X. Se carga 20 µl de muestra con 3 µl de colorante conteniendo sacarosa al 40% con azul de bromofenol y xilencianol, corriendo en paralelo un peso molecular que permitirá conocer el tamaño de los fragmentos.

La electroforesis se realiza a 150 voltios durante una hora. Terminada la electroforesis desmontar la cubeta cuidadosamente. Sacar el gel y teñirlo en SYBR Gold.

4.3 – DIGESTIÓN DEL DNA CON LA ENZIMA *Rsa I*

Mezcla de reacción:

Buffer específico	2 µl
Enzima de restricción <i>RsaI</i>	0,2 µl
H ₂ O destilada	5,3 µl

Añadir 12,5 µl del producto de PCR a la mezcla de restricción e incubar toda la noche a 37°C.

El producto de la PCR del exón IV no digerido consiste de un fragmento de 286 pb y tras la digestión con *RsaI* se divide en dos fragmentos de 192 y 94 pb.

Se separan los fragmentos de DNA obtenidos por electroforesis en gel de acrilamida al 10% en TBE 1X. Se carga 20 µl de muestra con 4 µl de colorante conteniendo sacaros al 40% con azul de bromofenol y xilencianol, corriendo en paralelo un peso molecular que permitirá conocer el tamaño de los fragmentos.

La electroforesis se realiza a 150 voltios durante una hora. Terminada la electroforesis, desmontar cuidadosamente la cubeta. Sacar el gel y teñirlo en SYBR Gold.

Las mutaciones detectadas en los exones III y VI no eran reconocidas por ninguna enzima de restricción.

5 - SECUENCIACION DEL LOCUS CCM1

El método de secuenciación enzimática desarrollado por Sanger en 1977 ha sido el método de elección para nuestro trabajo. En este método, denominado de los dideoxi-nucleótidos, un oligonucleótido complementario al DNA en las proximidades de la secuencia de interés, se hibrida y se extiende con DNA polimerasa que va añadiendo nucleótido complementarios. La reacción de extensión se realiza en cuatro tubos por separado, cada uno correspondiendo a un nucleótido G, A, T, C. En cada tubo se ponen el DNA para secuenciar, el oligonucleótido, los cuatro dNTP's (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), la DNA polimerasa y el tampón. Cada tubo contiene un dideoxido diferencial que posee la característica de que a polimerasa puede incorporarlos a la secuencia pero no puede extenderlos porque les falta el grupo OH en la posición 3'. Esta característica convierte cada ddNTP en un nucleótido "stop", de modo que al entrar una copia sintetizada por la DNA polimerasa, allí se acaba el crecimiento de la cadena y se libera un fragmento que termina con el ddNTP incorporado. Terminada la reacción los fragmentos se separan en un gel de acrilamida al 6% y urea 7 M. Cada fragmento aparece como una banda, que difiere de la siguiente en un solo nucleótido.

EXÓN III

Secuencia normal - TTT CCT CTC CAC CGA AGC GCC TGT GAA
Secuencia mutada - TTT CCT CTC CAA TGA AGC GCC TGT GAA

Fig. 7 : - Secuencia normal y secuencia mutada del exón 3

EXÓN IV

Secuencia normal - ATA GTA CAG ATT CTC CTA
Secuencia mutada - ATA GTA GAT TCT CCT A

Fig.8 : Secuencia normal y secuencia mutada del exón 4

EXÓN VI

Secuencia normal -CGT CTC TCT CAA GAA ACT CAG CAA TAT TTC ACT ATA TGG
ATT TGT TCA GAA AAC CTC AGC CTT CAA CTC AAA CCA TAT CAT AAA CCC TTG

Secuencia mutada -CGT CTC TCA AGA AAC TCA GCA ATA TTT CAC TAT ATG GAT
TTG TTC AGA AAA ACC TCA GCC TTC A AC TCA AAC CAT ATC ATA AAC CCT TGC
AAC ATG

Fig 10: Secuencia normal y secuencia mutada del exón 6

EXÓN X

Secuencia normal - ACT TAT GGA GCA GCA TTT
Secuencia mutada - ACT TAA TGG AGC AGC ATT T

Fig. 11: Secuencia normal y secuencia mutada del exón 10



5.1 - SECUENCIACION AUTO-MÁTICA

Esta técnica se basa en la secuenciación enzimática y se realiza mediante un secuenciador. Es un sistema de electroforesis fuerte y versátil que automatiza la separación de los fragmentos de DNA y la determinación de bases resultantes en la secuenciación.

Los cebadores utilizados están marcados en su extremo 5' con un IRD800. Es un sistema de detección de bandas de DNA visibles en fluorescencia con IRD, que está diseñado para funcionar con rayo láser, excitándose a 680 y 785 nm. El IRD800 posee grupos de carbodimida (CDI) activos, que se ligan covalentemente a la timina y a la guanina en ácidos nucleicos de simple y doble cadena.

Cuando se termina la PCR de secuenciación, todos aquellos fragmentos que hayan incorporado el mismo dideoxinucleótido presentarán el mismo color. Posteriormente las cuatro reacciones son cargadas en un gel de acrilamida al 6%. Cada banda observada corresponde a un fragmento.

La electroforesis se realiza de forma continua en un solo carril. El color de cada banda es seleccionado previamente por el operador y cada color corresponderá al dideoxido incorporado según sea G, A, T o C y es determinado cuando el IRD800 es excitado por un rayo láser situado en la base de aparato de secuenciación, produciendo una señal que es recibida por un fotomultiplicador y transmitida a un ordenador. El análisis de las señales recibidas por el ordenador permite establecer con gran precisión la secuencia del fragmento en estudio,

incluso cuando hay cierta ambigüedad.

Una alternativa a este proceso consiste en marcar los dideoxinucleótidos en lugar de los cebadores.

5.2 - PCR DE SECUENCIACION

La secuenciación cíclica de los fragmentos fue hecha con el "kit" de secuenciación de Epicentre Technologies (Madison, WI, USA).

Para ello se utilizó un cebador marcado con IRD 800, una DNA polimerasa termoestable, un programa de secuenciación cíclica y un equipo de detección y análisis automático LI-COR. Este sistema detecta y analiza automáticamente la secuencia de fragmentos de DNA, pudiéndose visualizar directamente las bandas en la pantalla.

El DNA amplificado por PCR era purificado por Quiagen y su concentración era estimada en electroforesis de gel de agarosa a 1% en TBE 1X y tinción en bromuro de etidio de una pequeña alícuota de este DNA. Si la cantidad de DNA estimada era suficiente se purificaba y se procedía a la reacción de secuenciación.

En un tubo "eppendorf" de 0,2 ml poner 10 µl del producto de la PCR inicial purificados, 1 µl del cebador correspondiente a 1µM marcado con IRD 800, 1 µl de DNA polimerasa P.E, 2,5 µl de "buffer" de secuenciación 10X y 3,5 µl de agua destilada.

A cuatro tubo marcados con su nucleótido correspondiente le añadía 4 µl de esta mezcla más 2 µl del nucleótido. Se le daba un "spin" para bajar los reactivos al fondo del tubo y se procedía el siguiente programa en un termociclador Eppendorf (Modelo Personal Cycler).

Tabla 1: PCR de secuenciación

INDIVIDUOS	A				B				C				D			
TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DNA 10 µl	PCR Primaria				PCR Primaria				PCR Primaria (control)				PCR Primaria (control)			
Cebador 1 µM	F-IRD 800 1 µl				R-IRD 800 1 µl				F-IRD 800 1 µl				R-IRD 800 1 µl			
Taq polim. (P.E)	1 µl				1 µl				1 µl				1 µl			
Buffer 10X	2,5 µl				2,5 µl				2,5 µl				2,5 µl			
H ₂ O dest.	3,5 µl				3,5 µl				3,5 µl				3,5 µl			
Vol. total	18 µl				18 µl				18 µl				18 µl			
Distribuir	4 µl por tubo				4 µl por tubo				4 µl por tubo				4 µl por tubo			
ddNTP	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
		1	1	1		1	1	1		1	1	1		1	1	1
Nucleótidos	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C

- Mezcla de reacción para un volumen final de 18 µl:

Producto PCR inicial	10 µl
Cebador forward 132 ng/µl	1 µl
Cebador Reverse 132 ng/µl.	1 µl
Tampón de secuenciación 10X	2,5 µl
Taq DNA polimerasa	1 µl
H ₂ O destilada	3,5 µl

Distribuir 4 µl de la mezcla en cada tubo identificado G, A, T, C.

Añadir 2 µl del dideoxinu-
cleótido correspondiente y ejecutar en
el termociclador el siguiente progra-
ma:

	95°C	5 minutos
30 ciclos	94°C	15 segundos
	45°C	15 segundos
	72°C	15 segundos

Añadir 3 µl de tampón de
carga a cada tubo conteniendo 95%
de formamida, 0,1% de azul de

bromofenol, 0,1% de xilencianol y
10mM de EDTA pH 7,6.

Dar un "spin" para llevar los
reactivos al fondo del tubo. Calentar los
tubos 5 minutos a 70°C y cargar 1,5 µl
en cada pocillo.

El producto de la reacción pue-
de ser guardado a -20°C por más de una
semana.

Para los exones 3, 8, 10 y 12 se
utilizó el mismo programa con una
temperatura de hibridación de 50°C.

5.3 - CEBADORES MARCADOS CON IRD800

Para realizar la secuenciación se
utilizaron cebadores marcados con
IRD800 sintetizados por Roche Diagnos-
tics (Barcelona) y TIB - Molbiol synthe-
selabor (Berlin). Todos los cebadores
utilizados para las reacciones de secu-
enciación correspondían a los mismos
utilizados en PCR inicial marcados con
IRD800, a excepción del exón 6, en lo
cual el cebador sentido correspondía a un
cebador interno.

Durante la reacción enzimática el cebador marcado con IRD800 se hibrida al DNA y el ensamblado es elongado enzimáticamente. La síntesis del nuevo DNA tiene lugar en presencia de las cuatro bases (dNTPs). Los fragmentos de DNA entonces generados en la reacción de secuenciación están marcados IRD800 sensible al infrarrojo.

La proporción de DNA y cebador es importante para la obtención de resultados consistentes. Como regla general 1 - 2 pmoles de DNA son utilizados para 1 - 4 pmoles de cebador.

5.4 - ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA DESNATURALIZANTE

El alto poder de resolución de los geles de acrilamida permite la separación de fragmentos de DNA que se difieren entre sí en un solo par de bases. Cuando se añade la bisacrilamida se inicia una reacción para formar el gel. Los monómeros de acrilamida se polimerizan en cadenas largas en presencia de radicales libres que son aportados por el persulfato amónico y estabilizados por el TEMED. La longitud de las cadenas y el grado de unión entre ellas determina la porosidad de las cadenas.

El aparato de electroforesis está compuesto de 2 cristales, 2 separadores y un peine, con espesura de 0,2 a 0,4 mm. Antes del montaje del gel se debe limpiar cuidadosamente los cristales con detergente y agua en abundancia. Secar y limpiar con alcohol.

Secar completamente con papel y proceder al montaje. Para esto unir los dos cristales, colocando entre ellos un separador de 0,4 mm y cerrar las extremidades con las pinzas.

Mezclar:

- 70 ml de acrilamida/bisacrilamida 19:1 (SoluGel 19:1 ULTRA PURA. Pronadisa) al 6%, urea 7M, TBE 1X (Tris-borato, EDTA Ph 8,3).
- 480 µl de PSA (Amonio Persulfato) al 10%.
- 70 µl de TEMED.
- Verter entre dos cristales de 40 X 25 X 0,5 cm, con el cuidado de no formar burbujas.
- Encajar el peine en la parte superior y dejar polimerizar por una hora.
- Limpiar la parte exterior y encajar el bloque en el secuenciador automático.
- Llenar las cubetas superior e inferior con aproximadamente 500 y 150 ml de TBE 1X respectivamente.
- Limpiar cuidadosamente cada pocillo.
- Cerrar las cubetas y conectar el dispositivo de alto voltaje.

Realizar una pre-electroforesis a 1500 voltios por aproximadamente 30-40 minutos para limpiar los carriles y estabilizar la temperatura del gel. Mientras tanto ajustar el "focus" y el "auto gain".

Pasado el tiempo de la pre-electroforesis, desconectar el aparato y cargar en cada pocillo 1,5 µl de muestras previamente desnaturalizadas durante 5 minutos a 70°C. Las muestras deben ser cargadas en un orden exacto y definido en función del software para el análisis automático. Cerrar las cubetas y conectar el dispositivo de alto voltaje.

Las bandas empezarán a aparecer en una hora o una hora y media. La primera fluorescencia que será detectada es el "*primer front*". Este es el exceso de cebador marcado que no se unió al DNA, que son, además los primeros fragmentos a migrar a través del gel y a pasar por el detector. Luego las bandas de los fragmentos de DNA empiezan a salir por orden de tamaño.

Dejar correr toda la noche. Al día siguiente desconectar el aparato, limpiar los cristales y realizar el análisis automático.

5.5 - CAPTACIÓN DE IMÁGENES

El sistema utiliza la tecnología del infrarrojo para detectar fragmentos de DNA. El láser está combinado con un detector sólido en un pequeño ensamblado (láser microscopio) que puede ser manipulado fácilmente para enfocar precisamente el centro del gel. Otra ventaja del sistema infrarrojo es que los cristales y la acrilamida producen muy poca fluorescencia que interfiera con el infrarrojo.

Los datos son colectados por el ordenador mientras las bandas migran a través del gel, haciendo de la secuenciación un proceso continuo. El sistema LI-COR produce los datos tan rápidos como sean detectados en la pantalla, permitiendo una evaluación rápida de la calidad del ensayo.

Además, evita la utilización de radioactividad, la manipulación del gel y el tiempo se reduce considerablemente.

Pasado el tiempo de la pre-electroforesis, desconectar el aparato y cargar en cada pocillo 1,5 μ l de muestras previamente desnaturalizadas durante 5 minutos a 70°C. Las muestras deben ser cargadas en un orden exacto y definido en función del software para el análisis automático. Cerrar las cubetas y conectar el dispositivo de alto voltaje.

Las bandas empezarán a aparecer en una hora o una hora y media. La primera fluorescencia que será detectada es el "*primer front*". Este es el exceso de cebador marcado que no se unió al DNA, que son, además los primeros fragmentos a migrar a través del gel y a pasar por el detector. Luego las bandas de los fragmentos de DNA empiezan a salir por orden de tamaño.

Dejar correr toda la noche. Al día siguiente desconectar el aparato, limpiar los cristales y realizar el análisis automático.

5.6 - FOCUS Y AUTO-GAIN

Ambos "*focus*" y "*auto gain*" afectan la calidad de la imagen. Se recomienda ajustar la sensibilidad del detector utilizando el auto gain y entonces realizar el auto focus.

El láser microscópico del aparato debe ser ajustado antes de cada captación de imagen. El focus compensa las diferencias de espesura del gel y de los cristales, asegurándonos que el scáner del microscopio está focalizado en el centro del gel, donde el DNA viaja durante la electroforesis, mejorando así la calidad de las imágenes captadas por el ordenador. Durante el enfoque el láser detecta la fluorescencia mientras se mueve a través de la placa de calor, de los cristales y del gel,

generando una curva de fluorescencia típica.

El "*auto gain*" calcula la cantidad de señal necesaria para ser captada por el detector de fluorescencia y producir una imagen.

5.7 - ANÁLISIS AUTOMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

El sistema LI-COR de secuenciación automática posee un programa que permite el análisis de las secuencias a través de las imágenes captadas por ordenador.

El "*.SCF File Creation Program*", desarrollado por Roger Staden y Simon Dear del Sanger Center, Cambridge, Inglaterra, convierte cada banda que aparece en la pantalla en un pico, cuyo color, será el color correspondiente a la base seleccionada definido anteriormente. Comparando las imágenes y picos de las secuencias de los fragmentos

del gen CCM1, de individuos enfermos que presentaron polimorfismos en el SSCP o sospechosos, con controles sanos hemos sido capaces de identificar las mutaciones existentes en estos fragmentos.

5.8 - AMBIGÜIDADES

Cuando se realiza el análisis de una secuencia en el modo automático el software define automáticamente todas las bases de la muestra que poseen una banda definida y esto está directamente relacionado con la calidad de la imagen. También corrige automáticamente el espacio entre las bandas y distorsionadas debido a la diferencia de temperatura en el gel. Durante la operación de secuenciación se puede encontrar bandas ambigüas en la imagen, que están marcadas con diferentes símbolos. Estas bandas están directamente relacionadas con la calidad de la imagen y con la presencia de mutaciones.



Fig. 13: Secuenciación automática de DNA. Imagen del gel de acrilamida producida en el secuenciador automático.

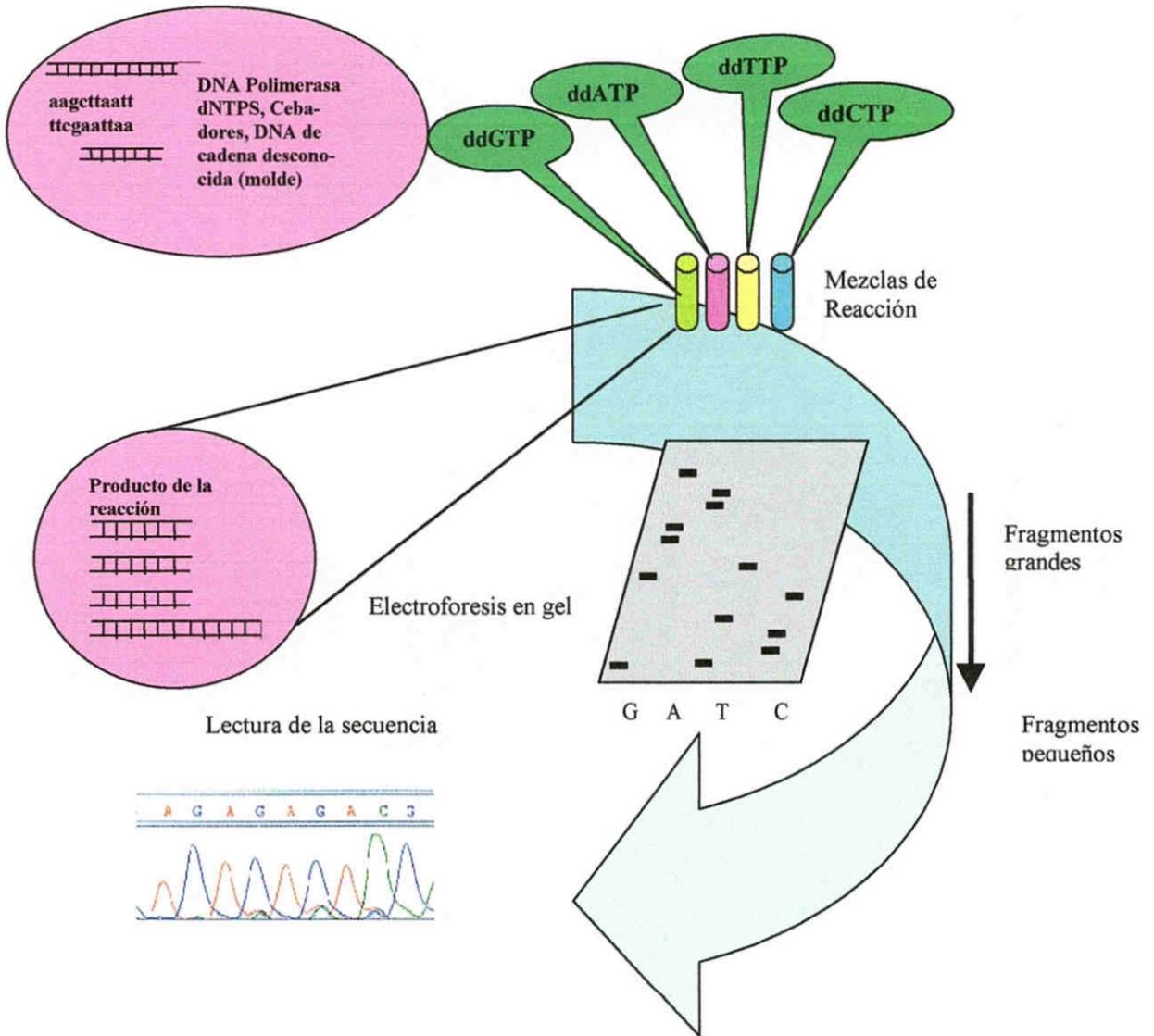


Fig.14 - Esquema representativo de la reacción de secuenciación de DNA por el método dideoxi. Se añade el cebador marcado al DNA de doble cadena de secuencia desconocida. La DNA polimerasa añade bases libres a la cadena simple a través del apareamiento complementario de las bases. Se realizan cuatro reacciones distintas con los cuatro dideoxinucleótidos correspondientes (ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP). Cuando un ddNTP se incorpora a la cadena se termina la elongación, produciendo fragmentos de tamaños variables que luego son separados por electroforesis.

6 - ÁRBOLES GENEALÓGICOS

El árbol genealógico ilustra las relaciones entre los miembros de una familia y muestra que miembros de una misma familia están o no afectados por una enfermedad genética.

El primer individuo diagnosticado de una enfermedad genética en una familia es denominado probando y suele estar señalado con una flecha.

