



Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica Médica
y Biología Molecular e Inmunología

ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE LA
CAVERNOMATOSIS: REGULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS
Y EXPRESIÓN DE *CCM1*

TESIS DOCTORAL DE:
Rufino Mondéjar García

DIRECTOR:
Miguel Lucas Lucas



Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica Médica
y Biología Molecular e Inmunología

Memoria realizada en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y en el Servicio de Biología Molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena, bajo la dirección de D. Miguel Lucas Lucas, doctor en Medicina y Cirujía.

CERTIFICAN QUE: D. Rufino Mondéjar García, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado “Estudio Molecular de los genes de la Cavernomatosis: Regulación de los transcritos y expresión de *CCMI*”, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor

Sevilla, 30 de abril de 2014

Fdo: Miguel Lucas Lucas

Agradecimientos

Siempre es complicado hacer unos agradecimientos ya que son muchas las personas que han posibilitado la realización de esta Tesis. En primer lugar, al Dr. Miguel Lucas le tengo que agradecer que volviera a acoger a residentes para que pudiéramos aprender un poco de Biología Molecular. Por suerte para mi fui el primero y me gustó. A Paqui, Mercedes, Rocío y Verónica por su ayuda en el laboratorio y los buenos momentos de risas y tapeito. A Amalia, por dar ayudarnos con el inglés y darle un último punto de calidad a los artículos.

A mis “co-Rs” Silvia y Berta, que me habéis apoyado desde el principio. Y al resto de residentes (sois muchos a lo largo de estos años en el Macarena) que siempre habéis estado ahí para un café, unas tapas, unas risas... A Concha, por apoyarme en el DEA y en la Tesis como en los años de Residencia. Y a toda la UGC de Bioquímica Clínica por los años compartidos, por el día y por las noches.

A los compañeros de la cátedra, los de “abajo” y los de “arriba”. Al “Pérez” no sólo por enseñarme y ayudarme con el Western sino también por apoyarme incesantemente y ser tan optimista. A Victor, Flori, Ketama, Jenny y los de “físio” por esas cervecitas desestresantes en el Pinto y en la Peña. Y a los de “arriba” (Elisabeth, Marga, María, y Javier) por permitirnos usar el ABI, ya que sin él no tendría la mitad de los resultados.

Al Servicio de Neurología del Hospital Virgen Macarena, en especial al Dr. Izquierdo y al Dr. García Moreno, por su colaboración e implicación en la Cavernomatosis. Al resto de Servicios que nos envíais muestras, en especial a la Dra. Benito (HU. Carlos Haya, Málaga) y a la Dra. Govea (HU. Son Espases, Mallorca) por vuestra dedicación y colaboración a la hora

de enviarnos muestras para hacer más estudios. También a todos los pacientes que habéis estado siempre dispuestos a colaborar para que sigamos investigando de diversas formas.

A la Fundación José Luís Castaño, por concederme la ayuda económica para comenzar en este proyecto tras la Residencia. Y a la Fundación Neuroinvest, por ofrecerme un contrato de investigación que me ha permitido continuar aprendiendo en este mundillo.

A mis amigos, muchos habéis pasado por esto y espero recuperar un poco la vida social tras esta etapa.

A mis padres y hermanos, por vuestro amor incondicional en todo momento.

A aquellas personas de las que me he olvidado y que se han merecido igualmente mi agradecimiento en estos años.

Estas últimas líneas las reservo para mi Rocío, que siempre estás a mi lado apoyándome incluso en estos tiempos tan duros. No te cansas de mi y sigues riéndote de mis tonterías. Eres y serás la más importante de mi vida.