Las diferentes generaciones de una familia representadas en un árbol genealógico están enumeradas por números romanos y por orden de nacimiento, de forma que I, II y III corres -

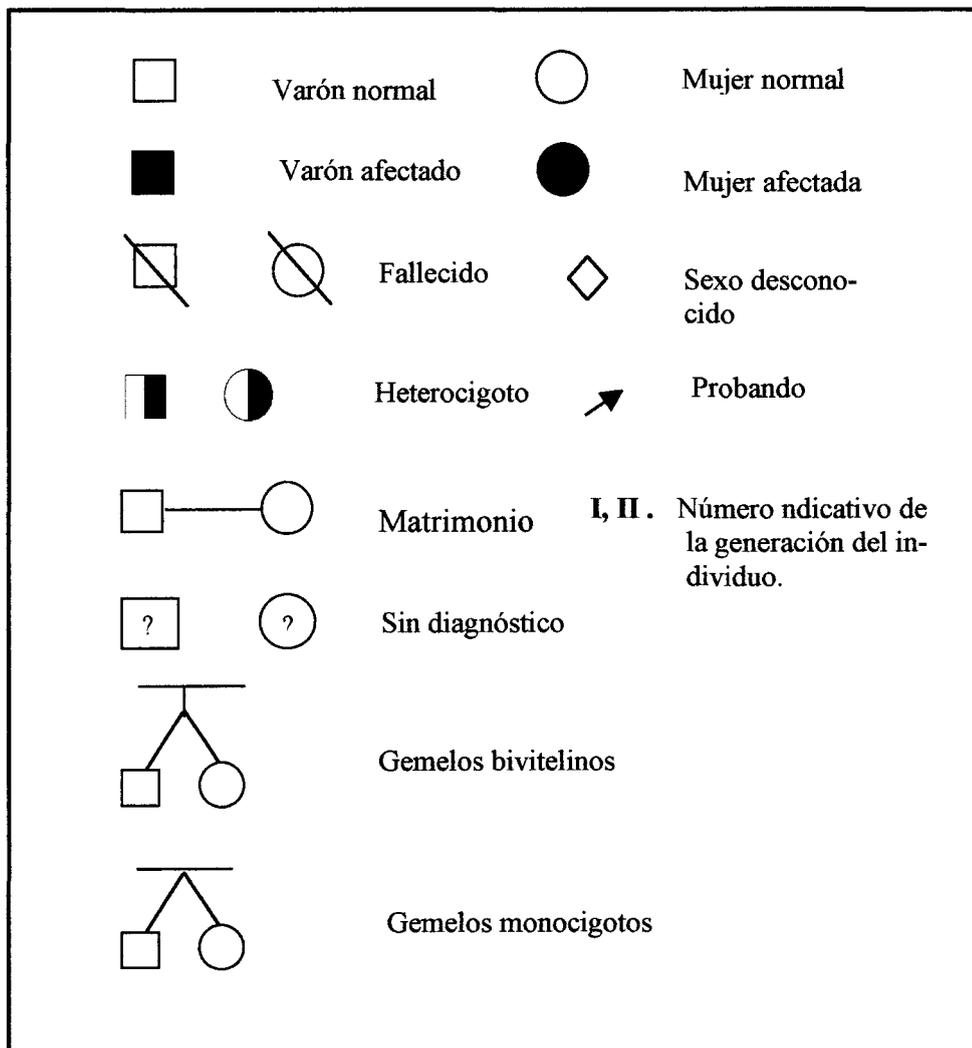
ponden a los miembros de primera, segunda y tercera generación, o sea, abuelos, padres e hijos respectivamente.

6.1 - SIMBOLOGÍA BÁSICA DEL ÁRBOL GENEALÓGICO

En este apartado están representadas las 84 familias portadoras de cavernomatosis cerebral familiar y esporádica incluidas en el estudio.

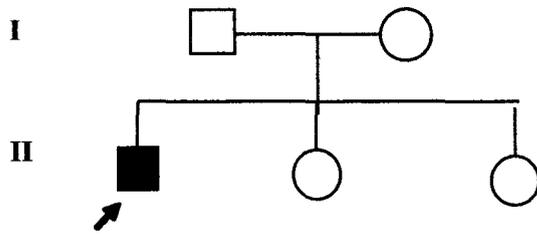
A cada familia fue asignado un número que correspondía también a su DNA.

Fig. 15: Símbolos utilizados en los árboles genealógicos

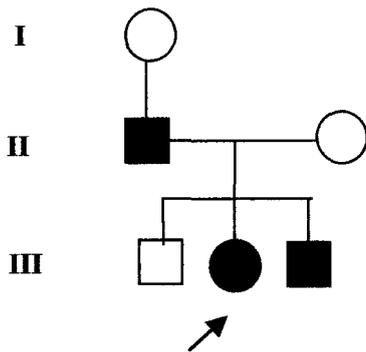


6.2 - ÁRBOLES GENEALÓGICOS DE LAS FAMILIAS EN ESTUDIO

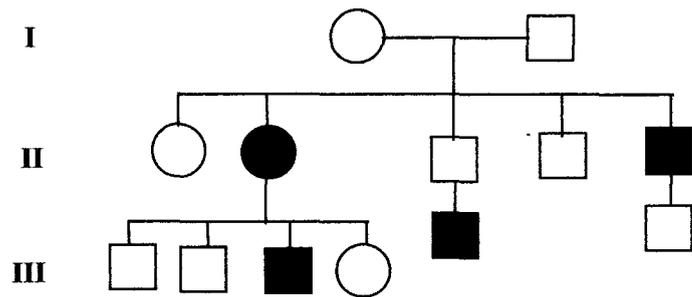
CV 1



CV 2



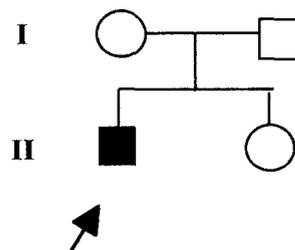
CV 3



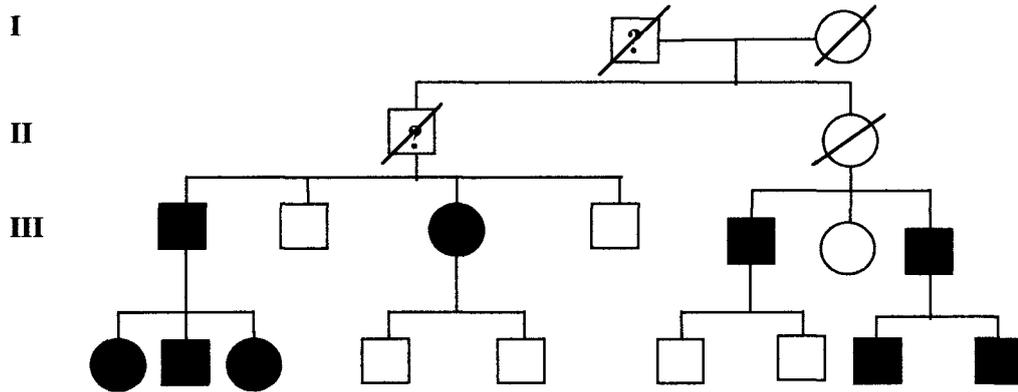
CV 5



CV 6



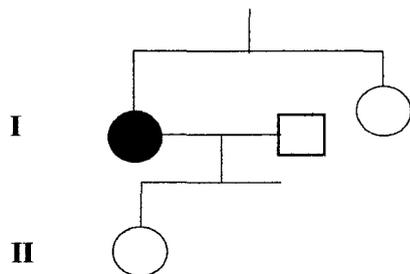
CV 4



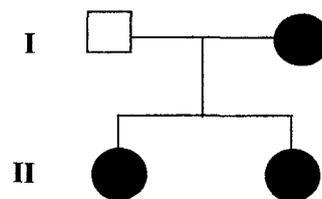
CV 7



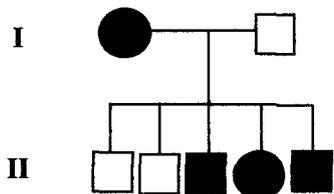
CV 8



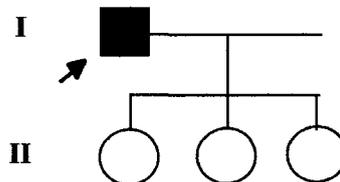
CV 9



CV 10



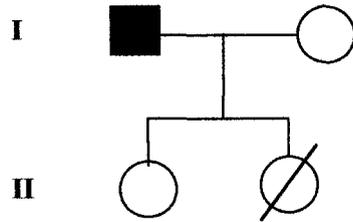
CV 11



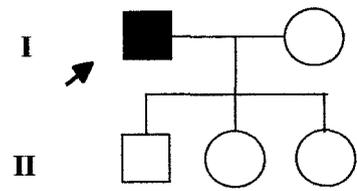
CV 12



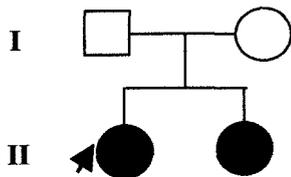
CV 13



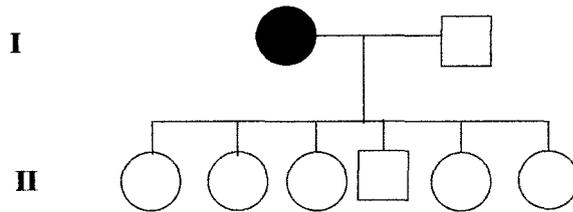
CV 14



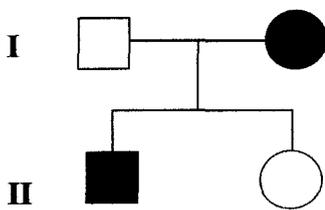
CV 15



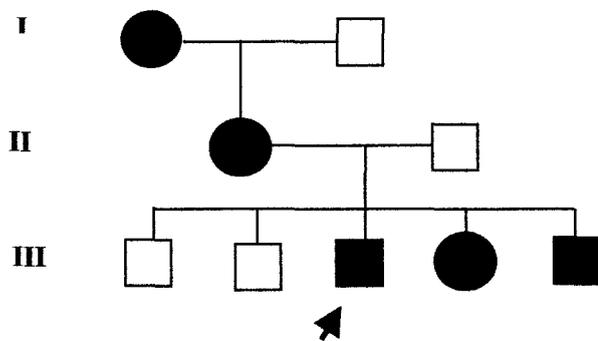
CV 16



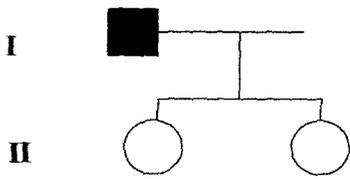
CV 17



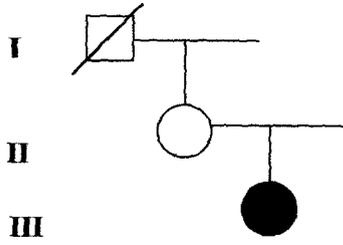
CV 18



CV 19



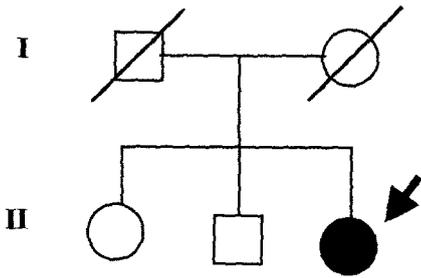
CV 20



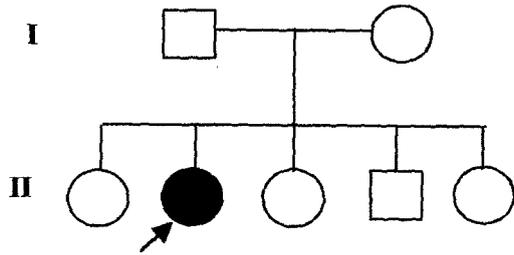
CV 22



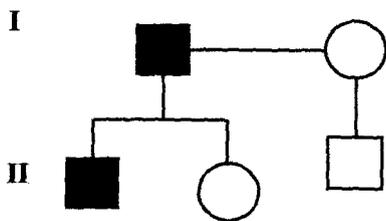
CV 21



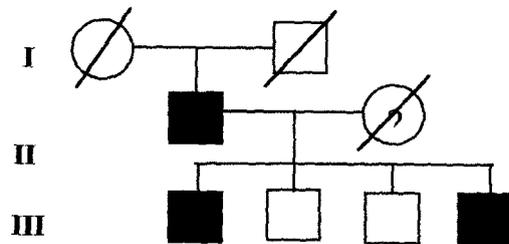
CV 23



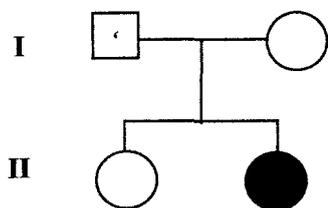
CV 24



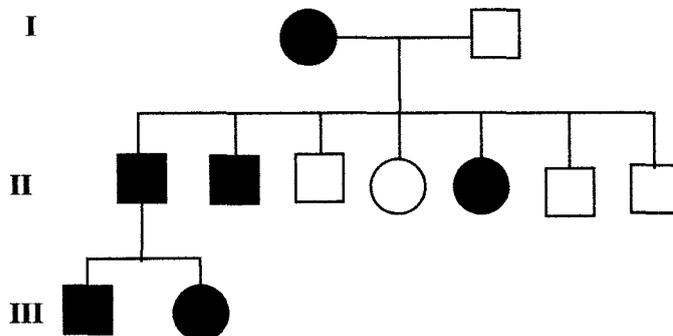
CV 25



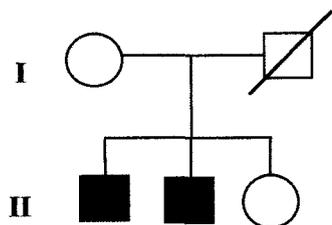
CV 27



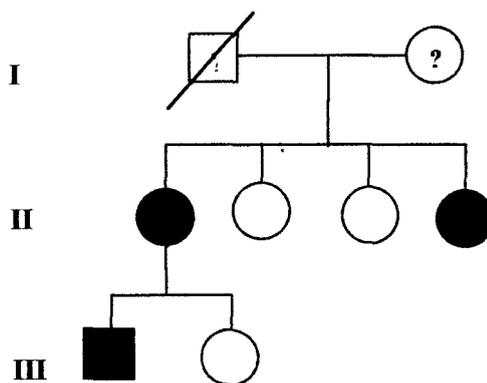
CV 28



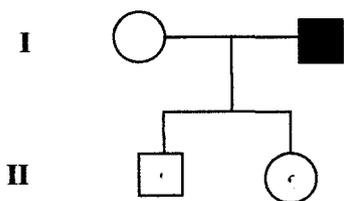
CV 29



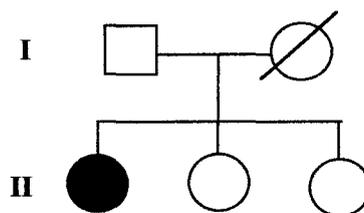
CV 30



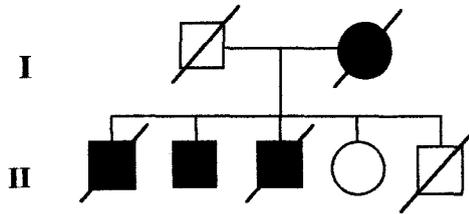
CV 31



CV 32



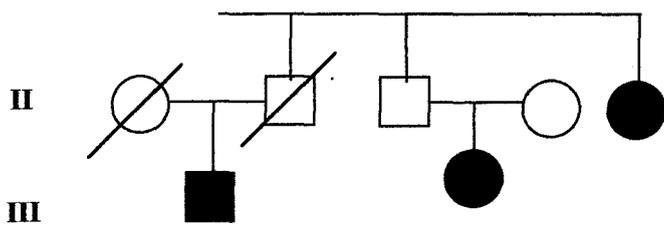
CV 33



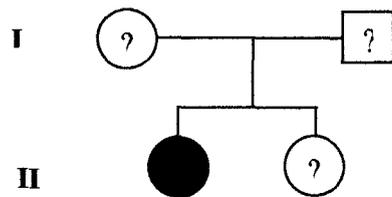
CV 34



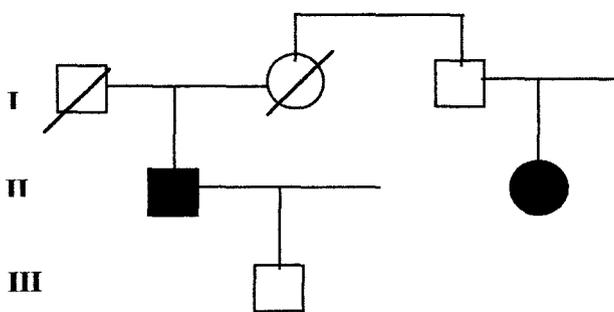
CV 35



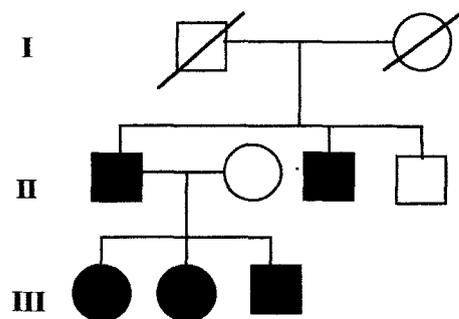
CV 36



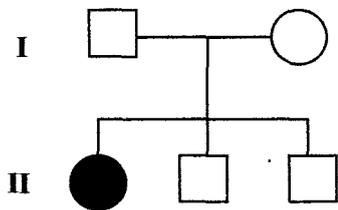
CV 37



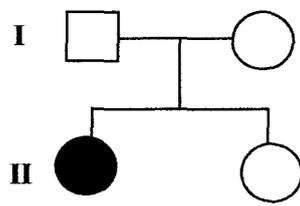
CV 38



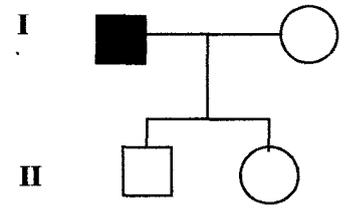
CV 39



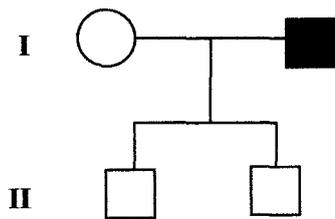
CV 40



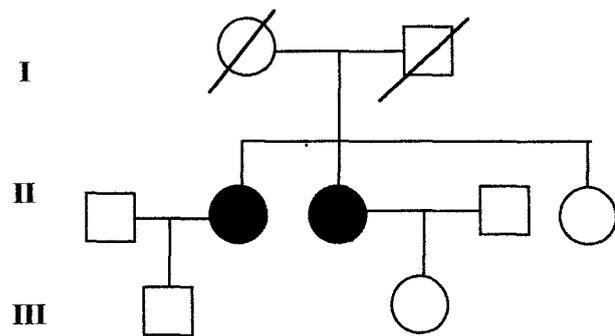
CV 41



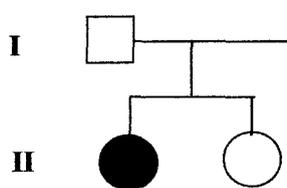
CV 42



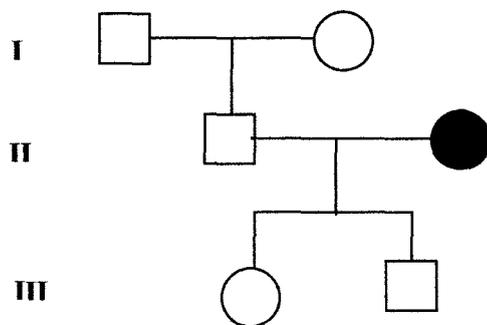
CV 43



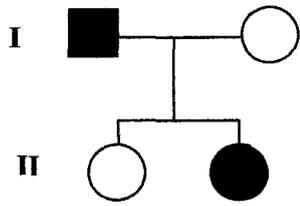
CV 44



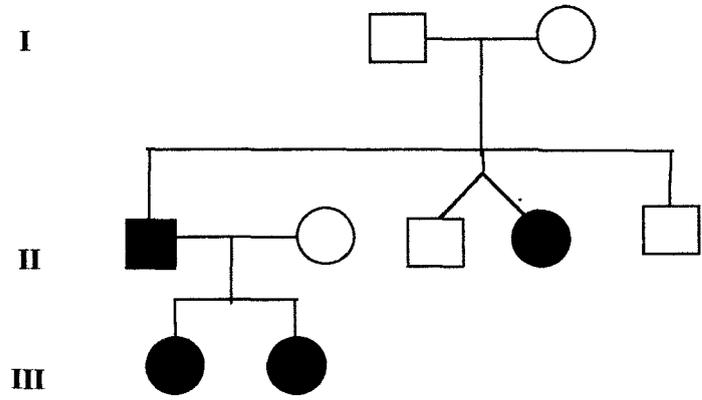
CV 45



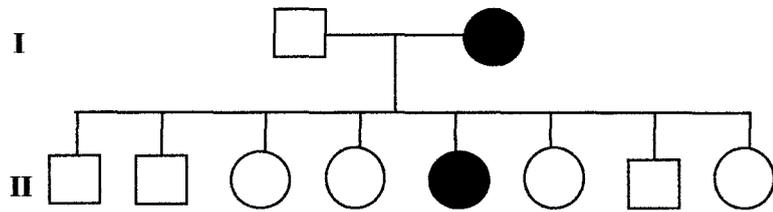
CV 46



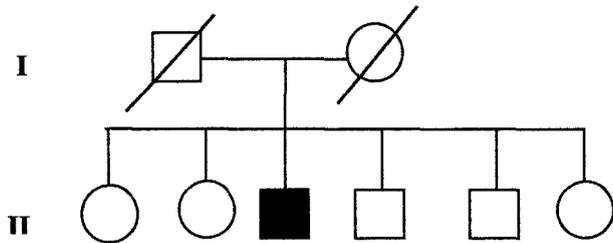
CV 50



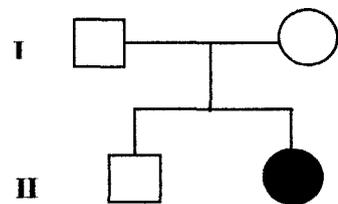
CV 51



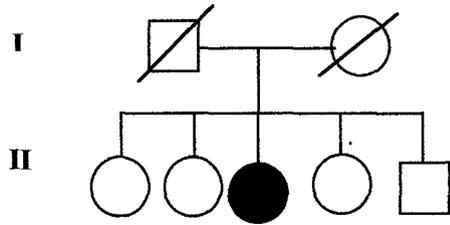
CV 52



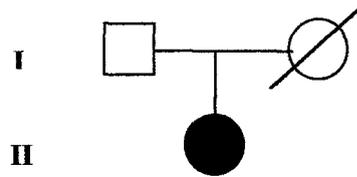
CV 53



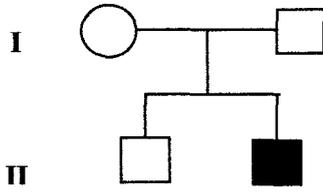
CV 54



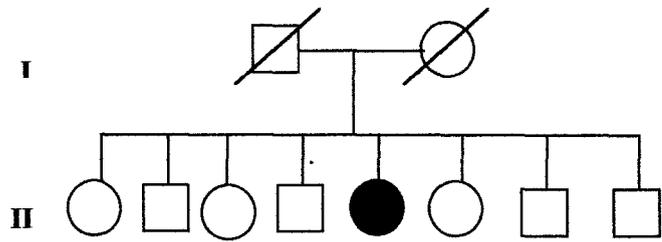
CV 55



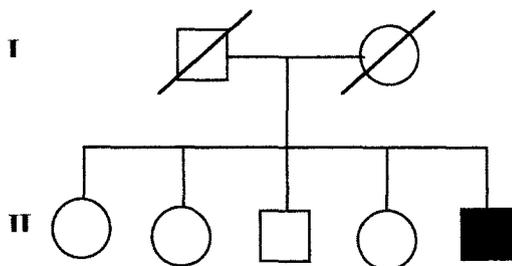
CV 56



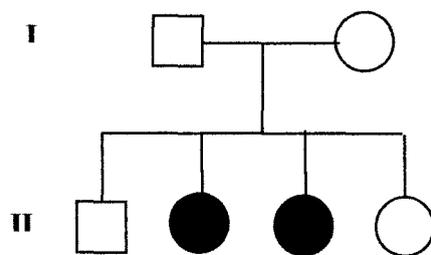
CV 57



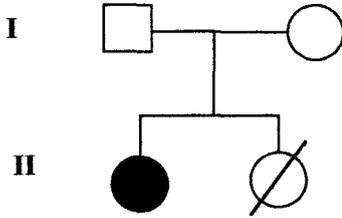
CV 58



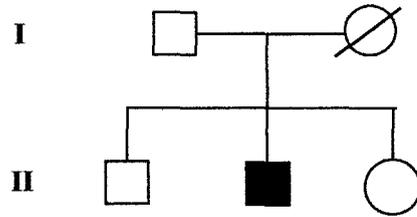
CV 59



CV 60



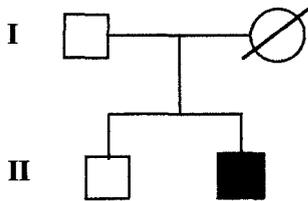
CV 61



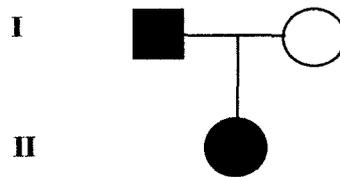
CV 62



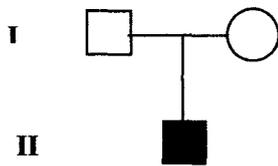
CV 63



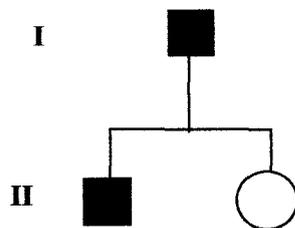
CV 64



CV 65



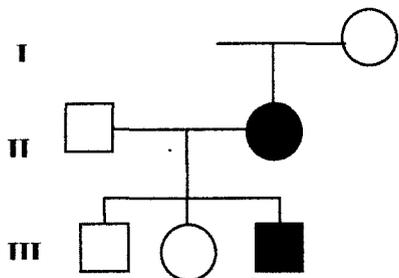
CV 66



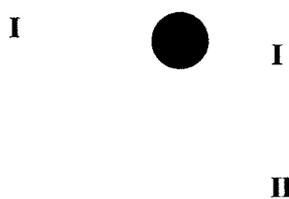
CV 67



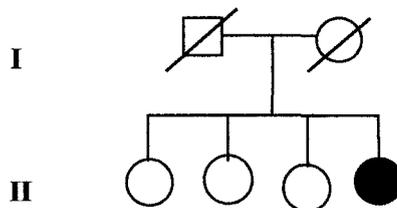
CV 68



CV 69



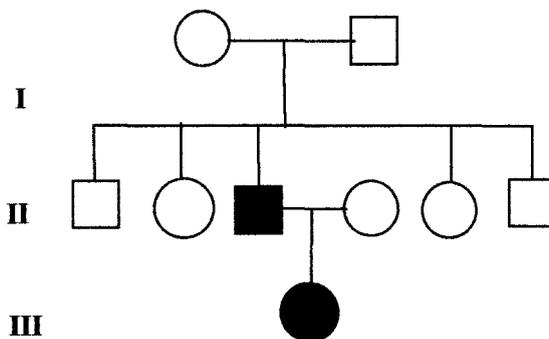
CV 70



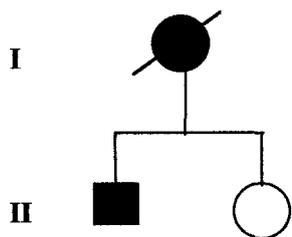
CV 71



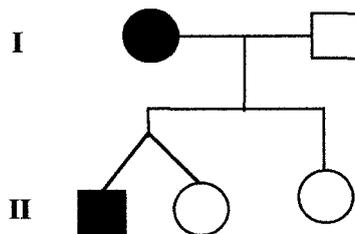
CV 72



CV 73

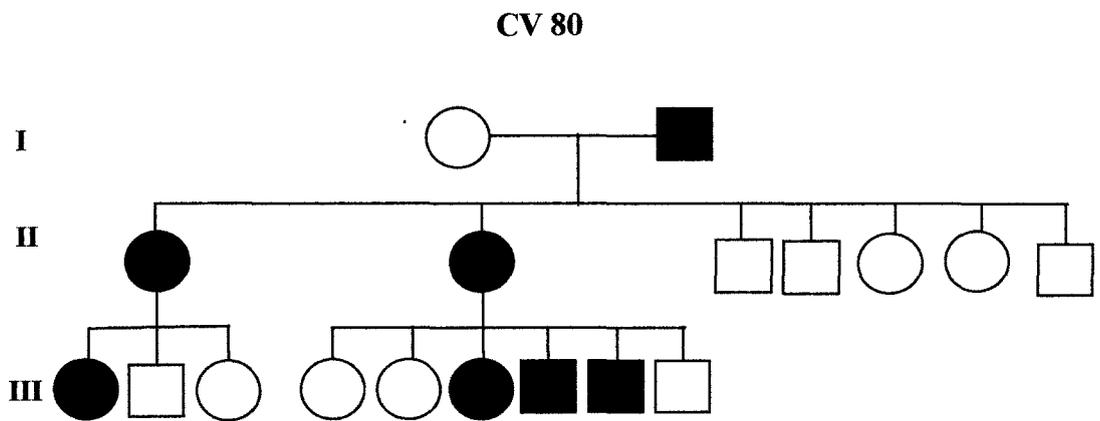
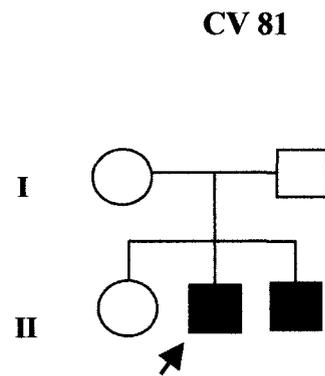
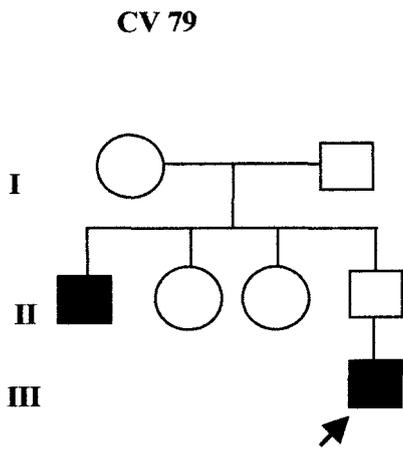
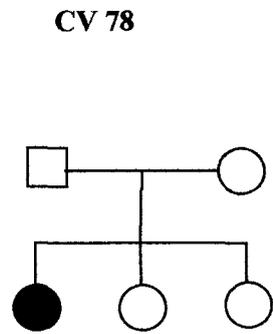
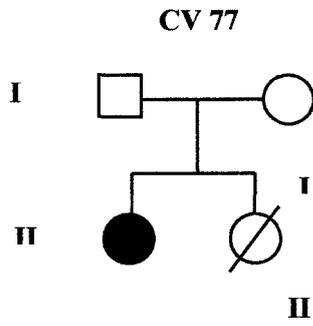
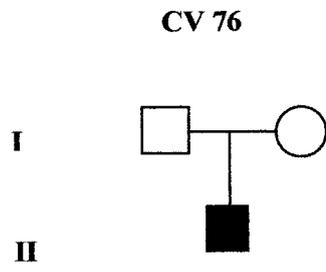


CV 74

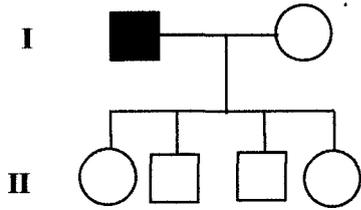


CV 75

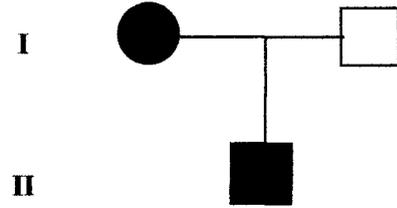




CV 82



CV 83



CV 84



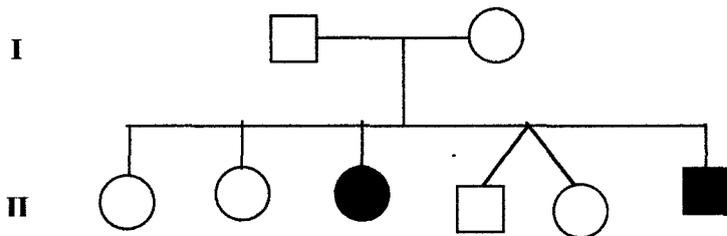
CV 85

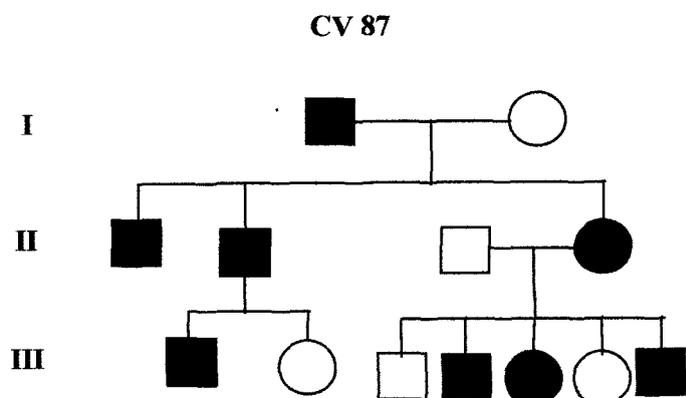


CV 88



CV 86





7 - DATOS ESTADÍSTICOS

Los datos se archivaron usando el estor de base de datos Access de Microsoft Windows Office 95, para

ordenadores PC. Para el análisis de las variables se utilizó el test de Pearson y el test del Chi-cuadrado y el programa estadístico EPI-INFO v 6.04.

1 – ESTUDIO DE LAS SECUENCIA DEL GEN CCM1

Tabla 2 - Características moleculares del Gen CCM1

Peso Molecular: 60828 Da	Localización: 7p21-3q		Tamaño: 529 AA
	Inicio	Final	
REPEAT ANKIRINA 1	80	109	30
REPEAT ANKIRINA 2	113	143	31
REPEAT ANKIRINA 3	147	176	30
REPEAT ANKIRINA 4	181	212	32
DOMINIO HOMOLOGO BANDA 4.1.	213	461	249
DOMINIO REQUERIDO PARA IN- TERACTUAR CON KREV-1	280	529	250

1.1 – SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL GEN CCM1

Fig. 16: Secuencia codificante del gen CCM1 en formato Fasta. Los números superiores corresponden a la localización del aminoácido dentro de la secuencia.

10	20	30	40	50	60
MGYSALEIKS	KMLALEKADT	CIYNPLGGSD	LQYTNRVDKV	VINPYFGLGA	PDYSKIQIPK
70	80	90	100	110	120
QEKWQSRMSS	VTEDKERQWV	DDFPLHRSAC	EGDSELLSRL	LSERFSVNQL	DSDHWAPIHY
130	140	150	160	170	180
ACWYGKVEAT	RILLEKGGKCN	PNLLNGQLSS	PLHFAAGGGH	AEIVQILLNH	PETDRHITDQ
190	200	210	220	230	240
QGRSPLNICE	ENKQNNWEEA	AKLLKEAINK	PYEKVRIYRM	DGSYRSVELK	HGNNTTVQOI
250	260	270	280	290	300
MEGMRLSQET	QQYFTIWICS	ENLSLQLKPY	HKPLQHVVDW	PEILAEELTNL	DPQRETPQLF
310	320	330	340	350	360
LRRDVRLPLE	VEKQIEDPLA	ILILFDEARY	NLLKGFYTAP	DAKLITLASL	LLQIVYGNYE
370	380	390	400	410	420
SKKHKQGFLN	EENLKSIVPV	TKLKSKAPHW	TNRILHEYKN	LSTSEGVSKL	MHHLQRMFLQ
430	440	450	460	470	480
NCWEIPTYGA	AFFFTGQIFTK	ASPSNHKVIP	VYVGVNIKGL	HLLNMETKAL	LISLKYGCFM
490	500	510	520	529	
WQLGDTDTCF	QIHSMENKMS	FIVHTKQAGL	VVKLLMKLNG	QLMATERNL	

La secuencia del gen está constituida por : 687 adeninas, 382 citosinas, 435 guaninas y 500 timinas.

Tabla 3: Los 64 codones de tres letras posibles para identificar los aminoácidos

Primera Posición (extremo 5')	Segunda Posición				Tercera Posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	Stop	Stop	A
U	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
C	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
A	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
G	Val	Ala	Glu	Gly	G

A	Ala	Alanina	I	Ile	Isoleucina
R	Arg	Arginina	K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparagin	M	Met	Metionina
D	Asp	Ác. Aspártico	F	Phe	Fenilalanina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
Q	Gln	Glutamina	T	Thr	Treonina
E	Glu	Ac. Glutámico	W	Trp	Triptófano
H	His	Histidina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina	V	Val	Valina

1.2 - SECUENCIA EXÓNICA COMPLETA DEL GEN CCM1

Fig. 17: . Secuencia codificante del gen CCM1. Las letras mayúsculas representan la secuencia de aminoácidos. Las secuencia en **negritas mayúsculas** representan la secuencia codificante de los aminoácidos. Están señalados los sitios de corte de la enzima *Mse I*.

```

ATGGGCTATAGTGCCTAGAAATAAAGAGTAAAATGTTAGCCCTAGAGAAAGCAGATAACC
26  ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  85
TACCCGATATCACGTGATCTTTATTCTCATTTTACAATCGGGATCTCTTTCGTCTATGG
a      M G Y S A L E I K S K M L A L E K A D T -

TGTATTTACAACCCCTTGGGTGGATCAGATCTTCAGTATACAAATCGGGTAGATAAAGTG
86  ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----I-----+-----  145
ACATAAATGTTGGGAAACCCACCTAGTCTAGAAGTCATATGTTTAGCCCATCTATTTTAC
a      C I Y N P L G G S D L Q Y T N R V D K V -

GTAATAAATCCATACTTTGGTCTAGGAGCTCCAGACTACTCAAAAATCCAAATACCTAAA
146 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  205
CATTATTTAGGTATGAAACCAGATCCTCGAGGTCTGATGAGTTTTTAGGTTTATGGATTT
a      V I N P Y F G L G A P D Y S K I Q I P K -

CAGGAAAAATGGCAGAGAAGCATGAGCAGTGTCCAGAGACAAGGAACGACAGTGGGTA
206 ----+-----+-----+-----+-----II+-----+-----+-----  265
GTCCTTTTTACCCTCTCTTCGTACTCGTCACAGTGTCTTCTGTTCCCTGCTGTACCCAT
a      Q E K W Q R S M S S V T E D K E R Q W V -

GATGATTTTCTCTCCACCGAAGCGCCTGTGAAGGAGATTCAGAATTACTAAGCCGTCTT
266 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  325
CTACTAAAAGGAGAGGTGGCTTCGCGGACACTTCTCTAAGTCTTAATGATTCGGCAGAA
a      D D F P L H R S A C E G D S E L L S R L -

CTCAGTGAAAGATTTTCAGTCAACCAGTTAGATAGTGACCACTGGGCACCCATTTCATTAT
326 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  385
GAGTCACTTTCTAAAAGTCAGTTGGTCAATCTATCACTGGTGACCCGTGGGTAAGTAATA
a      L S E R F S V N Q L D S D H W A P I H Y -

GCATGCTGGTATGGAAAAGTTGAGGCCACTCGCATATTGTTAGAGAAAGGAAAGTGCAAT
386 ----+---III-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  445
CGTACGACCATACTTTTCAACTCCGGTGAGCGTATAACAATCTCTTTCCCTTTCACGTTA
a      A C W Y G K V E A T R I L L E K G K C N -

MseI
|
CCAAACCTTTTAAATGGACAACCTAGTCTCTCTTCATTTGCTGCTGGAGGAGGACAT
446 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----  505
GGTTTGGAAAATTTACCTGTTGAATCAAGAGGAGAAGTAAAACGACGACCTCCTCCTGTA
a      P N L L N G Q L S S P L H F A A G G G H -

```

```

GCTGAAATAGTACAGATTCTCCTAAACCACCCAGAAACGGATAGACATATAACAGACCAA
506 -----+-----+-----+-----+-----+IV-----+-----565
CGACTTTATCATGTCTAAGAGGATTTGGTGGGTCTTTGCCTATCTGTATATTGTCTGGTT
a   A E I V Q I L L N H P E T D R H I T D Q -
      MseI
      |
CAAGGAAGATCTCCATTAATATTTGTGAAGAAAACAAAACAACTGGGAAGAAGCT
566 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----625
GTTCCCTTCTAGAGGTAATTTATAAACACTTCTTTTGTGTTTGTGACCCCTTCTCGA
a   Q G R S P L N I C E E N K Q N N W E E A -
      MseI
      |
GCAAAATTGTTGAAGGAAGCAATTAACAAACCATATGAAAAAGTTCGAATATACAGAATG
626 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----685
CGTTTTAACAACCTTCCCTTCGTTAATTGTTTGGTATACTTTTTCAAGCTTATATGTCTTAC
a   A K L L K E A I N K P Y E K V R I Y R M -
      GATGGGTCATATCGTTCTGTTGAATTGAAGCATGGAAATAATACCACAGTGCAGCAGATA
686 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----745
CTACCCAGTATAGCAAGACAACCTTAACCTTCGTACCTTATTATGGTGTACGTCGTCTAT
a   D G S Y R S V E L K H G N N T T V Q Q I -
      ATGGAAGGAATGCGTCTCTCTCAAGAACTCAGCAATATTTCACTATATGGATTTGTTC
746 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----805
TACCTTCCCTTACGCAGAGAGATTCTTTGAGTCGTTATAAAGTGATATACCTAAACAAGT
a   M E G M R L S Q E T Q Q Y F T I W I C S -
      GAAAACCTCAGCCTTCAACTCAAACCATATCATAAACCCCTTGCAACATGTTTCGTGACTGG
806 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----865
CTTTTGGAGTCGGAAGTTGAGTTTGGTATAGTATTTGGGAACGTTGTACAAGCACTGACC
a   E N L S L Q L K P Y H K P L Q H V R D W -
      CCAGAAATACTTGCTGAATTGACTAATCTGGATCCTCAAAGGGAAACACCTCAGCTTTTT
866 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----925
GGTCTTTATGAACGACTTAACTGATTAGACCTAGGAGTTTCCCTTTGTGGAGTCGAAAAA
a   P E I L A E L T N L D P Q R E T P Q L F -
      CTAAGAAGAGATGTGAGACTTCCCTTGGAAGTTGAAAAACAGATTGAAGACCCACTAGCT
926 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----985
GATTCTTCTCTACACTCTGAAGGAACTTCAACTTTTTGTCTAACTTCTGGGTGATCGA
a   L R R D V R L P L E V E K Q I E D P L A -
      ATTCTTATTCTCTTTGATGAAGCCAGATATAATTTATTGAAGGGCTTTTATACAGCTCCT
986 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1045
TAAGAATAAGAGAACTACTTCGGTCTATATTAATAACTTCCCAGAAATATGTGCGAGGA
a   I L I L F D E A R Y N L L K G F Y T A P -
      GATGCTAAGCTGATAACATTGGCAAGTCTGCTTTTGCAAATAGTCTATGAAATTATGAG
1046 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1105
CTACGATTGACTATTGTAACCGTTCAGACGAAAACGTTTATCAGATACCTTTAATACTC
a   D A K L I T L A S L L L Q I V Y G N Y E -

```

```

AGTAAAAACACAAGCAAGGTTTCCTAAATGAAGAAAATCTAAAATCCATCGTACCTGTT
1106 ----+-----+-----+-----VIII-----+-----+-----+-----1165
TCATTTTTTGTGTTTCGTTCCAAAGGATTTACTTCTTTTAGATTTTAGGTAGCATGGACAA
a   S K K H K Q G F L N E E N L K S I V P V -
ACCAAAGTAAAAAGTAAGGCACCTCACTGGACAAAATCGCATACTTCATGAATACAAGAAT
1166 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----IX-- 1225
TGTTTTGACTTTTCATTCCGTGGAGTGACCTGTTTAGCGTATGAAGTACTTATGTTCTTA
a   T K L K S K A P H W T N R I L H E Y K N -
CTCAGTACAAGTGAAGGTGTCTAGTAAAGAAATGCATCACCTTCAGCGCATGTTCTTACAG
1226 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1285
GAGTCATGTTCACTTCCACAGTCATTTCTTTACGTAGTGAAGTCGCGTACAAGAATGTC
a   L S T S E G V S K E M H H L Q R M F L Q -
1286 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1345
TTAACGACCCTTTAAGGATGAATACCTCGTCGTAAAAAGTGCCTGTCTATAAATGTTTC
a   N C W E I P T Y G A A F F T G Q I F T K -
GCAAGCCCCAGCAATCATAAAGTCATCCCTGTGTATGTAGGAGTGAATATAAAGGACTT
1346 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1405
CGTTCGGGGTCGTTAGTATTTTCAGTAGGGACACATACATCCTCACTTATATTTTCTGAA
a   A S P S N H K V I P V Y V G V N I K G L -
                                     MseI
                                     |
CATCTCCTCAACATGGAAACTAAGGCTTTACTCATCAGTCTTAAGTATGGTTGTTTTATG
1406 ----+-----+-----X+-----+-----+-----+-----1465
GTAGAGGAGTTGTACCTTTGATTCCGAAATGAGTAGTCAGAATTCATACCAACAAAATAC
a   H L L N M E T K A L L I S L K Y G C F M -
TGGCAATTGGGAGATACTGATACTTGTTTTTCAGATCCATAGCATGGAAAATAAATGAGC
1466 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1525
ACCGTTAACCTCTATGACTATGAACAAAAGTCTAGGTATCGTACCTTTTATTTTACTCG
a   W Q L G D T D T C F Q I H S M E N K M S -
                                     MseI
                                     |
TTTATAGTACATACAAAACAGGCTGGTCTCGTGGTAAAAGTAAATGAAGCTAAATGGA
1526 ----+-----+-----XI-----+-----+-----+-----585
AAAATATCATGTATGTTTTGTCCGACCAGAGCACCATTTGACAATTACTTTCGATTTACCT
a   F I V H T K Q A G L V V K L L M K L N G -
MseI
|
CAGTTAATGGCCACTGAAAGAAATTCATGAAAGAGAAGTAACTGTTACTCAAGCCACCAC
1586 ----+-----+-----+-----XII-----+-----+-----+-----1645
GTCAATTACCGTGACTTTCTTTAAGTACTTTCTCTTCATTGACAATGAGTTCGGTGGTG
a   Q L M A T E R N S * K R S N C Y S S H H -
                                     MseI
                                     |
ATTTTGGTGATGCAGAGTTTCCTTTCCGCGAAAGATTTCTTAAAATATTAATTTTGGGCC
1646 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----1705
TAAAACCACTACGTCTCAAAGGAAAGGCGCTTTCTAAAAGAATTTTATAATGAAAACCCGG
a   I L V M Q S F L S A K D F L K Y Y F W A -