Rufino

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

<i>Introducción</i>	1
1. Malformaciones vasculares cerebrales	2
2. Incidencia y prevalencia	3
3. Diagnóstico clínico	3
3.1. Características clínicas	4
3.2. Características radiológicas.....	5
3.3. Características histológicas	6
4. Tratamiento	7
5. Fisiopatología	8
6. Diagnóstico genético en pacientes con Cavernomatosis Cerebral	9
6.1. Gen <i>CCM1</i>	12
6.1.1. Mutaciones en <i>CCM1</i>	14
6.1.2. Papel de la proteína Krit1	16
6.2. Gen <i>CCM2</i>	18
6.2.1. Mutaciones en <i>CCM2</i>	19
6.2.2. Papel de la proteína Ccm2	20
6.3. Gen <i>CCM3</i>	23
6.3.1. Mutaciones en <i>CCM3</i>	24
6.3.2. Papel de la proteína Ccm3	25
7. Transcripción y splicing	26
7.1. Exones vs pseudo-exones.....	28
<i>Objetivos</i>	29
<i>Material y métodos</i>	31
1. Pacientes del estudio	32
2. Procedimientos de extracción de ADN	32
2.1. Medida de la concentración de ADN	33
3. Procedimientos para la detección de mutaciones en ADN en los genes <i>CCM1</i>, <i>CCM2</i> y <i>CCM3</i>	34
3.1. Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación.....	34
3.2. Secuenciación exón por exón	35
3.2.1 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de amplicones.....	38
3.2.2. Secuenciación	39
4. Aislamiento y cultivo de linfocitos	39
5. Procesamiento del ARN	40

5.1. Síntesis y amplificación del cDNA	41
5.2. Amplificación rápida de las terminaciones del cDNA (RACE)	43
5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	45
6. Otras herramientas bioinformáticas y análisis <i>in silico</i>.....	48
7. Análisis mediante <i>Western Blot</i>	49
<i>Resultados</i>	52
1. Sintomatología clínica de los pacientes CCM.....	53
2. Prevalencia de mutaciones de genes CCM en población española	54
2.1. Mutaciones detectadas en el gen CCM1	57
2.1.1. Delección de los exones 5' no codificantes	57
2.1.2. Mutación c.619_620delinsG.....	59
2.1.3. Mutación c.691A>G.....	61
2.1.4. Mutación c.801delA	61
2.1.5. Mutación c.842A>G	63
2.1.6. Mutación c.1114C>T	64
2.1.7. Mutación c.1314-1325del	65
2.1.8. Mutación c.1775G>C	66
2.1.9. Delección de los exones 12 a 16.....	67
2.2. Mutaciones en CCM2	69
2.2.1. Mutación c.30+1G>A.....	69
2.2.2. Mutación c.222G>A	71
2.2.3. Mutación c.713C>A	71
2.3. Mutaciones en CCM3	72
2.3.1. Mutación c.211delA	72
2.3.2. Mutación c.395+1G>C.....	73
2.3.3. Mutación c.474+5G>A.....	74
2.3.4. Mutación c.538dupA	75
2.4. Estudio de variantes alélicas	76
3. Diversidad transcripcional en el gen <i>CCMI</i>	80
3.1. Región 5' no codificante	80
3.2. Región codificante	82
3.3. Efecto del fenilbutirato en la transcripción de <i>CCMI</i>	87
3.4. Influencia de la región 5' no codificante en la transcripción de <i>CCMI</i>	89
3.5. Posibles nuevas isoformas de la proteína Krit1	89
<i>Discusión</i>	92
1. Prevalencia de mutaciones en los genes CCM	93
2. Diversidad transcripcional del gen <i>CCMI</i>	100
2.1. <i>CCMI</i> tiene múltiples sitios de inicio de transcripción	101
2.2. Múltiples variantes de splicing en región 5' no codificante	105
2.3. Nuevos exones en <i>CCMI</i>	106
2.4. Efecto del fenilbutirato en la transcripción de <i>CCMI</i>	107
2.5. Influencia de la región 5' no codificante en la transcripción de <i>CCMI</i>	109