```

```

CTAGCATGGCGGGTCAACCCTGTAATTCCAGCACTTTGGGAGGGTGGGGGCAGGGCGGGA
1706 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1765
GATCGTACCGCCAGTTGGGACATTAAGGTCGTGAAACCCTCCCACCCCGTCCCGCCCT

a      L A W R V N P V I P A L W E G G G R A G -

TCAACTGAAGTCAGAGTTCAAGACAGCCTGGGCAACATGGTGAAACCTGTCTCTACAAA
1766 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1825
AGTTGACTTCAGTCTCAAGTTCTGTCGGACCCGTTGTACCACTTTGGACAGAGATGTTTT

a      S T E V R V Q D S L G N M V K P V S T K -

ATACAAAATTAGGTGGGTGTGGTGGGGGCGCCTATTCATCCTAGCTACTAGGGGAGGG
1826 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1885
TATGTTTTTAATCCACCCACACCACCCCGCGGATAAGTAGGATCGATGATCCCCTCCC

a      I Q K L G G C G G G R L F I L A T R G G -

MseI
CAAGGTGGGGGAGATCGCTTAACCCAGGAGGTGGGGTTGTTGTGAGCCAAGATTGCAC
1886 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1945
GTTCCACCCCTCTAGCGAATTGGGGTCTCCACCCCAACAACACTCGGTTCTAACGTG

a      Q G G G D R L T P G G G G C C E P R L H -

CACGGCACGCTAGCCTGGGTGACACAGGAAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1946 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2004
GTGCCGTGCGATCGGACCCACTGTGTCCTTCTGAGGTAGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT

a      H G T L A W V T Q E D S I S K K K K K

```

CÓDIGO DE AMBIGÜEDADES

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina (Uracil)
a	Cuestionable A
c	Cuestionable C
g	Cuestionable G
t	Cuestionable T (U)
R	A o G
Y	C o T (U)
M	C o A
K	G o T (U)
W	A o T (U)
S	C o G
B	C o G o T (U)
D	G o A o T (U)
H	A o C o T (U)
V	A o C o G
N	A, C, G o T (U)

Fig. 18: Código internacional de ambigüedades.

2 - ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL GEN CCM1 POR SSCP

El DNA se aisló por el método del Dextrano salino, indicado en Material y Métodos. Después de la PCR inicial se realizó el "screening" de los probandos de las 84 familias con cavernomatosis por análisis de SSCP, que detectó la presencia de mutaciones en el gen CCM1 en el 20% del total de los cavernomas. En los individuos afectados se detectó un pequeño fragmento, que migraba más rápido que el producto silvestre. Este pequeño fragmento no era encontrado en ninguno de los controles sanos y en miembros de la familia no afectados.

Como se ve en las imágenes de los SSCP, en los individuos que no presentan ningún polimorfismo se observa la presencia de una sola banda, mientras que en los individuos portadores de alguna mutación se observa la presencia de una tercera banda en la parte inferior o superior del gel, según el comportamiento del alelo en estudio.

Se procedió a la realización de la secuenciación del DNA genómico del probando y de los padres, juntamente con un control sano no emparentado en todos los individuos en que se detectó la presencia de algún polimorfismo o en sospechosos. La secuenciación se realizó por el método del dideoxinucleótidos terminal con el "kit" SequiTherm (Epicente Technologies, Madison,

Wisconsin - EUA) utilizando cebadores marcados con IRD 800.

La separación electroforética en gel de acrilamida y análisis de la secuencia de los fragmentos fue ejecutada en el secuenciador automático LI-COR DNA 4000 con "software" del fabricante.

La ausencia de mutaciones en algunas familias probablemente se debe a la existencia de otros loci CCM o que la mutación esté localizada en los otros 4 exones publicados posteriormente por T. Sahoo (2000), o quizás a la sensibilidad incompleta del análisis de SSCP.

3 - RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL EMPLEO DE SSCP Y SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Se realizó el estudio de polimorfismo en todos los exones mediante PCR y SSCP. Tras el análisis de los resultados se detectaron 4 nuevas mutaciones en los exones, III, IV, VI y X, en las familias CV 59, CV 66, CV 36 y CV 10, respectivamente, que constituyen el 20% de los probandos de cavernomatosis.

Todas las mutaciones identificadas en nuestro estudio corresponden a mutaciones nuevas.

La presencia de estas mutaciones en los individuos enfermos y su ausencia en los controles sanos demuestran que ellas son la causa de la enfermedad.

Tabla 4: Mutaciones identificadas en CCM1

CV	EXÓN	POSICIÓN	CODÓN	MUTACIÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO
59	3	283	86	283delCC CACC→CAGA CGA→TGA	Hist→Glut Arg→Stop
66	4	519	145	519delCA TACAGA→TAGATT	Gln→Asp Asp→Stop
36	6	741	248	741delTC TCTCAA→TCAA	Hist→Stop
10	10	1282	428	1282insA TAT→TAG	Tyr→Stop

3.1 - EXÓN 3

El estudio de polimorfismo mediante PCR y SSCP en este exón, detectó la presencia de una mutación en la familia CV 59.

Para identificar la mutación se realizó la secuenciación automática del exón utilizando un secuenciador LICOR modelo 4000.

3.1.1 - FAMILIA CV 59

Los individuos de la familia CV 59 fueron analizados por PCR y SSCP con el protocolo y cebadores previamente descritos.

El exón III del gen KRIT-1 fue amplificado utilizando los cebadores sentido y antisentido, tal como se describe en material y métodos. La secuencia del cebador sentido era 5'TTTGGAATGAGAACAGTC y la secuencia del cebador antisentido era (5'TGAAAAATACAACAGGAC). El DNA genómico era inicialmente analizado por SSCP. El producto de los fragmentos de PCR era separado por

electroforesis en acrilamida al 6% con urea 7 M.

El resultado del SSCP demostró la posible presencia de una mutación en el exón III del gen KRIT-1. Se observó la presencia de una tercera banda, característica de un alelo mutado en el probando de esta familia.

La secuenciación directa del DNA del exón III fue realizada con DNA genómico del probando y de los padres por el método del dideoxinucleótidos terminal (*kit* Sequitherm de Epicentre Technologies - Madison, Wisconsin - EUA). Los análisis automatizados de parte de la secuencia de ambas hebras sentido y antisentido fueron hechas con cebadores 5' marcados con IRD 800 de acuerdo con el protocolo del "*kit*" utilizado. La separación electroforética en gel de acrilamida al 6% y urea 7 M y el análisis de la secuencia de los fragmentos fueron realizados en el secuenciador automático LICOR DNA 4000 con el "*software*" del fabricante.

La secuenciación del exón III identificó un cambio de dos pares de bases CC/AT en la posición 283. Esta mutación produce un cambio en los

aminoácidos número 85 y 86 de la secuencia, sustituyendo los tripletes CAC, una histidina por CAA una glu-

tamina y CGA, una arginina por TGA un codón de terminación.

```

5' TTTGGAAATGAGAACAGTCTTGAAAAGAAGGACTAACATTTATAATAAAAAATGTA
3' AAACCTTACTCTTGTCAGAACTTTTCTTCCTGATTGTAAATATTATTTTTTACAT

TTCTTTCTAAAAAGAAAAGAATAAAATATTCCATTTACCAGCATGCATAATGAATGGG
AAGAAAGATTTTTCTTTTCTTATTTATAAGGTAAATGGTCGTACGTATTACTTACCC

TGCCAGTGGTCACTATCTAACTGGTTGACTGAAAATCTTTCACTGAGAAGACGGCT
ACGGGTCACCAGTGATAGATTGACCAACTGACTTTTAGAAAAGTGACTCTTCTGCCGA

TAGTAATTCTGAATCTCCTTCACAGGCGCTTCGGTGGAGAGGAAAATCATCTACCCA
ATCATTAAAGACTTAGAGGAAGTGTCCGCGAAGCCACCTCTCCTTTTAGTAGATGGGT

CTGTCGTTCCCTAATCATTAAAAAGAAATTTTGAAAATACAACAGGAC 3'
GACAGCAAGGGATTACTAATTTTTCTTTAAACTTTTTATGTTGTCCTG 5'

```

Fig. 19: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K3F Y K3R

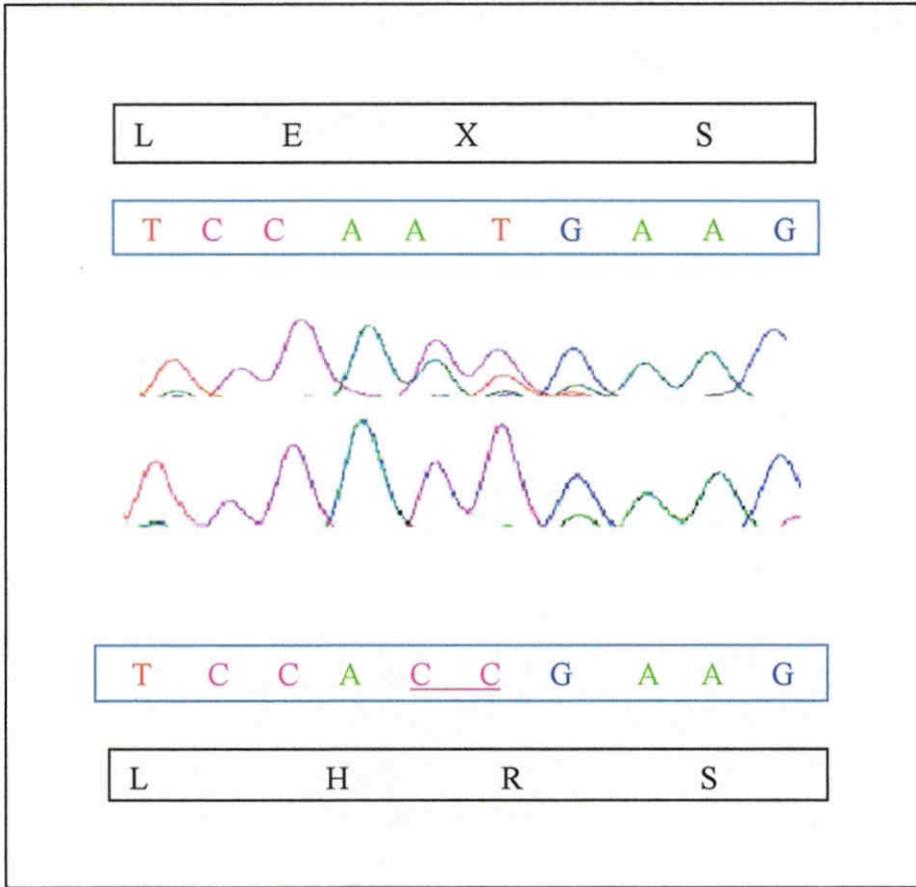


Fig. 21: Comparación de la secuencia mutada y silvestre de las hebras sentido (panel superior) y antisentido (panel inferior) incluyendo la transición CC/AT. El exón III del DNA genómico del padre (línea inferior) y probando (línea superior) fueron amplificadas por PCR. Las secuencias de los productos de PCR fueron determinados con cebadores 5' forward (sentido) y reverse (antisentido) (ver Métodos) en el secuenciador automático LI-COR 4000. La transición del par de bases CC/AT (subrayados) cambia la secuencia de la hebra mutada. La secuencia de aminoácidos del cromosoma mutado y silvestre son dados sobre la secuencia de nucleótidos de la hebra sentido.

3.2 - Exón 4

Tras el análisis de este exón mediante PCR y SSCP se detectó una mutación en la familia CV 66, que consistía en la delección de dos pares de base CA en la posición 519. Esta mutación produce el cambio de una glutamina por un ácido glutámico en el codón 145, produciendo un cambio en la pauta de lectura, que modifica 11 aminoácidos y da lugar a un codón de terminación en la posición 155.

La búsqueda de una endonucleasa de restricción capaz de reconocer la secuencia resultó en la enzima *Rsa* I. Esta enzima posee como sitio de restricción la secuencia GT↓AC. En este caso la mutación elimina una diana de restricción en la secuencia normal. El individuo enfermo posee dos fragmentos de 94 y 192 pb respectivamente provenientes del cromosoma normal del progenitor sano y un tercer fragmento de 286 pb correspondiente al cromosoma mutado, proveniente del progenitor enfermo. En el cromosoma mutado solo se observa el fragmento de 286 pb (Fig. 21), porque no fue cortado por la enzima.

3.2.1 - FAMILIA CV 66

Esta familia de origen portugués estaba constituida de padre e hijo. Los dos fueron analizados por PCR y SSCP como los demás participantes del estudio.

Los cebadores utilizados para la amplificación de la hebra sentido fue 5'GTTGTTGTTTTTGTG y 5'ATGCCTGGCTCTAACTAT fue el cebador utilizado para amplificar la hebra antisentido. Como se describe en material y métodos, el DNA

genómico fue analizado por SSCP. Para eso se separaron los fragmentos de la PCR en electroforesis realizadas en minigeles de acrilamida al 10% tal como se describe en material y métodos. En el análisis del SSCP se observó la presencia de una posible mutación, indicada por la presencia de una tercera banda en la imagen del gel.

Para la identificación de la mutación se realizó la secuenciación directa del DNA genómico del probando y del padre por el método del dideoxi-nucleótidos terminal con el *kit* de Sequitherm (Epicentre Technologies - Madison, Wisconsin - EUA) y con cebadores marcados con IRD 800 de acuerdo con el protocolo del fabricante. El producto de la PCR de secuenciación fue separado por electroforesis en gel de acrilamida al 6% con urea 7 M y analizados por el "software" del secuenciador automático LI-COR.

El análisis de la secuencia del DNA genómico del probando del CV 66 en exón 4 identificó la delección de un par de bases CA/GT en la posición 519C y 520A, que cambia el triplete CAG, una glutamina por una asparagina, GAT en el codón 145, produciendo además un cambio en la pauta de lectura de 10 aminoácidos (QILLNHPETD), que termina con la sustitución del triplete GAT, una asparagina en TAG, un codón de terminación en el aminoácido 154 (H154X). La secuencia correspondiente al DNA paterno presentó una secuencia normal, acorde con el resultado de su RMI negativa.

La imposibilidad de analizar el DNA de la madre, que no ha participado en el estudio y la secuencia normal del padre nos lleva a concluir

que la mutación heredada viene del cromosoma materno.

```

5' TGCATTACTTGTTATTCACTGCTTGAATATTATTTTTAAAAACCTGGAAAATA
ACAGTAATGAACAATAAGTGACGAACTTATAATAAAAATTTTGGACTTTTATT

ACTTACTCTATCCGTTTCTGGGTGGTTTAGGAGAATCTGTACTATTTTACGCATG
GAGAATGAGATAGGCAAAGACCCACCAATCCTCTTAGACATGATAAGTCGTATC

TCCTCCTCCAGCAGCAAAATGAAGAGGAGAATAAGTTGTCCATTTAAAAGGTTT
AGGAGGAGGTCGTTCGTTTTACTTCTCCTCTTCGTTCAACAGGTAAATTTTCCAAA

GGATTGCACTTTTCCTTTCTCTAACAATATGCGAGTGGCCTCAACTTTTCCATACC
CCTAACGTGAAAGGAAAGAGATTGTTATACGCGCACCGGAGTTGAAAAGGTATGG

TGTATAAAAAAACAACAACAAAAAACTTACCTAAAAAGATCATCTGAAATG3'
ACATATTTTTTTGTTTGTGTTTTTTGAATGGATTTTTTCTAGTAGACTTTAC

```

Fig. 22: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K4F Y K4R

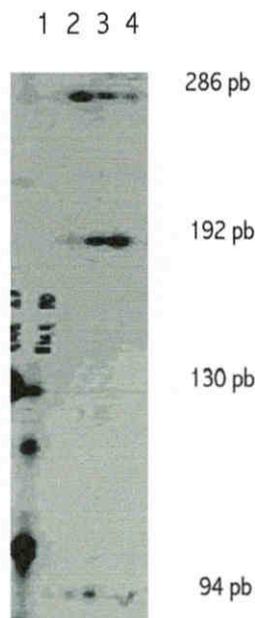


Fig:23: Digestión del producto de PCR del exón IV de la familia CV 66. El enfermo (3) posee un fragmento de 286 pb y dos fragmentos de 192 y 94 pb, respectivamente. El individuo sano (2 y 4) posee dos fragmentos de 192 y 94 pb producidos por el corte de la enzima.

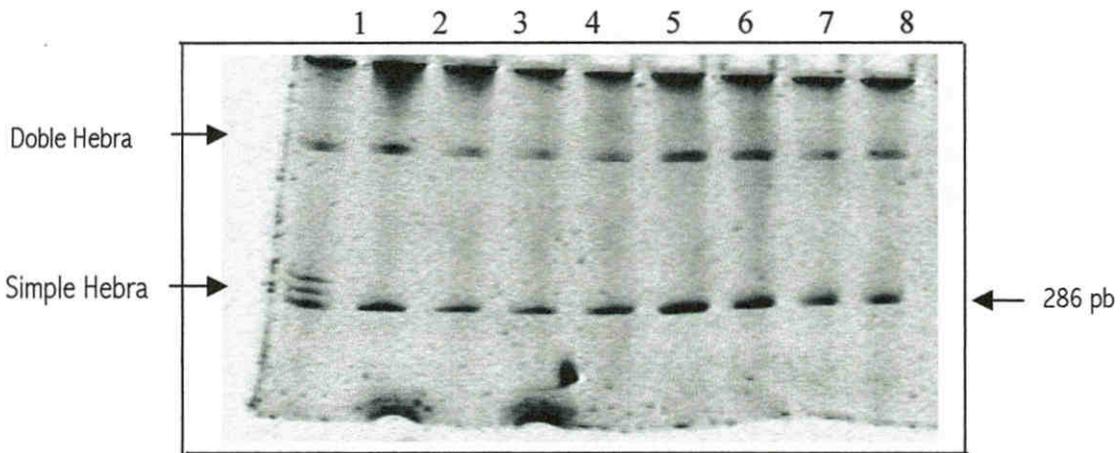


Fig. 24: SSCP representativo del estudio molecular del exón 4 en la familia CV 66. El individuo afectado, portador de una mutación se caracteriza por la Presencia de una tercera banda.

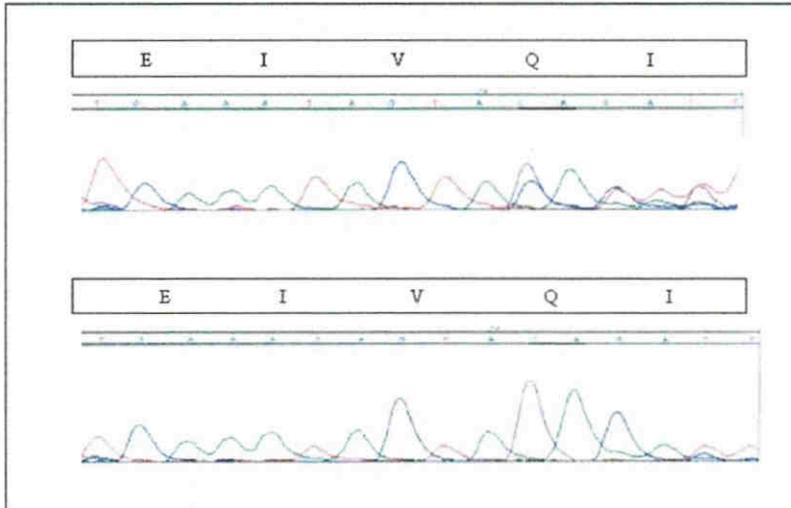


Fig. 25: Comparación de la secuencia mutada y de la secuencia normal de la hebra sentido del exón IV, comprendiendo la delección CA. El DNA genómico del hijo (arriba) y del padre (abajo) fueron amplificados por PCR y secuenciados con cebadores sentido y antisentido del exón IV, marcados con IRD-800 en el secuenciador LI-COR 4000. La delección del par de bases CA/GT desplaza la secuencia de la hebra mutada. La secuencia de aminoácidos del cromosoma mutado y normal está representada sobre la secuencia de nucleótidos de las hebras sentido. W, A o T, R, A o G, Y, C o T son ambigüedades para los alelos mutados. Las letras pequeñas indican base cuestionable.

3.3 - EXÓN 6

Se realizó el estudio de polimorfismo en este exón mediante PCR y SSCP.

Tras el análisis de los resultados se detectó la presencia de una mutación en la familia CV 36. Para identificarla se realizó la secuenciación automática del exón utilizando un secuenciador automático LI-COR modelo 4000.

3.3.1 - FAMILIA CV 36

Los haplotipos CCM1 de individuos de la familia CV 36 fueron analizados con el protocolo y cebadores previamente descritos en Material y Métodos. Los marcadores polimórficos de microsátelites comprendiendo el intervalo CCM1 eran los siguientes: DTS492, D7S2410, D/S1813, D7S689, D7S527 y D7S479.

Un fragmento del gen KRIT-1 conteniendo el exón VI era amplificado con el cebador sentido (5'TTGTTAGATTGTGATGTA) y (5'AACATAATAAAACTTTC), antisentido, tal como descrito previamente. El DNA genómico era inicialmente analizado por SSCP. El producto de los fragmentos de PCR fue separado por electroforesis al 10% en acrilamida en ausencia y en presencia de glicerol al 10% como descrito en material y métodos.

La secuenciación del DNA del exón VI fue ejecutada con DNA genómico del probando y de los padres por el método del dideoxinucleótidos terminal (*kit* fmol de Promega, Francia). Análisis automatizados de parte de la secuencia de ambas hebras sentido y antisentido fueron

extendidas hasta 30 o 40 bases del intrón 5 y 6 eran hecha con cebadores 5' marcados con IRD 800 de acuerdo con el protocolo del kit SequiTherm (Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin). La separación electroforética en gel de acrilamida y análisis de la secuencia de los fragmentos fueron realizados en el secuenciador automático LI-COR DNA 4000 con "*software*" del fabricante.

Las imágenes de resonancia magnética demostraron la presencia de dos malformaciones cavernosas cerebrales en el probando de la familia CE 36. No fueron encontradas malformaciones cavernosas cerebrales en los padres (fig. 27) y ni en hermana sana (no muestra) en el "*screening*" de sangre total.

El análisis de los haplotipos de CCM1 demostró que los hermanos heredaron el cromosoma mutado del padre, mientras ellos diferían en el cromosoma de la madre (fig. 27). Los haplotipos mostraron también la falta de recombinación en esta región.

El análisis del resultado demostraba que ninguno de los padres compartían el SSCP sugiriendo una mutación no heredada en el exón VI del gen KRIT-1.

La secuenciación del exón VI identificó una delección de dos pares de bases TC/AG. La delección de los nucleótidos 741T y 742C cambia el marco de lectura y produce una secuencia mutada de 23 aminoácidos. (RNSAIFHYMGFRKPQPSTQTIS) que termina con un triplete de terminación TAA. La mutación 741delTC sustituye el triplete CAT de histidina en la posición 271 por un codón de terminación (H271X). La secuencia de las hebras sentido y contrasentido demostraron claramente la delección en el DNA ge-

nómico del probando y la secuencia normal de las secuencias intrónicas próximas al exón 6 del probando y familiares. La comparación del trío (padres y probando) con un grupo de marcadores polimórficos de loci independientes excluye la posible falsa paternidad/maternidad.

3.3.2 - ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MUTACIÓN 742C→T ENTRE ESPAÑOLES Y AMERICANOS PARA VERIFICAR EFECTO FUNDADOR

La mutación 742C→T recientemente descrita en 16 de 21 familias estudiadas (T. Sahoo, 1999) apoya el efecto fundador en hispano-americanos, descrito previamente por Gunel et al (1996). Hemos estudiado la posibilidad de un ancestral común en el grupo de familias españolas con cavernomatosis cerebral familiar mediante un test tipo "screening" que detecta la transición 742C→T en el exón VI de gen CCM1.

El exón VI fue analizado en 39 familias españolas. El fragmento del gen CCM1 conteniendo el exón VI fue amplificado por PCR con los cebadores sentido y antisentido, (5'TTGTTAGATGTGATGTA) y (5'AACATAATAAACTTTC) respectivamente. Inicialmente las alicotas de DNA amplificado fueron analizadas por SSCP. El producto de

la PCR fue analizado por electroforesis en acrilamida al 10% en ausencia y en presencia de glicerol al 10%.

Los SSCPs fueron analizados con el fin de detectar la transición 742T→C, que es diana de restricción para la enzima *Mse* I. El producto de la PCR incluyendo la secuencia del exón VI y el sitio intrónico para la restricción de la *Mse* I, lo cual sirvió de control interno de la digestión. El producto de la PCR consistía de un fragmento de 238 pares de bases, mientras la digestión con *Mse* I, dividía el producto de la PCR en dos fragmentos de 210 y 28 pares de bases (fig. 25). La presencia de la mutación 742T→C dividía el producto de la PCR en 3 fragmentos de 141, 69 y 28 pb (fig. 26)..

La secuenciación del DNA fue ejecutada con cebadores marcados con 5'-³²P dideoxinucleótidos terminadores (fmol kit Promega, Lyon, France). El cebador sentido utilizado en la PCR era 5'CGAATATACAGAATGGATG y el cebador reverse era el cebador utilizado en la PCR primaria.

Estos resultados demostraron que solamente uno de los 39 probandos poseían un SSCP significativo, pero ambos la secuencia del exón VI y la falta del sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Mse* I, demostraron que la mutación 742C→T no estaba presente en el cromosoma mutado.

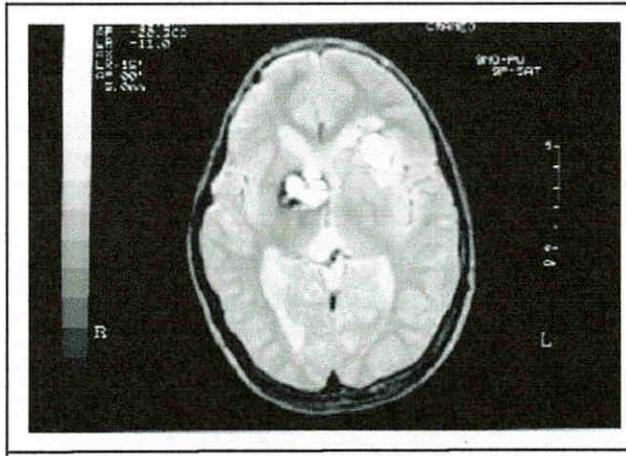


Fig. 26: Imagen de resonancia magnética (MRI) de paciente y de los padres. El "screening" total del cerebro por T2 weighed MRIs mostró dos cavernomas en el paciente, mientras que el padre, la madre y la hermana eran normales.

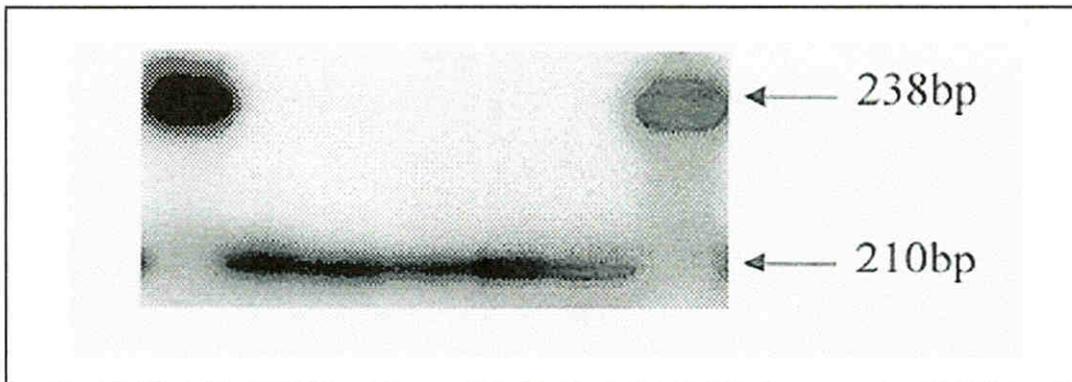


Fig. 27: Producto de PCR del exón VI de distintos individuos digeridos con la enzima *Mse I* (1,7) y sin digerir (2,3,4,5 y 6) fueron separados en gel de acrilamida al 6% con urea 7 M. La imagen fue obtenida por autoradiografía del gel. El fragmento de 28 pb no se ve.

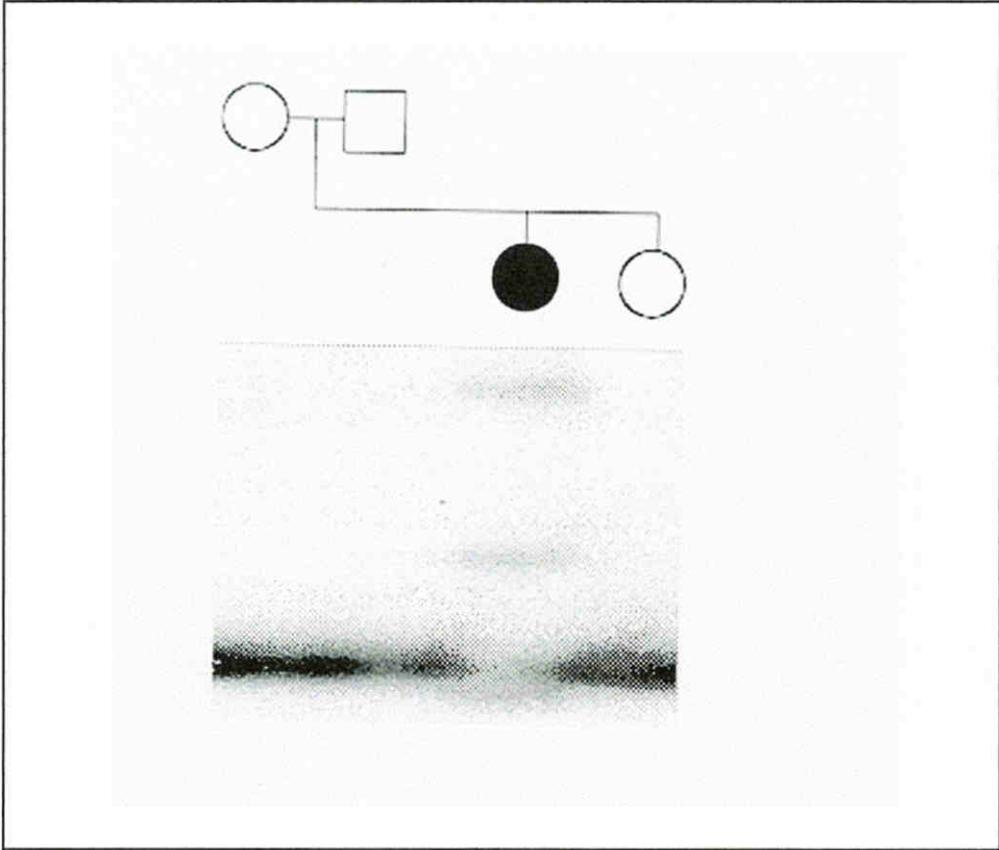
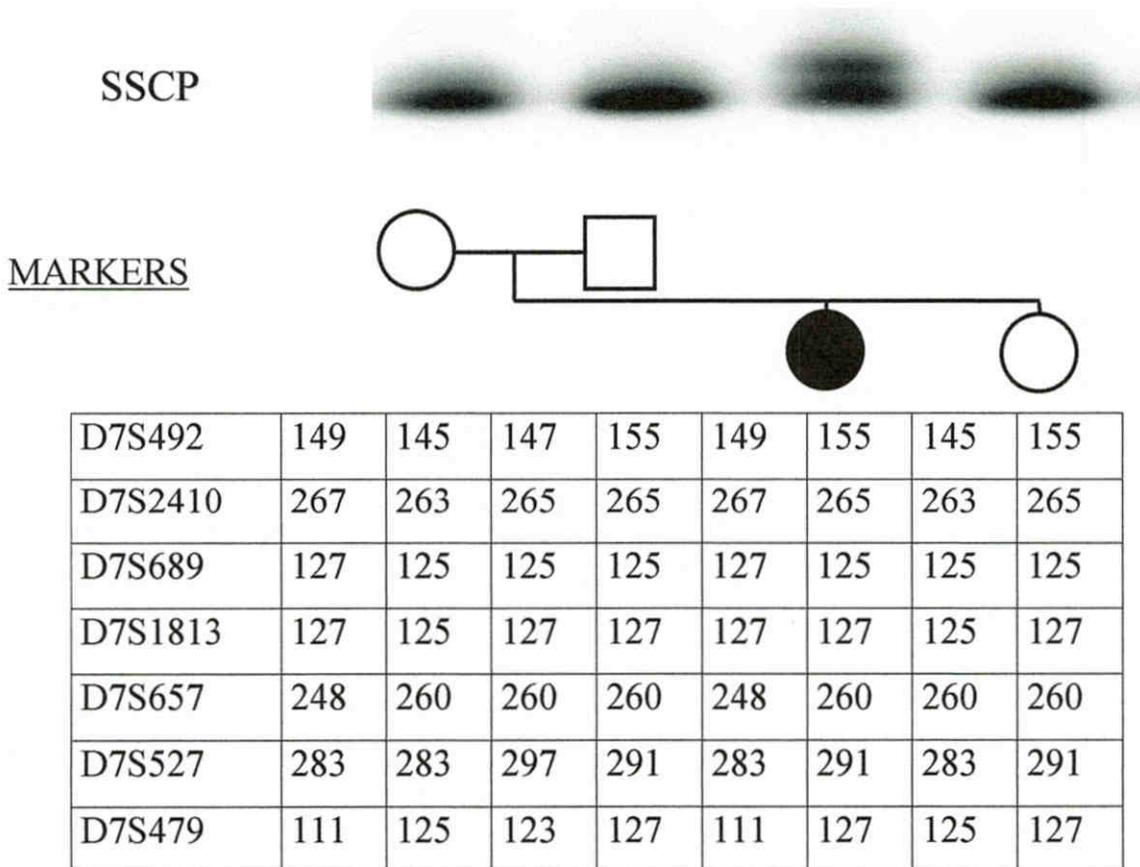


Fig. 28: SSCP del CV 36. Mezcla de PCR conteniendo $^{32}\text{PdCTP}$ y los demás reactivos. El producto de PCR del exón VI fue separado en gel de acrilamida al 10% con glicerol al 10% durante 16 horas a 20°C en un gel de 20X30 cm. Las bandas fueron reveladas tras 48 horas de exposición a una placa de rayo X.

Fig. 29: Fotografía superior: SSCP del exón VI del gen KRIT-1 de la familia española CE 36. Alíquotas de DNA genómico fueron amplificadas en una mezcla de PCR conteniendo [α^{32} P]-dCTP, cebadores y otros reactivos descritos en el método. Los productos de PCR del exón VI fueron separados en condiciones no desnaturizantes en acrilamida al 10% conteniendo 10% de glicerol durante 16 horas a 20°C en un gel de 20 x 30 cm. Las bandas fueron reveladas después de 48 horas de exposición a rayos X. La parte baja de la figura muestra el haplotipo de la región crítica del CCM1 en individuos de la familia CE 36. Los marcadores correspondientes son dados en la primera columna. Note que ambos, el afecto y el hermano sano, heredaron el mismo cromosoma de la madre mientras ellos difieren en el cromosoma del padre.



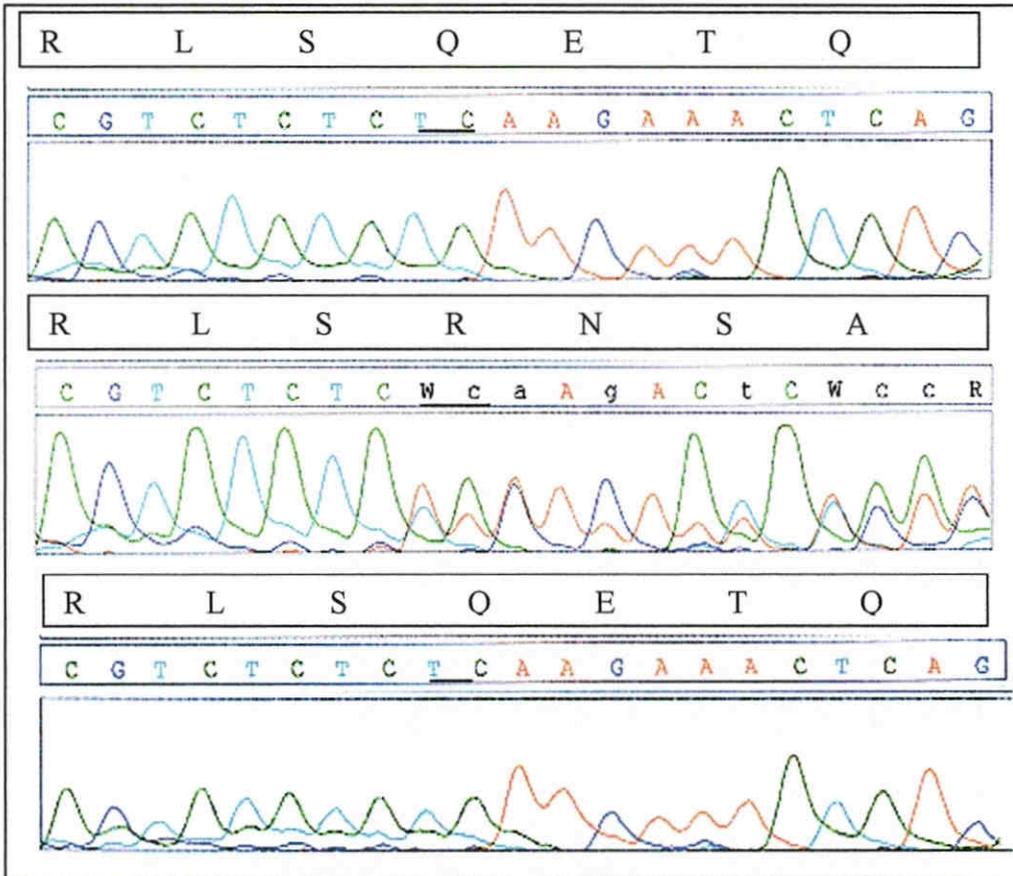


Fig. 30: Comparación de la secuencia mutada y de la secuencia salvaje de las hebras sentido del exón VI, comprendiendo la delección TC. El DNA genómico del padre (líneas superiores), madre (líneas inferiores) y probando (líneas medianas) fueron amplificados por PCR y secuenciados con cebadores sentido y antisentido del exón VI, marcados con IRD-800 en el secuenciador LI-COR 4000. La delección del par de bases TC/GA desplaza la secuencia de la hebra mutada. La secuencia de aminoácidos del cromosoma mutado es y salvaje está representada sobre la secuencia de nucleótidos de las hebras sentido. W, A o T, R, A o G, Y, C o T son ambigüedades para los alelos mutados. Las letras pequeñas indican base cuestionable.

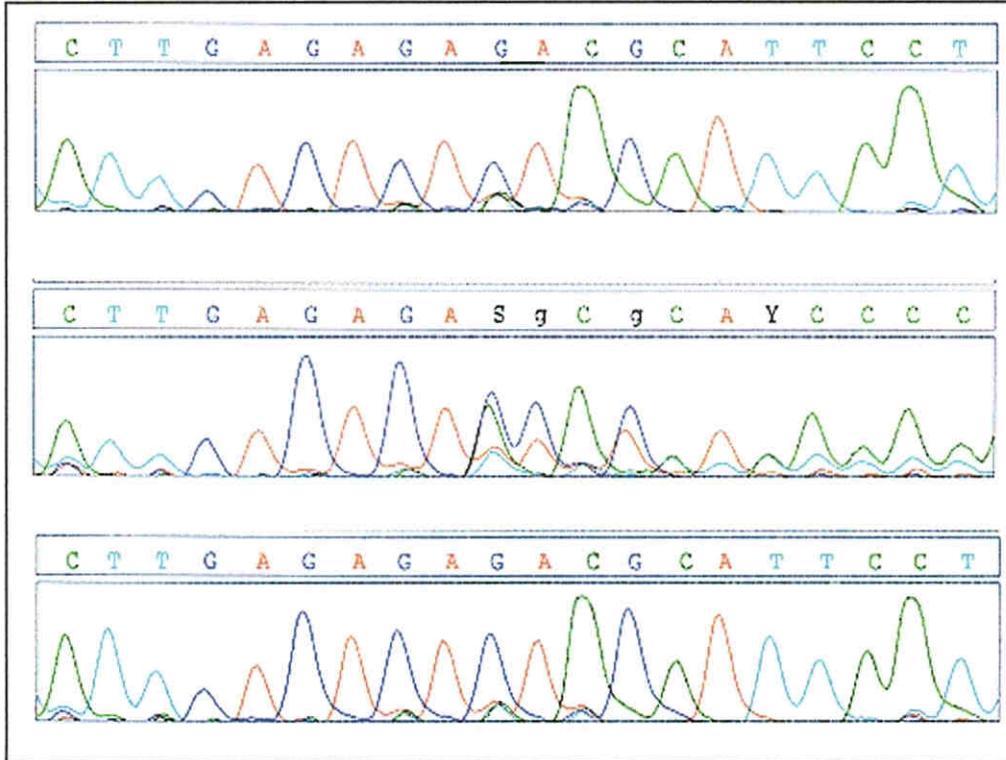


Fig.31: Comparación de la secuencia mutada y de la secuencia salvaje de las hebras antisentido del exón VI, comprendiendo la delección AG. El DNA genómico del padre (líneas superiores), madre (líneas inferiores) y probando (líneas medianas) fueron amplificados por PCR y secuenciados con cebadores sentido y antisentido del exón VI, marcados con IRD-800 en el secuenciador LI-COR 4000. La delección del par de bases TC/GA desplaza la secuencia de la hebra mutada. La secuencia de aminoácidos del cromosoma mutado es y salvaje está representada sobre la secuencia de nucleótidos de las hebras sentido. W, A o T, R, A o G, Y, C o T son ambigüedades para los alelos mutados. Las letras pequeñas indican base cuestionable.

5' AACATAATAAAAACCTTCTACTGAGGTTTTCTGAACAAATCCATATAGTGAAA
 TTGTATTATTTTTGAAAGATGACTCCAAAAGACTTGTTTAGGTATATCACTTT

 TATTGCTGAGTTTTCTTGAGAGAGACGCATTCCCTTCCATTATCTGCTGCACTGT
 ATAACGACTCAAAGAACTCTCTCTGCGTAAGGAAGGTAATAGACGACGTGACA

 GGTATTATTTCCATGCTTCAATTCAACAGAACGATATGACCCATCCATTCTGTAT
 CCATAATAAAGGATCGAAGTTAAGTTGTCAAGCTATACTGGGTAGGTAAGACATA

 ATTCGAACTTTTTCATACCAAGAAACGATAACTTACGTAACGAACTTAAAAAA
 TAAGCTTGAAAAAGTATGGTTCCTTGTCTATTGAATGCATTGTTGAATTTTTT

 TTAT**TACATCACAATCTAACAA3'**
 AATATGTAGTGTTAGATTGTT '

Fig. 32: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K6F y K6R

5' TGACATGATTGGTAAAAAAGAGCTGAAAATCTACCTTAGTTTTCCATGTTGAGGAGATG
 ACTGTACTAACCATTTTTTCTCGACTTTTAGATGGAATCAAAGGTACAACCTCCTCTAC

 AAGTCCTTTTATATTCCTACATACACAGGGATGACTTTATGATTGCTGGGGCTT
 TTCAGGAAAATATAAGTGAGGATGTATGTGTCCCTACTGAAATACTAACGACCCCGAA

 GCCACTTTGTAAATATCTGTCTGTGAAAATGCTGCTCCATAAGTAGGAATTTCCCA
 CGGAGAAACATTTATAGACAGGACACTTTTTACGACGAGGTATTCATCCTTAAAGGGT

 GCAATTCTGTAAGAACATGCGCTGAAGGTGATGCATTTCTTTACTGACACCTTCACTT
 CGTTAAGACATTCTTGTACGCGACTTCCACTACGTAAAGAAATGACTGTGGAAGTGAA

 GTACTGAGATTCTAAAACAAACAAGGTAAATTTAAAATAAAAAGAGATAT**TGAAAGGAAA**
 CATGACTCTAAGATTTTGTGGTTCCATTTAATTTTTATTTTCTCTATACTTTTCTTT

ATGTACCA3'
 TACATGGT5'

Fig. 33: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K10F y K10R

3.4 - EXÓN 10

Se realizó el estudio de polimorfismo en este exón mediante PCR y SSCP.

Tras el análisis de los resultados se detectó la presencia de una mutación en la familia CV 10.

Para identificar la mutación se realizó la secuenciación automática del exón utilizando un secuenciador LI-COR modelo 4000.

3.4.1 - FAMILIA CV 10

Se analizaron los haplotipos CCM1 de individuos de la familia CV 10 con el protocolo y cebadores previamente descritos en material y métodos. El fragmento del gen CCM1 conteniendo el exón X fue amplificado con el cebador 5'TGACATGATTGGTAAAAAATGTACCA para la hebra sentido y 3'TGGTACATTTTCCTTCA para amplificar la hebra antisentido, como se describe en material y métodos.

Inicialmente se analizó el DNA genómico por SSCP, separándose los fragmentos de PCR por electroforesis en acrilamida en ausencia y en presencia de glicerol al 10%.

La secuenciación del DNA del exón X fue ejecutada con DNA genómico del probando y de los padres por el método del dideoxinucleótidos terminal (*kit* Sequitherm - Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA) y con cebadores de las hebras sentido y

antisentido marcados con IRD 800 de acuerdo con el protocolo del fabricante. La separación electroforética se realizó en gel de acrilamida al 6% y urea 7 M

Los análisis de la secuencia de los fragmentos fueron realizados en el secuenciador automático LI-COR DNA 4000 con "software" del fabricante. El análisis por SSCP del producto de PCR del exón X en el probando de esta familia demostró la posible presencia de una mutación en este exón por un tercer fragmento atípico. Los resultados demostraron que el paciente heredó el cromosoma mutado de la madre (fig.32).

La secuenciación del exón X identificó la inserción una base A en la posición 1282. Esta mutación cambia el triplete TAT, por un codón de terminación TAA, sustituyendo una cisteína por un codón de terminación en la posición 428. La secuencia de las hebras sentido y contrasentido demostraron claramente la inserción en el DNA genómico del probando y la secuencia normal de los familiares no afectados.

El paso siguiente fue la búsqueda de una endonucleasa de restricción capaz de reconocer la secuencia mutada, que en este caso resultó ser la enzima *Mse I*, que posee la secuencia T↓TAA como sitio de restricción. El producto de PCR sin digerir posee 297 pares de bases, mientras que el producto de la digestión da origen a dos fragmentos de 155 y 142 pares de bases en el cromosoma mutado.

Polimorfismos de conformación de hebra simple (SSCP) de la familia CV10 de cavernomatosis cerebral

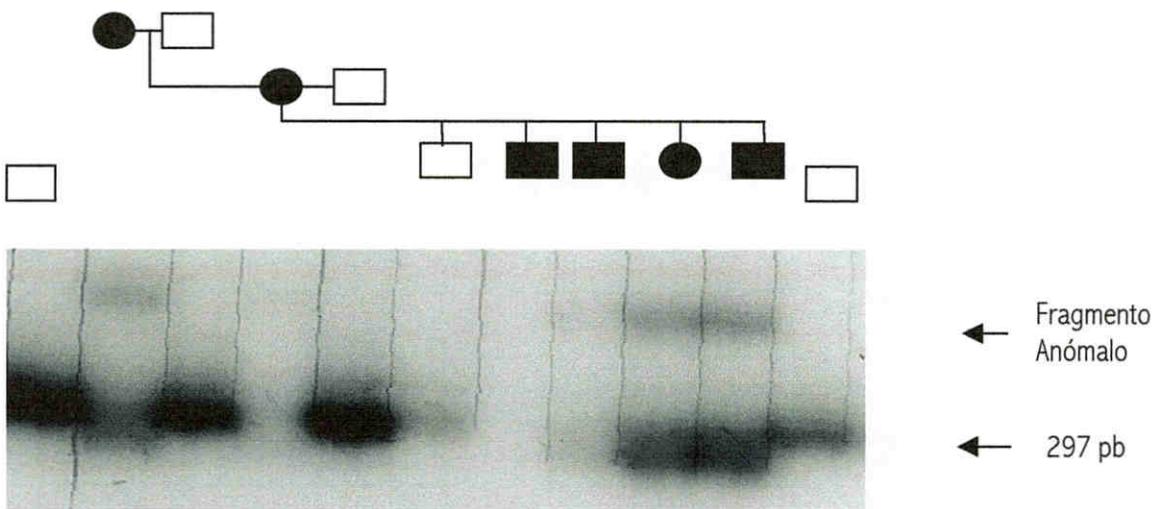


Fig. 33: Estudio de SSCP del exón X del gen KRIT-1 de la familia española CV 10. En la parte superior se representa el árbol genealógico de la familia. Alicotas de DNA genómico fueron amplificadas en una mezcla de PCR conteniendo $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP, cebadores y otros reactivos descritos en el método. Los productos de PCR del exón X fueron corridos en condiciones no desnaturizantes en acrilamida al 10% conteniendo 10% de glicerol por 16 horas a 20°C en un gel de 20 x 30 cm. Las bandas fueron reveladas después de 48 horas de exposición a rayo X.

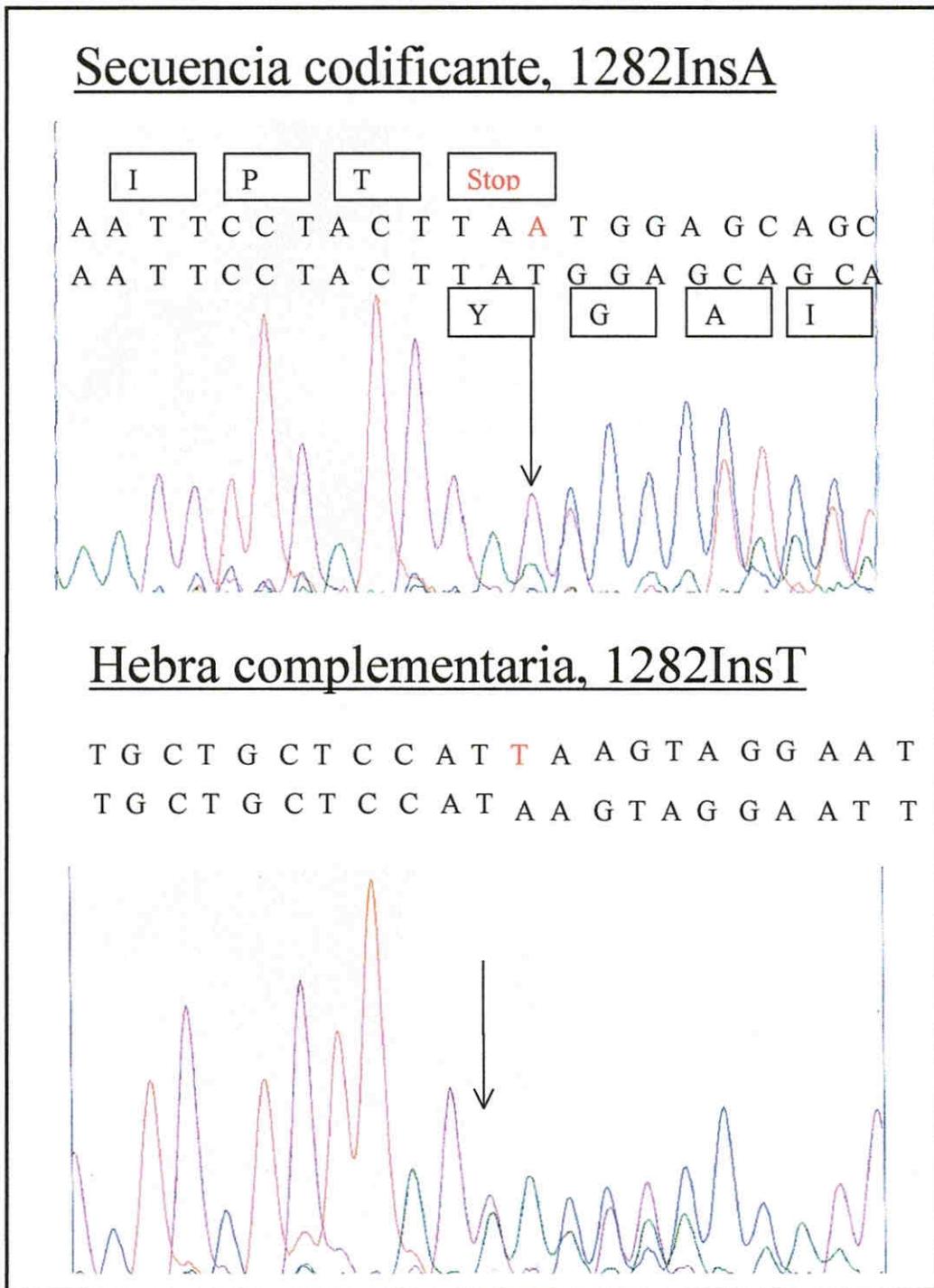


Fig. 34: Comparación de la secuencia normal y de la secuencia salvaje de las hebras sentido (panel superior) y antisentido (panel inferior) comprendiendo la inserción A/T en el exón X del paciente enfermo de la familia CV 10.

3.5 - Exones 1, 2, 5, 7, 8, 9, 11, y 12

Tras el análisis de este exón mediante PCR y SSCP no se detectó ninguna mutación en ninguno de estos exones en ninguna de las familias es-

tudiadas. La imagen del SSCP de todos los individuos estudiados presentaba un patrón uniforme, no apareciendo ninguna banda con migración anómala en la electroforesis.

```

5' GAGCTAAAATTCATTCAACTCTTACCCGATTTGTATACTGAAGATCTGATCCAAACAA
CTCGATTTTAAAGTAAGTTGAGAATGGGCTAAACATATGACTTCTAGACTAGGTTTGT

AGGGTTGTAAATACAGGTATCTGCTTTCTCTAGGGCTAACATTTTACTCTTTATTTCTA
TCCCAACATTTATGTCCATAGACGAAAGAGATCCCGATTGTAAAATGAGAAATAAGAT

CTGCACTATAGCCCATATGTAGTGAGTTTTCTGTCTGACCTGATTCAGTAGCATATGCA
ACGTGATATCGGGTATACATCACTCAAAGACAGACTGGACTAAGTCATCGTATACGTC

GATTTATGACATTAGTTTTTATCCGCTC 3'
CTAAATACTGTAATCAAAAATAGGCGAG 5'

```

Fig. 35: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - KI F y K1R.

```

5' AGCAATGTGGAGTAAAACCGAAACAGTACTTGTCTTCTGTGACACTGCTCATGCT
3' TCGTTACACCTCATTTTGGCTTTGTCATGAACAGAAGACACTGTGACGAGTACGA

TCTCTGCCATTTTTCTGTTTAGGTATTTGGATTTTGTAGTAGTCTGGAGCTCCTA
AGAGACGGTAAAAGGACAAATCCATAAACCTAAAACTCATCAGACCTCGAGGAT

GACCAAAGTATGGGATTTATTACCACTTTATCTACCTAGAAAGGGAAAACAATAAC
CTGGTTTCATACCCTAAATAATGGTGAAATAGATGGATCTTCCCTTTTGTATTG

AAAAACCCATTAAGAGC 3'
TTTTTGGGTAATTCTCG 5'

```

Fig. 36: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K2F y K2R.

```

5 'ATGCCTGGCTCTAACTATGAAGATAATTCTTACTGGTTTGTTAATTGCTTCCTTCAACA
TACGGACCGAGATTGATACTTCTATTAAGAATGACCAAACAATTAACGAAGGAAGCTGT

ATTTTGCAGCTTCTTCCCAGTTGTTTTGTTTGTTCCTTCACAAATATTTAATGGAGAT
TAAAACGACGAAGAAGGGTCAACAAAACAAACAAAAGAAGTGTTTATAAATTACCTCTA

CTTCCTTGTTGGTCTGTTATATGCTAGAAATGTGGGTGGGGAGGGGGGAAAAAAGGCATT
GAAGGAACAACCAGACAATATACGATCTTTACACCCACCCCTCCCCCTTTTTTCCGTAA

ACATA3'
TGTAT

```

Fig. 37: Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K5F y K5R.

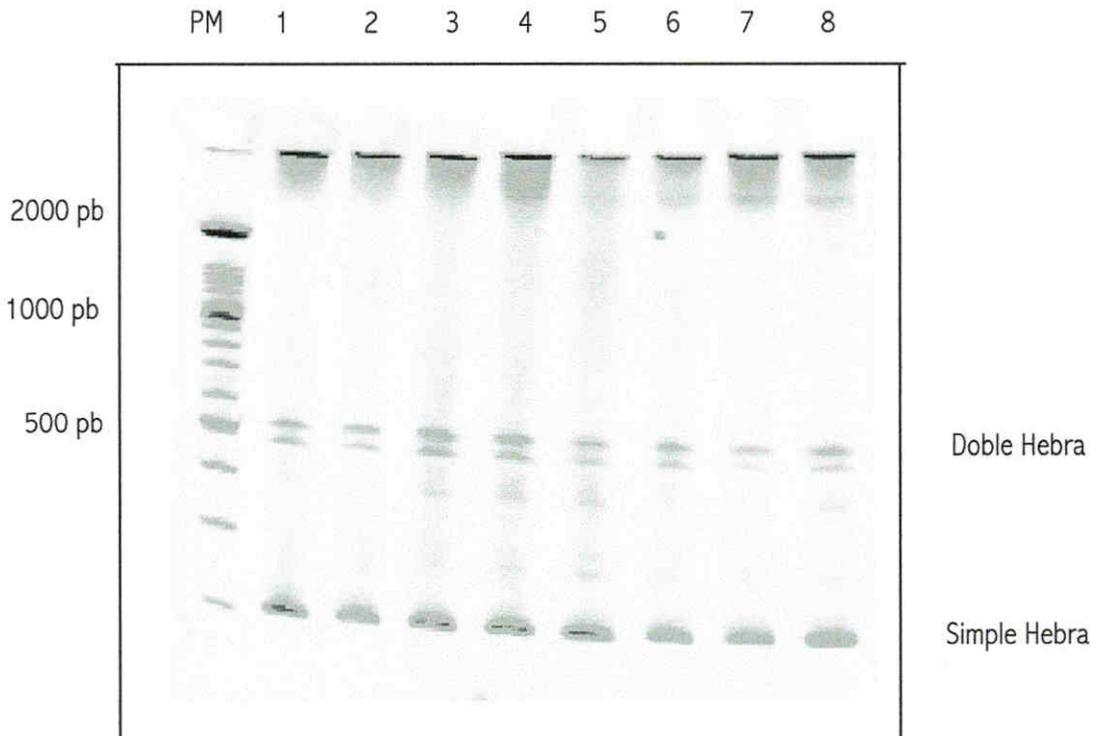


Fig. 38: SSCP representativo del estudio molecular del exón 5 en distintos individuos no emparentados. Se carece de un control positivo donde la presencia de una mutación produciría un cambio en la migración electroforética de la banda. Todos los SSCP negativos presentan una imagen similar, cambiando la altura de las bandas según el tamaño del fragmento.

```

5' ATTCTGCCTCTAGTGCTTACAATAGAACTCAACAGATTTTGTGCATTTAAATA
3' TAAAGACGGAGATCACGAATGTTATCTTTGAGTTGTCTAAAACACGTAAATTTAT

ACTGTAATAAGATTTCCAAGCAAACCTGTTTTTCAACTTCCAAGGGAAGTCTCAC
TGACATTTATTCTAAAGGTCGTTTGGACAAAAGTTGAAGGTTCCCTTCAGAGTG

ATCTCTTCTTAGAAAAAGCTGAGGTGTTTCCCTTTGAGGATCCAGATTAGTCAATT
TAGAGAAGAATCTTTTTCGACTCCACAAAAGGAACTCCTAGGTCTAATCAGTTAA

CAGCAAGTATTTCTGGCCAGTCACGAACATGTTGCAA3'
GTCGTTCATAAAGACCGGTCAGTGCTTGTACAACGTT5

```

Fig. 39: - Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K7F y K7R.

```

5' AGCATAGCACAAAGACCATGCATAATATTAATACTTACTTTAGGAAACCTTGC
3' TCGTATCGTGTTCTGGTACGTATTATAATTTATGAATGAAATCCTTTGGAACG

TTGTGTTTTTTACTCTCATAATTTCCATAGACTATTTGCAAAAGCAGACTTGC
AACACAAAAAATGAGAGTATTAAGGTATCTGATAAACGTTTTTCGTCTGAACG

CAATGTTATCAGCTTAGCATCAGGAGCTGTATAAAAGCCCTTCAATAAATTAT
GTTACAATAGTCGAATCGTAGTCCTCGACATATTTTCGGGAAGTTATTTAATA

ATCTGGCTTCATCAAAGAGAATAAGAATAGCTAGTGGGTCTTCAATCTTAAAG
TAGACCGAAGTAGTTTCTCTTATTCTTATCGATCACCCAGAAGTTAGAATTTT

GAAAAAGTATAATTTGGTTATTAGGCTACA3'
CTTTTTCATATTAACCAATAATCCGATGT5'

```

Fig. 40: - Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K8F y K8R.

```

5' TGTCTTTTCATTTCTATTAACAGCTTACCTTGTATTCATGAAGTATGCGATTTGTC
3' ACAGAAAAGTAAAGATAATTTGTCGAATGGAACATAAGTACTTCATACGCTAAACAG

CAGTGAGGTGCCTTACTTTTCAGTTTGGTAACAGGTACGATGGATTTTAGATTTTCT
GTCACTCCACGGAATGAAAAGTCAAACCATTGTCCATGCTACCTAAAATCTAAAAGA

TCACTGTAAGCACACATGCCAACATCCTTTAAATAAATCATCTTTAGTAGCTAAAGT
AGTGACATTCGTGTGTACGGTTGTAGGAAATTTATTTAGTAGAAATCATCGATTTCT

ATAGTAATCATTCTGTTACAAATGGCTTTCAGTAACGTAATT3'
TATCATTAGTAAGACAATGTTTACCGAAAGTCATTGCATTAA5'

```

Fig. 41: - Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K9F y K9R.

```

5' CAATAGTTTATGAAGTCCAAAATAAATGATACTTACCTGTTTTGTATGTAATAAAA
GTTATCAAATACTTCAGGTTTTATTTACTATGAATGGACAAAACATACATGATATTT

GCTCATTTTATTTTCCATGCTATGGATCTGAAAACAAGTATCAGTATCTCCCAATTGC
CGAGTAAAATAAAAGGTACGATACCTAGACTTTTGTTCATAGTCATAGAGGGTTAACG

CACATAAAACAACCATACTTAAGACTGATGAGTAAAGCCTGCAACATAATTGGAACA
AGTGTATTTTGTGGTATGAATTCTGACTACTCATTTCCGACGTTGTAGGAACTTTG

CTATATTGAAATACATATTAAAAACTTCACC3'
GATATAACTTTATGTATAATTTTTGAAGTGG

```

Fig. 42: - Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K11F y K11R

5 ' GTGGCTTGAGTAACAGTTACTTCTCTTTCATGAATTTCTTTCAGTGGGCATTAACTGT
CACCGAACACATTGTCAATGAAGAGAAAGTACTTAAAGAAAGTCACCCGTAATTGACA

CCATTTAGCTTCATTAACAGTTTTACCACGAGACCAGCCTACAAAGTAAAACATGTCA
GGTAAATCGAAGTAATTGTCAAATGGTGCTCTGGTCCGATGTTTCATTTTGTACAGT

ATTAAATATAAAACATGTAAGAATCTTTAAAGGACATTCATGACATT**GGCAGTTCCC**
TAATTTATATTTTGTACATTCTTAGAAATTTCTGTAAAGTACTGTAACCCGTCAAGGG

TATCTATT3 '
ATAGATAA

Fig. 43: - Secuencia amplificada con los cebadores sentido y antisentido - K12F y K12R.

4 - ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN CCM1 EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y PORTUGUESA

Se realizó el estudio de mutaciones en el gen CCM1 por SSCP y por secuenciación directa en las 84 familias participantes del estudio. De estas, 62 (73,8%) familias eran españolas y 22 (26,2%) eran portuguesas.

Del total de 343 individuos incluidos en el estudio, 293 (85,4%) eran españoles y 50 (14,6%) eran portugueses, siendo que 198 (57,7%) de estos individuos eran sanos y 145 (42,3%) enfermos. De estos, 163 (47,5%) eran varones y 180 (52,5%) eran mujeres. De las mujeres, 155 (86,1 %) eran españolas y 25 (13,9%) eran portuguesas. De los varones 138 (84,6%) eran españoles y 25 (15,4%) portugueses. En el grupo español 45 familias eran portadoras de cavernomatosis familiar constituyendo un total de 236 individuos y 17 familias eran portadoras de cavernomatosis en forma única y constituían un total de 57 individuos. El grupo portugués estaba formado por 12 familias clasificadas como portadoras de cavernomatosis familiar con 26 individuos y 10 familias clasificadas como portadoras de cavernomatosis único con 22 individuos.

Entre los individuos estudiados hemos centrado nuestro interés en los

casos de cavernomatosis familiar o cavernomatosis múltiple. Estos casos se caracterizan por la presencia de más de un afectado por familia o bien la presencia de más de un cavernoma en la MRI. Como forma única (esporádica) hemos considerado aquellos individuos que poseían solamente un cavernoma en la MRI y no tenía ninguna pariente enfermo.

El grupo de controles sanos estaba constituido por 32 individuos con MRI negativa y no emparentados con los enfermos, siendo 15 (46,9%) varones y 17 (53,1%) mujeres, todos españoles.

De los 84 probandos, 62 (73,8%) eran españoles y 22 (26,2%) eran portugueses. De estos 40 (47,6%) eran varones y 44 (52,4%) eran mujeres.

La proporción mujer/varón en total de enfermos españoles fue 153/138 (1,1:1) y, en el total de enfermos portugueses 25/25 (1:1).

Entre los probandos de cavernomatosis hemos identificado 4 nuevas mutaciones. Los individuos portadores de estas mutaciones pertenecían a las familias CV 10, CV 36, CV 59 y CV 66, cuyas mutaciones se localizaban en los exones 10, 6, 3 y 4 respectivamente. La mutación encontrada en el exón 4 – CV 66, corresponde a un individuo de origen portugués.

Tabla 5: Distribución de los individuos estudiados

Agrupación	Nº Individuos	Porcentaje
Sanos	198	57,7%
Afectos	145	42,3%
Total	343	100%

Tabla 6: Distribución de las familias estudiadas

	Cavernomas Múltiples		Cavernomas Únicos		Total	
	Familias	Pacientes	Familias	Pacientes	Familias	Pacientes
Españoles	45	236	17	57	62	293
Portugueses	12	28	10	22	22	50
Total	62	264	22	79	84	343

Tabla 7: Resumen de los enfermos estudiados

	Varones			Mujeres		
	Enfermos	Sanos	Probandos	Enfermos	Sanos	Probandos
Españoles n=293	29	95	30	28	79	32
Portugueses n=50	2	11	10	0	13	12

Tabla 8: Resumen de los individuos participantes del estudio

	Españoles	Portugueses	Total
Mujeres	155	25	180
Varones	138	25	163
Probandos	62	22	84

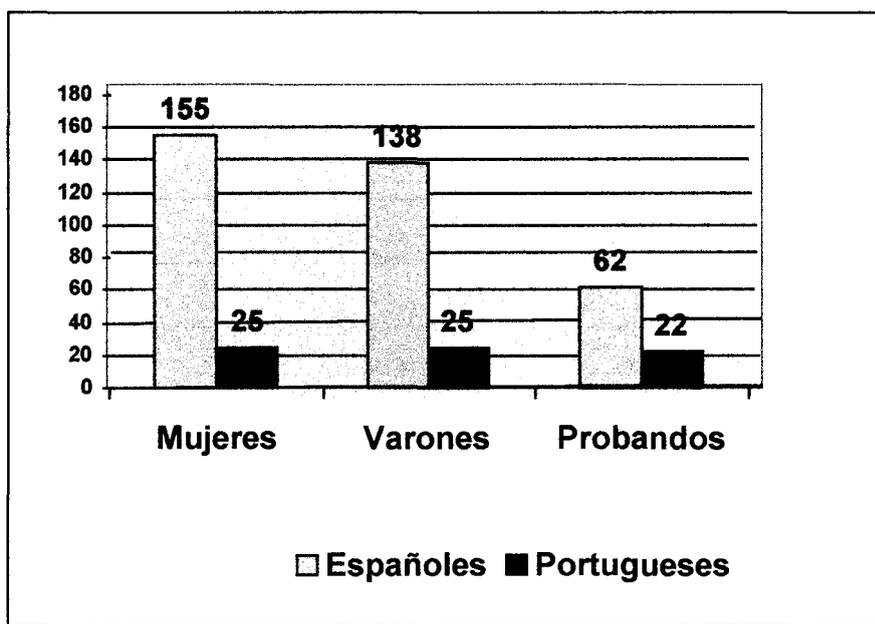


Fig. 44: Distribución de los individuos por nacionalidad y sexo

Tabla 9: Resumen de los resultados obtenidos con SSCP en los Probandos de cavernomatosis múltiple

Cavernomas Múltiples (N= 20)	Individuo Probando	SSCP	Exón Mutado
CV-2	II1	-	+
CV-3	II3	-	+
CV-4	I1	-	+
CV-7	I1	-	+
CV-10	III3	Positivo	10
CV-15	II2	-	-
CV-17	II1	-	-
CV-21	I5	-	+
CV-24	II1	-	+
CV-25	II2	-	+
CV-27	II2	-	+
CV-28	II3	-	-
CV-29	II3	-	-
CV-30	II2	-	-
CV-31	I1	-	-
CV-32	I2	-	-
CV-59	II3	Positivo	3
CV-66	I1	Positivo	4
CV-80	II7	-	-
CV-86	II3	-	-
CV-36	III3	Positivo	6

Tabla 10: Resumen general de los resultados en cavernomas en la población estudiada.

Cavernomas	
Individuos: total	343
Individuos españoles	293
Individuos portugueses	50
CV múltiples: total	264
CV múltiples españoles.	236
CV múltiples portugueses	28
CV únicos: total	79
CV únicos españoles	57
CV únicos portugueses	22

1 - LA LOCALIZACION DE KRIT-1

El hecho de que el gen CCM1 esté localizado en 7q21-22; brazo corto del cromosoma 7 es particularmente interesante. Alteraciones cromosomiales en una variedad de cánceres como por ejemplo, desórdenes mieloides y miomas uterinos frecuentemente están relacionadas a alteraciones en 7q22 (Kere et al, 1987; Luna-Finemam et al, 1995; Ogata, 1993). Por el momento el papel de Krev-1 en este tipo de enfermedades malignas no ha sido investigado. Teniendo en cuenta que Krev-1 regula la actividad de Ras, deleciones en el gen KRIT-1, que funciona como regulador positivo de la actividad de Krev-1, podrían alterar indirectamente el mecanismo de Ras y toda la función normal de la célula.

Krev-1 puede interaccionar con otras proteínas. Parece ser que KRIT-1 puede tener una función específica relacionada a Krev-1 aunque esto no se ha comprobado todavía. Debido a la frecuente asociación de los dominios ankirina con proteínas citoesqueléticas es probable que KRIT-1 pueda actuar en un compartimento celular específico. Un mejor entendimiento del gen CCM1 y de la proteína KRIT-1 nos posibilitaría comprender mejor el papel de Krev-1 en el desarrollo de tumores y en el control del crecimiento celular.

2 - EXPRESIÓN DEL GEN KRIT-1

Con vista a la expresión del mRNA de CCM1 es intrigante que el fenotipo de la enfermedad se limite exclusivamente al tejido cerebral.

Las células endoteliales son el tipo celular predominante en los cavernomas y puede que sean las células de origen de la lesión. La pérdida de función de CCM1 podría iniciar una expansión clonal de un grupo de células endoteliales que resultaría en la formación un tejido vascular anormal (Zhang, 2000).

Las mutaciones con pérdida de función originan la pérdida del 50% del producto proteico. El 50% restante debería ser suficiente para mantener la función celular normal, sin embargo esto no ocurre en el caso de la cavernomatosis. En este caso la mutación origina un producto proteico que no solo no es funcional, sino que además podría inhibir la función de la proteína producida por el alelo normal en heterocigotos o perturbar el desarrollo de la maduración o la supervivencia de un tipo celular diferente cuya ausencia resultaría en la estructura deficiente observada en las lesiones. Es posible que otros genes posan influenciar la expresión de malformaciones vasculares en heterocigotos llevándoles a la predisposición a mutaciones (Mikka Vikkula). De manera similar podría existir una proteína que modularía la expresión del gen mutado. La existencia de una proteína con estas características es apoyada por el hecho de que la penetrancia de CCM1 es variable. Además está el problema de la heterogeneidad. La identificación de otros genes puede ayudar a entender los eventos involucrados en la etiopatogenia de los cavernomas y puede aclarar las razones de por qué las lesiones ocurren fundamentalmente en los vasos sanguíneos.

Por último el estudio de la expresión del gen y el análisis del tejido lesionado podría ayudar a aclarar

dudas teniendo en cuenta que las lesiones son causadas por un grupo de genes, cuyas funciones probablemente están relacionadas, aunque podrían ser distintas.

3 - LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA KRIT-1

La cuestión central de mayor interés para muchos investigadores en este momento es la función de la proteína KRIT-1. Indicios sobre la función de la proteína en parte vienen de su aislamiento inicial como pareja de krev-1.

La homología entre Krev-1/rap1a y Ras, su habilidad para interactuar con la mayoría de los efectores de ras *in vivo* sugieren que krev-1 actúa como supresor tumoral en la célula. Krev-1 secuestra el complejo Ras-Gap actuando como un inhibidor competitivo de la interacción Ras-Gap.

Rap1 tiene funciones distintas en morfogénesis y/o en reclutamiento de complejos proteicos para sitios diáxia. Esto se ha concluido con base en análisis genéticos de células eucariotas. Además Krev-1 funciona durante un ciclo ligado a GTP y GDP. Esto indica que Ras puede ser importante para entender la función de Krev-1. La localización de Krev-1 en vesículas endocíticas lisosomiales en fibroblastos, su abundante expresión y rápida activación en células especializadas tales como plaquetas y neutrófilos, y su regulación por tres segundos mensajeros muy comunes indican que la función de Krev-1 en el proceso general de transmisión de señales, podría estar ligado a endocitosis y exocitosis.

Si mutaciones en KRIT-1 activa o desactiva señales en krev-1 permanece sin determinar.

4 - PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA KRIT-1

La mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento causan codón de terminación prematuro. La proteína truncada y el hipotético aminoácido que falta en el dominio que interacciona con Krev-1 demuestra la pérdida completa de la función celular. El efecto predominante de la mutación que crea un codón de terminación prematuro antes de la porción distal del exón es la degradación selectiva y eficiente del transcripto mutante derivado de este alelo. Es probable que algunos o todos los alelos pierden su función debido a la degradación del mRNA más que a la expresión de una proteína estructuralmente deficiente.

Este mecanismo también sería compatible con el requerimiento de una segunda mutación y consecuentemente pérdida completa de función del gen CCM1 en desarrollo individual de los cavernomas.

Es intrigante que el fenotipo de la enfermedad se limite exclusivamente al tejido cerebral. Una vez que células endoteliales son el tipo celular predominante en CCM, estas células son un atractivo candidato como células de origen de la lesión. La pérdida de función de CCM1 podría iniciar una expansión clonal de un grupo de células endoteliales que resultaría en la formación un tejido vascular anormal.

Alternativamente la pérdida de función puede perturbar el desarrollo de la maduración o la supervivencia de un tipo celular diferente cuya ausencia resultaría en la estructura

deficiente observada en las lesiones. Por último el estudio de la expresión y análisis del tejido lesionado podría ayudar a aclarar dudas.

5 - FUNCIÓN DE LOS NUEVOS EXONES

Algunos grupos de investigación (Sahoo et al, 2001; Eerola I et al, 2001) han identificado exones adicionales en la extremidad 5' de la secuencia codificante de KRIT-1, que extendían la región N-terminal en 207 aminoácidos. Cuando la secuencia completa de la proteína KRIT-1 fue usada para sistemas di-híbridos KRIT-1 no interactuaba con krev 1.

La interacción entre KRIT-1 y Krev-1 sugirió que KRIT-1 estaba implicada en la cascada de señalización mediada por GTPasas. (Zhang et al, 2000; Serebriiski et al, 1999).

La secuencia completa de KRIT-1 interactúa con icap 1, una proteína que funciona como modulador de la integrina $\beta 1$. Icap1 está asociada al dominio citoplasmático y su interacción con KRIT-1 sugiere un papel para KRIT 1 en la angiogénesis mediada por la integrina $\beta 1$. Las integrinas son proteínas de la membrana celular que en su mayoría interactúan con la matriz celular. Constituyen un grupo de aproximadamente 20 moléculas distintas y estructuralmente relacionadas. (Howe et al, 1998; Brooks et al, 1996; David et al, 1999). Están formadas por dos cadenas o subunidades alfa y beta Su papel específico todavía no está claro.

Icap1 fue identificada a través de su interacción con la integrina $\beta 1$ en un di-híbrido de levadura (Chang et al, 1997). El dominio NPXY de la integrina $\beta 1$ juega un importante papel

en su interacción con icap1. Los nuevos aminoácidos identificados en la porción N-terminal de KRIT-1 pueden mascarar una porción de la proteína que producía la interacción con Krev1.

La expresión de KRIT-1 disminuye la interacción entre icap1 α y la integrina $\beta 1$ sugiriendo que la integrina $\beta 1$ y KRIT-1 compiten por el mismo sitio en icap1 α y tal vez constituyan mecanismo de regulación.

6 - BÚSQUEDA DE MUTACIONES

6.1 - POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE HEBRAS SIMPLES - SSCP

El objetivo de este estudio era identificar las mutaciones responsables por la cavernomatosis cerebral familiar en población española y portuguesa. Estudios previos han demostrado que mutaciones en el gen CCM1 son responsables de un 50% de los casos de cavernomatosis en población francesa e hispanoamericana de Norteamérica. Nuestros estudios han confirmado que efectivamente mutaciones en el gen CCM1 son la causa del desarrollo de cavernomatosis cerebral familiar, pero no en esta proporción.

Para identificar los individuos portadores de mutaciones en el gen CCM1 se optimizaron los protocolos para la realización del SSCP para todos los exones estudiados. Para ello se barajaron diversas condiciones de electroforesis para separar las dobles hebras de los fragmentos de PCR. Los varios parámetros optimizados fueron:

- Temperatura de electroforesis: temperatura ambiente y a 4°C.
- Concentración de acrilamida: 6 y 10%.

- Concentración de glicerol del gel: sin glicerol y glicerol al 10%.
- Proporción de acrilamida/bisacrilamida del gel: 19/1, 29/1 y 37,5/1.
- Tiempo de electroforesis: desde 45 minutos hasta 3 horas.

A pesar de todas estas variaciones, las mutaciones detectadas en nuestro estudio fue de un 20% en el grupo de cavernomas múltiples. Inicialmente este resultado nos llevó a pensar en la sensibilidad incompleta de los análisis de SSCP, pero después de varios intentos con la introducción de diversos cambios en la electroforesis nuestra experiencia nos lleva a suponer que la mutación responsable por cavernomatosis cerebral familiar en los individuos diagnosticados clínicamente de cavernomatosis cerebral familiar y con SSCP normal estaría localizada en los loci CCM2 y CCM3, pudiendo también estar localizadas en la secuencia complementaria de CCM1, posteriormente publicada por T. Sahoo (2000).

Como se puede observar en las figuras, todas las mutaciones claramente identificadas por SSCP fueron confirmadas por secuenciación directa.

Hemos observado algunos resultados dudosos, donde la presencia del fragmento no era suficientemente claro, permitiendo un margen de duda considerable. En estos casos se procedió a la secuenciación directa del exón, pero en ninguno de los casos se ha podido confirmar la mutación. Este hecho nos llevó a concluir que cuando existe una mutación la imagen del SSCP es clara. Pero sin embargo, podría darse el hecho de que la mutación responsable por la enfermedad estuviera localizada en la región intrónica. En este caso sería necesario la realiza-

ción del estudio de búsqueda de mutaciones a nivel de RNA.

El presente estudio confirmó que mutaciones en el gen CCM1 contribuyen para el proceso de transformación en los vasos cerebrales. Nuestros datos son compatibles con resultados de estudios previos de genética molecular en cavernomatosis cerebral familiar que demuestran que un 50% de los afectados poseen una mutación en el gen CCM1. Nuestros datos presentan un 20% de mutaciones en el grupo afectado por cavernomatosis familiar, sugiriendo que en el restante de la población española y portuguesa las mutaciones en el gen CCM1 responsables por el desarrollo de la cavernomatosis cerebral familiar podría encontrarse ubicada en los loci CCM2 y CCM3, o en los nuevos exones del locus CCM1 del gen CCM1, que fueron posteriormente publicados por T. Sahoo (2000).

Otra posibilidad sería la sensibilidad incompleta para el análisis de SSCP.

7 - ESTUDIO DE LAS FAMILIAS AFECTADAS

Inicialmente se estudiaron 84 probandos pertenecientes a las 84 familias diagnosticadas clínicamente de cavernomatosis. A todos ellos se extrajo el ADN de la sangre periférica y se analizaron las mutaciones mediante SSCP como descrito en material y métodos.

El "screening" por SSCP realizado en este estudio demostró la presencia de 4 nuevas mutaciones en el gen CCM1. El fallo en la detección de mutaciones en algunas familias manifiesta la sensibilidad incompleta del análisis por SSCP, la existencia de

otros loci y la necesidad de un estudio para los nuevos exones descritos posteriormente por T. Sahoo (2000).

Todos los 4 individuos en los que se detectaron mutaciones en el gen CCM1 fueron claramente diagnosticados de cavernomatosis.

De los 84 probandos en los cuales no se detectó ninguna mutación, se consideró que esto podría ser debido a la insensibilidad del método utilizado o que probablemente estos individuos poseen una mutación que se encuentra presente en otro loci o en la zona del gen descrita posteriormente. También existe la posibilidad de que el individuo esté afectado por una mutación esporádica auténtica en las cuales las mutaciones no son detectables en sangre periférica.

8 - FAMILIA CV 36 - EXÓN 6

Los síntomas clínicos del probando fueron compatibles con una mutación de origen materna, en adición a los antecedentes de epilepsia en el abuelo. Ambos probando y la madre se quejaban de dolores de cabeza. Los resultados de los dos CCMs en el probando, pero no en los padres sugería un CCM no heredado. Sin embargo, la forma familiar de CCM no era excluida por las consideraciones relevantes mencionadas debido a la penetrancia variable en esta enfermedad.

Que el probando no haya heredado el alelo mutado de los padres indica que el paciente representa una mutación *de novo*. Esto está respaldado por los siguientes datos:

- el resultado de SSCP en el exón VI en el paciente, pero no en los padres y hermana.

- la demostración de la delección 741delTC en el exón VI del probando y la secuencia normal en ambos padres y hermana sana.

- la demostración de la delección del tanden AG en la hebra antisentido.

- la ausencia de recombinación en el intervalo de CCM1.

- la exclusión de una falsa paternidad/maternidad.

9 - MECANISMO DE KNUDSON

El mecanismo patogénico de CCMs podría ser similar a la formación del tumor neurocutáneo de esclerosis tuberosa tipo 2 (TSC2) donde la tuberina, producto del gen TSC2, funciona como una proteína de supresión tumoral por actuar como una GTPasa activadora para Krev-1/rap1a. La existencia de lesiones múltiples y únicas en formas esporádicas y hereditarias respectivamente sugiere el mecanismo de doble pérdida de Knudson en angioma cavernoso y evoca la forma hereditaria y esporádica de retinoblastoma. La gran variedad de mutaciones descritas en la forma hereditaria de angioma cavernoso sugiere un alto grado de mutación en el gen CCM1. Los resultados aquí descritos son la primera evidencia de mutación espontánea en el gen CCM1 causante de malformaciones cavernosas cerebrales. Sin embargo, una malformación cavernosa esporádica causada por una mutación tardía o somática en una única célula en el sistema nervioso puede ser excluida. De hecho, tal caso no sería detectable en DNA genómico extraído de leucocitos periféricos. El paciente probablemente tenía una mutación en la línea germinal como fue evidenciado por la delección en el

DNA genómico de leucocitos periféricos y la malformación cavernosa cerebral. Esto también significa que este paciente tiene una condición que probablemente es heredable por su descendencia. De hecho, el probando en este caso representa un efecto fundador para una nueva línea de individuos con malformación cavernosa en virtud de una nueva mutación.

10 - EFECTO FUNDADOR EN FAMILIAS DE IBEROAMÉRICA

Estudios previos han demostrado un cromosoma mutado en familias hispano americanas. Estos individuos poseen una mutación común, que consiste del cambio de una C a T en el nucleótido 742 del exón 6, llevando a la formación de un codón de terminación. Esta mutación está presente en 16 de 21 familias estudiadas por T. Sahoo(2000), demostrando la presencia de un efecto fundador. Nuestros análisis demuestran que las mutaciones encontradas en la población de la península Ibérica son distintas de las mutaciones encontradas en Hispanoamérica, llevándonos a suponer que los españoles no exportaron la enfermedad a Hispanoamérica durante el periodo de colonización. Si encontrásemos en la península un afectado que tuviese la misma mutación que la descrita en las familias de origen mexicano (742C-T) podríamos suponer que hubo un efecto fundador en un cromosoma español que fue exportado a América a través de un inmigrante (Laberge, 2000). También cabe la posibilidad de que todos los descendientes portadores de aquella mutación hubiesen fallecido, por lo que no habríamos podido correlacionar los defectos. En cualquier caso es muy probable que la enfermedad no haya sido

exportada de España a América (Touner-Lasserve, 2000).

11 - FAMILIA CV 59 - EXÓN 3

En esta familia de 14 miembros, el probando era una mujer con claros síntomas de cavernomatosis posteriormente comprobada por MRI.

Los análisis del DNA genómico mediante PCR y la secuenciación automática revelaron la presencia de una mutación en el exón 3 del gen CCM1, apoyando la hipótesis de que mutaciones en CCM1 causan cavernomatosis cerebral hereditaria.

Ambos, probando y hermana heredaron el cromosoma mutado de un progenitor afectado, lo que demuestra que el paciente es un afectado por cavernomatosis cerebral familiar y sin embargo, las tres hijas de la paciente no están afectadas por la mutación.

La secuenciación directa de KRIT-1 comprendiendo la zona correspondiente al exón III identificó un cambio de bases CC/AT en la posición 283, que cambia los aminoácidos 85 y 86 de la secuencia, sustituyendo una histidina por una glutamina y una arginina por un codón de terminación. La secuencia de las hebras demostraron claramente el cambio de las bases en el DNA genómico del probando y de su hermana y la secuencia normal de los familiares

12 - FAMILIA CV 66 - EXÓN 4

Esta familia de origen portugués estaba diagnosticada de cavernomatosis cerebral familiar basada en los síntomas y en el resultado positivo de la MRI, como todos los demás pacientes pertenecientes a este grupo.

Sus análisis de SSCP demostraron claramente la posible presencia de una mutación en el exón 4, por la presencia de una banda atípica con un patrón de migración electroforética distinto. El análisis del SSCP del padre del probando fue negativo.

La secuenciación directa del DNA del probando demostró la presencia de una delección de un par de bases CA en la posición 519, produciendo un cambio de una glutamina por un ácido glutámico en el codón 145. Esta delección producía además el cambio en la pauta de lectura de 11 aminoácidos (QILLNHPETDR), que termina con un codón de terminación en el aminoácido 55.

El cambio producido por la delección CA/GT anula el sitio de restricción para la enzima *Rsa* I, de forma que el individuo mutado posee tres fragmentos de 286, 194 y 92 pares de bases; mientras que el padre que era sano presentaba solamente el fragmento de 286 pares de bases.

Estos resultados demuestran que el alelo mutado ha sido heredado por vía materna, a pesar de la imposibilidad de analizar el DNA materno, debido a que la madre no ha participado del estudio.

13 - FAMILIA CV 10 – EXÓN 10

Este estudio reveló claramente la presencia de una mutación en los individuos afectados que consistía de la transición de una A a G en la posición.

Los síntomas clínicos del probando fueron compatibles con una mutación de origen materna, en adición a los antecedentes de epilepsia en

el abuelo. Ambos probando y la madre se quejaban de dolores de cabeza.

14 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El análisis molecular directo requiere una fórmula ágil y eficaz a fin de obtener la información necesaria en cada familia estudiada. En este sentido hemos elaborado una estrategia diagnóstica basándose en el estudio genético y en el análisis con marcadores genéticos. De este modo fue posible realizar el diagnóstico de portadores y en familias de alto riesgo, con una informabilidad y una fiabilidad elevada.

1 - A nivel molecular la heterogeneidad de la cavernomatosis cerebral familiar supone una seria dificultad diagnóstica. Como la enfermedad está causada por tres genes, hasta el momento parece fenotípicamente indistinguible si todos los tres defectos genéticos actúan a través del mismo mecanismo molecular o si existe un mecanismo distinto que produzca el disturbio en la formación de los vasos sanguíneos o en la maduración (Jun Zhang, 2000).

Todas las mutaciones detectadas en la población española y portuguesa son de baja frecuencia, de forma que el estudio genético de la cavernomatosis a nivel de la población en general es inviable.

En este estudio ampliamos el núcleo familiar a otros parientes (tíos, primos, etc.) que representen riesgo de ser portadores.

La identificación del gen CCM1 ha permitido conocer la estructura de la proteína KRIT-1, pero no su función en la célula. La no funcionalidad de la proteína puede deber-

se a una conformación anómala de la molécula que disminuye su actividad normal o una síntesis incompleta de la cadena de aminoácidos, en cuyo caso puede ser degradado o carecer de funcionalidad.

En definitiva el tipo de mutación determina si hay o no proteína y si es o no funcional.

Finalmente con una perspectiva de futuro, debemos considerar estudios que demuestren que una pequeña cantidad de proteína sea suficiente para mantener la actividad normal de la célula.

2 - Con el desarrollo del diagnóstico genético mediante el análisis y detección directa de mutaciones, el diagnóstico prenatal y presintomático se hacen factible para la cavernomatosis cerebral familiar. Los individuos con alto riesgo pueden someterse a examen para determinar si han heredado la mutación antes de que desarrollen síntomas clínicos del trastorno. En el caso de la cavernomatosis el diagnóstico presintomático puede ser útil en portadores del gen causante de la enfermedad.

15 - USO DE LA SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA EN EL DIAGNÓSTICO DE CCM

Análisis genéticos con alta sensibilidad y especificidad aumentarían la exactitud diagnóstica incluso en paciente asintomáticos y también mejoraría el entendimiento de la evolución clínica, caracteres histológicos y estrategias de tratamiento.

Según el genetista americano Doug Marchuck miembro del equipo de investigadores de la universidad de Duke, la primer señal clínica de la enfermedad suele ser ataque epiléptico o muerte. Un test de DNA sería completamente fiable. Si sabes que un individuo es un paciente afectado, se puede tratar la enfermedad antes del inicio de los síntomas.

16 - PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los genes responsables por los síndromes genéticos frecuentemente codifican proteínas que actúan en puntos críticos del mecanismo que controla el proceso biológico como por ejemplo división, diferenciación y muerte celular. Estos estudios llevarán al descubrimiento de nuevos genes y nuevos productos bioquímicos involucrados en la enfermedad, los cuales jugarían un papel fundamental en el proceso biológico normal.

Estudios de angiogénesis, en desórdenes vasculares con el objetivo de conocer estas patologías y el papel de los genes y de sus productos posibilitaría el entendimiento de la base molecular de la patología y el papel de la proteína en el desarrollo vascular normal. Estos estudios también se están realizando en ratones transgénicos para determinar si los factores identificados en el modelo animal también se identifican en humanos. El modelo animal además de ayudar en el entendimiento de la patofisiología de la enfermedad, serviría para identificar otros factores genéticos y ambientales que posan alterar el fenotipo.

CONCLUSIÓN

V - CONCLUSIONES

- 1 - La presencia de mutaciones en el gen CCM1 en los individuos enfermos y su ausencia en los controles sanos demuestran que mutaciones en CCM1 (KRIT-1) son la causa de la enfermedad.
- 2 - Las mutaciones en el gen CCM1 son responsables por el 20% de los casos de cavernomatosis familiar en la población de Iberoamérica.
- 3 - La secuenciación de los 12 exones del gen CCM1 reveló la presencia de cuatro nuevas mutaciones en los exones 3, 4, 6 y 10.
- 4 - Los españoles no llevaron la cavernomatosis a América. Nuestra población no presenta la mutación 742T→C, encontrada en la población hispanoamericana de Norte América.
- 5 - Las cuatro nuevas mutaciones identificadas podrán utilizarse como marcador genético para diagnóstico molecular en individuos enfermos, en individuos sanos y en asintomáticos.
- 6 - Estos resultados contribuirán para el conocimiento de la etiología y patología de la cavernomatosis cerebral familiar.
- 7 - La ausencia de mutaciones en individuos afectados probablemente se debe a la presencia de mutación en otros loci o en la secuencia del gen publicada tras el inicio de nuestras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

VI - BIBLIOGRAFÍA

- Allard JC, Hochberg FH et al. Magnetic resonance imaging in a family with hereditary cerebral arteriovenous malformations. *Arch Neurol* 1989; 46: 184-187.
- Awad IA, Spetzler RF et al. Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly. I. Correlation with age and cerebrovascular risk factors. *Stroke* 1986; 17: 1084-1089.
- Awad IA, Robinson JR Jr et al. Mixed vascular malformations of the brain: Clinical and pathogenetic considerations. *Neurosurg* 1993; 33: 179-188.
- Baev NI, Awad IA. Endothelial cell culture from human cerebral cavernous malformations. *Stroke* 1998; 29(11): 2426-2435.
- Bos JL. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Raf. *EMBO* 1998, 17(23): 6776-6782.
- Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2423 - 2429.
- Craig HD, Gunel M et al. Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian forma of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Gen*, 1998; 7(12): 1851-1858.
- Curling O Jr, Kelly DL et al. An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *J Neurosurg* 1991; 75: 702-708.
- David FS et al. Integrins interact with focal adhesions through multiple distinct pathways. *J Cell Physiol* 1999; 181: 74 - 82.
- Davis RL, Robertson DM. *Textbook of Neuropathology*. Baltimore, Williams & Williams; 1997 pp785-822.
- Detwiler PW, Porter RW, Zabramski et al. De novo formation of a central nervous system cavernous malformation: implications for predicting risk of hemorrhage. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* 1997; 87: 629-632.
- Dobyns WB, Michels VV et al. Familial cavernous malformations of the central nervous system and retina. *Ann Neurol* 1987; 21: 578-583.
- Dubovsky J, Zabranski JM et al. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Molec Genet* 1995; 4 (3): 453-458.
- Eerola I, McIntyre et al. Identification of eight novel 5'-exons in cerebral capillary malformation gene-1 (CCM1) encoding KRIT-1. *Biochem et Biophys Acta* 2001; 1517: 464-467.
- Eerola I, Plate KH. et al.. KRIT-1 is mutated in hiperatotic cutaneous capillary-venous malformation associate with cerebral cavernous malformation. *Hum. Mol. Gen.* 2000, 9: 1351-1355.
- Frech M, John J et al. Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPases by the Krev-1 gene product. *Science* 1990; 249: 168-172.

- García-Moreno JM, Gamero MA, Lucas M et al. Familial cerebral cavernomatosis associate with angiomas. *Rev Neurol* 1998; 27(157): 484-490.
- Gil-Nagel A, Dubovsky J et al. Familial cerebral cavernous angioma: A gene localized 10 a 15 cM interval on chromosome 7q. *Ann of Neurol.* 1996; 39: 807 - 810.
- Gil-Nagel A, Wilcox KJ et al. Familial cerebral cavernous angioma: clinical analysis of a family and phenotypic classification. *Epilepsy Research*, 1995; 21: 27-36.
- Ginot F, Bordelais I et al. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of base overhangs. *Nuc Ac Res* 1996; 24(3): 540-541.
- Golemis E, Khazak V et al. Human/yeast complementation approaches to the study of oncogenic signaling and stress response. <http://www.fccc.edu/research/reports/golemis.htm>. 1995.
- Grothues D, Voss H et al. Separation of up to 1000 bases on a modified ALF DNA sequencer. *Nucl Ac Res* 1993; 21(25): 6042-6044.
- Günel M, Awad IA et al. Mapping a gene causing cerebral cavernous malformations to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6620-6624.
- Günel M, Awad IA et al. A founder mutations as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Eng J Med* 1996; 334: 946-951.
- Günel M, Awad IA et al. Genetic heterogeneity of inhered cerebral cavernous malformation. *Neurosurg* 1996; 28: 1265-1271.
- Günel M et al. Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurg* 1996; 50 (4): 441 (abstrat).
- Hayman LA, Evans RA et al. Familial cavernous angiomas: natural history and genetic study over a 5 year period. *Am J Med Genet* 1982; 11: 147-160.
- Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 578 - 585.
- Henkemeyer M, Rossi DJ et al. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking Ras GTPase-activating protein. *Nature* 1995; 377: 695-701.
- Hoang TA, Hasso AN: Intracranial vascular malformations. *Neuroimaging Clinics of North America* 1994; 4: 823-842.
- Howe Aa, Aplin AE et al. Integrin Signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 220-231.
- Hsu FPK, Rigamonti D and Duhn SL. Epidemiology of cavernous malformations. In Aead IA, Barrow DL (eds): *Cavernous malformations*. Park Ridge, IL. American Association of Neurological Surgeons 1993; pp 13-23, 205-213.
- Indira Rajagopal. All-in-one sequence analysis. *Science* 1999; 283: 652-653.

- Jean Mark. Two major signal pathways linked. *Science* 1993; 262: 988-990.
- Jellinger Kurt. Vascular malformations of the central nervous system: a morphological overview. *Neurosurgery Rev* 1986; 9: 177-216.
- Johnson EW, Iyer LM et al. Refined Localization of the Cerebral Cavernous Malformation gene (CCM1) to a 4 cM interval on chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. *Genome Research*, 1995; 5: 368-380.
- Jovita Mesquita. Métodos de Genética Molecular. 1999. Laboratorio de Genética Molecular. Universidad de Barcelona.
- Kondziolka D, Lunsford LD, Kestle JR. The natural history of cerebral cavernous malformations. *J Neurosurg* 1995; 83: 820-824.
- - Körkkö J, Annunen S et al. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1681-1685.
- Krakovski K, Bunville J et al. Rapid purification of fluorescent dye-labeled products in a 96-well format for high-throughput automated DNA sequencing. *Nucl Ac Res* 1995; 23(23): 4930-4931.
- Kwok PY, Carlson C et al. Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. *Genomics* 1994; 23: 138-144.
- Labauge P et al. Clinical and genetic study of 57 French familial cavernomas pedigrees. 1996; 38: 1265-1271.
- Labauge P, Enjolras O et al. An association between autosomal dominant cerebral cavernomas and a distinctive hiperkeratotic cutaneous vascular malformation in 4 families. *Ann of Neurol.* 1999; 45 (2): 250 - 254.
- Laberge S; Labauge P et al. Genetic heterogeneity and absence of founder effect in a series of 36 non Hispanic-American cerebral cavernomas families. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 499-504.
- Laberge-le Coutleulx S, Jung HH et al. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT-1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nature Genetics* 1999; 23: 189-193.
- Larry A. Feig. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr Op Cell Biol* 1994; 6: 204-211.
- Larson JJ, Ball WS Bove KE et al. Formation of intracerebral cavernous malformations after radiation treatment for central nervous system neoplasia in children. *J Neurosurg* 1998; 88: 51-56.
- Lundeberg J and Uhlén M. DNA mapping and sequencing technology. *Trends in Biotech* 1995; 13: 10-11.
- Lucas M, Costa AF et al. Germline mutations in the CCM1 gene, encoding KRIT-1, cause cerebral cavernous malformations. *Ann Neurol.* 2001, 49: 529- 532.

- Makoto Noda. Structure and functions of the krev-1 transformation suppressor gene and its relatives. *Biochem et Biophys Acta* 1993; 1155: 97-109.
- Malik D, Cohen BH et al. Progressive vision loss: a rare manifestation of familial cavernous angiomas. *Arch Neurol* 1992; 49: 170-173.
- Maraire N and Awad IA. Intracranial cavernous malformations: lesion behavior and management strategies. *Neurosurg* 1995; 37: 591-605.
- Moode S and Wolfman A. The 3rd of life: Ras, Raf and growth regulation. *TIG* 1994; 10(2): 44-48.
- Mullan S, Mojtahedi S et al. Cerebral venous malformation-arteriovenous malformation transition forms. *J Neurosurg* 1996; 85: 9-13.
- Mullikin JC and McMurray AC. Sequencing the Genome, *Fast*. *Science* 1999; 283: 1867-1869.
- - Numaguchi Y, Kitamura K et al. Intracranial venous angiomas. *Ssurg Neurol* 1982; 18(3): 193-202.
- OMIN 116860 - On Line Medelian Inheritance in Man
- OMIN 603284 - On Line Medelian Inheritance in Man.
- OMIN 603285 - On Line Medelian Inheritance in Man.
- Otten P, Pizzolato GP et al. 131 cases of cavernous angioma (cavernomas) of the CNS, discovered by retrospective analysis of 24.535 autopsies. *Neurochir* 1989; 35: 82-83.
- Pedro A. Lazo. Terapia génica humana: tendencias y problemas. *Medic clin* 12 (106); 469-475.
- Peeper DS, Upton TM et al. Ras signaling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* 1997; 386: 177-181.
- Petersen I, Ohgaki H et al. Direct DNA sequencing following SSCP analysis. *Anal Biochem* 1994; 218: 478-479.
- Polymeropoulos M. H., Hurko O et al. Linkage of the locus for cerebral cavernous hemangiomas to human chromosome 7q in four families of Mexican-American descent. *Neurology*, 1997; 48: 752 - 757.
- Pozzati E, Giuliani G et al. The growth of cerebral cavernous angiomas. *Neurosurg* 1989; 25: 92-97.
- Rao Venigalla B. Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Anal Biochem* 1994; 216: 1-14.
- Rao VB. Strategies for direct sequencing PCR-amplified DNA. *PCR Methods and Applications Manual Supplement*, 1994; 15-22.
- Rengachary SS, Kaylan-Raman UP. Telangiectasias and venous angiomas. In Wilkins RH, Rengachary SS (eds): *Neurosurgery* 1996. New York, McGraw-Hill, pp 2509-2514.
- Rigamonti D, Hadley MN et al. Cerebral cavernous malformations.

- Incidence and familial occurrence. *N Eng J Med* 1988; 319: 343-347.
- Rigamonti D, Johnson PC et al. Cavernous malformations and capillary telangiectasia: a spectrum within a single pathologicval entity. *Neurosurg* 1991; 28: 60-64.
 - Ronaghi M, Nygren M et al. Analysis of secondary structure in DNA by pyrosequencing. *Annal Biochem* 1999; 267: 65-71.
 - Rost B, Valencia A. Pitfalls of protein sequence analysis. *Curr Op Biotech* 1996; 7: 457-461.
 - Othbart D, Awad IA et al. Expression of angiogenic factors and structural proteins in central nervous system vascular malformations. *Neurosurgery* 1996; 38(5) 915-925.
 - Russel DS and Rubinstein LJ. Tumours and tumour-like lesions of maldevelopmental origin. In: DS Russel and LJ Rubinstein (Eds). 1989. *Pathology of Tumours of the Nervous System*. 5th edition. Williams and Wilkins, London, pp 664 -765.
 - Sahoo T, Goenaga-Diaz et al. Computational and experimental analyses reveal previously undetected coding exons of the KRIT-1 (CCM1) gene. *Genomics* 2000; 71: 123-126.
 - Sahoo T, Johnson EW et al. Mutations in the gene encoding KRIT-1, a krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2325-2333.
 - Saito Y and Kobayashi Naotoshi. Cerebral venous angiomas. *Neuro-radiology* 1981; 139: 87-94.
 - Sarwar M, McCormick WF. Intracerebral venous angioma. Case report and review. *Arch Neurol* 1978; 35: 323-325.
 - Sedwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *TIBS* 1999; 24: 311-316.
 - Serebriiskii I, Estojak J et al. Association of Krev1/rap1a with KRIT-1, a novel ankyrin repeat containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*. 1997; 15: 1043 - 1049.
 - Siegel AM. Familial cavernous angioma: an unknown, know disease. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 369-371.
 - Scheffzek K, Ahmadian MR et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPases activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277: 333-338.
 - Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *TIBS* 1997; 22: 53-58.
 - Terriza F, Amrani Y et al. Cavernomatosis Múltiple Familiar. *Rev Neurol* 1997; 25(49): 560-562.
 - Van den Boom D, Jurinke et al. Forward and reverse DNA sequencing in a single reaction. *Anal. Biochem* 1998. 256: 127-129.
 - Vikkula M, Boon LM et al. Molecular basis of vascular anomalies.

- Trends Cardiovasc Med, 1998; 8: 281-292.
- Webster AR, Fisher RB et al. Independent segregation of von Hippel-Landau disease and cerebral cavernoma. J Neurol Neurosurg and Psych 1997; 63: 665.-668.
 - Wong JH, Awad IA, Kim JH. Ultrastructural pathological features of cerebraovascular malformations: a preliminary report. Neurosurg 2000; 46(6): 1454-9.
 - Zabramski JM, Henn JS et al. Pathology of cerebral vascular malformations. Neuros. Clin. of North Am. 1999; 10 (3): 395 - 410.
 - Zabramski JM., Wascher TM et al. The natural history of family cavernous malformations: results of an ongoing study. J. Neurosurg. 1994; 80: 422 - 432.
 - Zabramski JM., Wascher TM et al. The natural history of family cavernous malformations: results of an ongoing study. J Neurosurg. 1994; 80: 422 - 432.
 - Zhang J, Clatterbuck RE et al. Mutations in KRIT-1 in familial cerebral malformations. Neurosurgery, 2000; 46(5): 1272-1279.

VII - ABREVIATURAS

A	Adenina
ADA	Adenosina desaminada
ATP	Adenosina 5' - trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
CCM1	Cerebral Cavernous Malformations 1
CdK	Ciclina dependiente de Kinasa
cDNA	ADN complementario
dGTP	Desoxinucleótidos guanina trifosfato
dATP	Desoxinucleótidos adenina trifosfato
dTTP	Desoxinucleótidos timina trifosfato
dCTP	Desoxinucleótidos citosina trifosfato
ddGTP	Dideoxinucleótidos guanina trifosfato
ddATP	Dideoxinucleótidos adenina trifosfato
ddCTP	Dideoxinucleótidos citosina trifosfato
ddTTP	Dideoxinucleótidos timina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos
DNA	Ácido desoribonucleico
EDTA	Etileno diamino tetracético
EST	Expresion Secuence Traduction (Secuencias de Expresión Codifica
ERK	Kinasas reguladoras de señales
G	Guanina
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosina difosofato
GTP	Guanosina trifosfato
Grb	Growth factor receptorbinding protein, prteína de unión a receptores de factores de crecimiento.
HCl	Ácido clorhídrico
IRD	<i>Infra Red Dye</i>
Kb	kilobases
KRIT - 1	Krev-1 interactive trapped

KREV-1	"Kirsten Reverter virus" 1
MAP	Proteínas activadoras de mitógenos
MgCl	Cloruro magnesio
Min	minutos
ml	mililitros
μl	microlitros
mRNA	RNA mensajero
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPXY	Asparagina, prolina, cualquier aminoácido, tirosina
OMIM	On Line Medelian Inherance in Man
ORF	"Open Read Frame" - Fragmento de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	"Polimerase Chain Reaction" - Reacion en cadena de la polimerasa
³²PdCTP	Desoxicitidina 5'-[α- ³² P] trifosfato
PSA	Persulfato amónico
RACE-	5' Rapid Amplificication of cDNA End Analysis.
Raf	Ras activated factor, factor activado por ras
Ras	Rous avian sarcoma, sarcoma aviar de Rous
Rap	Ras-related protein, proteína relacionada con ras
Rho	Ras homologous protein, proteína homóloga a ras
RNA	Ácido ribonucleico
RT- PCR	"Polimerase Chain Reaction - retrotranscription"
s	Segundo
SDS	Lauril sulfato sódico
SMART	Simple Molecular Architecture Research
SSCP	Polimorfismo conformacional de hebra simple
Sos	Son of sevenless, hijo de los siete
T	Timina
TBE	Tampón Tris-borato Edta
TEMED	N, N, N", N"-tetramethyllethylenedianino
TSC2	Tuberosis Esclerosa Tipo 2

Alzavira de Fatima Costa Alestius

genética Molecular de la Carcinomatosis
Cerebral Familiar

Sobresaliente

por UNANIMIDAD

18 Junio de 2003

El Vocal

El Vocal

El Vocal

El Presidente

El Secretario

El Doctorado

Posta

[Handwritten signature]

Aurora Galve
[Handwritten signature]

[Handwritten signature]