3. Krit1 no se expresa como proteína completa..... 110
4. Consideraciones finales y perspectivas futuras 112
Conclusiones 115
Bibliografía..... 17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15	Figura 25 58	Figura 4977
Figura 26	Figura 26 59	Figura 5078
Figura 37	Figura 27 60	Figura 5179
Figura 49	Figura 28 60	Figura 5281
Figura 5 11	Figura 29 61	Figura 53.....82
Figura 6 12	Figura 30 62	Figura 54.....83
Figura 7 13	Figura 31 62	Figura 5583
Figura 8 13	Figura 32 64	Figura 5684
Figura 9 15	Figura 33 65	Figura 5785
Figura 10 16	Figura 34 65	Figura 5885
Figura 11 17	Figura 35 66	Figura 5986
Figura 12 18	Figura 36 67	Figura 6087
Figura 13 19	Figura 37 68	Figura 6188
Figura 14 20	Figura 38 69	Figura 6288
Figura 15 22	Figura 39 69	Figura 63.....89
Figura 16 23	Figura 40 70	Figura 64.....90
Figura 17 24	Figura 41 71	Figura 6591
Figura 18 27	Figura 42 72	Figura 6696
Figura 19 28	Figura 43 72	Figura 67101
Figura 20 35	Figura 44 73	Figura 68102
Figura 21 44	Figura 45 74	Figura 69104
Figura 22 45	Figura 46 74	Figura 70106
Figura 23 47	Figura 47 75	Figura 71109
Figura 24 57	Figura 48 76	Figura 72112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 12	Tabla 6 48	Tabla 1169
Tabla 2 36	Tabla 7 53	Tabla 1277
Tabla 3 37	Tabla 8 55	Tabla 1381
Tabla 4 41	Tabla 9 56	Tabla 1481
Tabla 5 46	Tabla 10 63	Tabla 1583

ABREVIATURAS

CCM	<i>Cerebral Cavernous Malformation</i>
cDNA	ADN complementario
DMSO	Dimetilsulfósido
MAF	<i>Minor Allele frequency</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MRI	Imagen por Resonancia Magnética
mRNA	ARN mensajero
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
UTR	Región no traducida

Título de Tesis: Estudio Molecular de los genes de la Cavernomatosis: Regulación de los transcritos y expresión de *CCM1*

Los cavernomas son malformaciones vasculares localizadas principalmente en sistema nervioso central (SNC). Estas lesiones se producen por la dilatación cavernosa de vasos sanguíneos sin ninguna intervención del parénquima nervioso. La prevalencia del 0.1-0.5% en la población general se dedujo de estudios seriados de autopsias, tanto en población Europea como Americana. La estimación real de la incidencia en la población es difícil de establecer por la penetrancia variable de esta enfermedad, habiendo muchos pacientes asintomáticos que solamente se detectarían por técnicas de imagen de resonancia magnética cerebral (MRI).

Los cavernomas dan cuadros de alteraciones neurológicas locales, con crisis de epilepsia, o generales tipo cefaleas y accidentes cerebro-vasculares con hemorragia. La penetrancia clínica es muy variable y a veces es incompleta con saltos generacionales asintomáticos. La penetrancia radiológica, estudiada mediante resonancia magnética de cerebro, es más fiable en relación al status de portador o paciente. El diagnóstico clínico se confirma por MRI, realizándose actualmente mediante tecnología eco-gradiente.

Las características fenotípicas de los pacientes con cavernomas destacan por ser muy variables dentro de una misma generación o en distintos sujetos que comparten la misma mutación, además de las notables diferencias en la edad de comienzo e incluso la existencia de generaciones aparentemente asintomáticas. Este fenómeno hace resaltar la importancia de la patogénesis en la malformación cavernomatosa de la que serían responsable tanto factores intrínsecos como otros extrínsecos, no genéticos. En otras palabras, la malformación cavernomatosa podría deberse a la existencia de fenómenos puramente genéticos, como son las mutaciones detectadas, o bien a otros mecanismos: epistáticos, epigenéticos o factores no genéticos que podrían plantear diferentes posibilidades patogénicas asociadas a la mutación de los genes de la cavernomatosis.

Dentro de los factores intrínsecos a la propia mutación, podrían plantearse las siguientes posibilidades patogénicas: haploinsuficiencia, pérdida de heterocigosidad, efecto dominante negativo de una proteína alterada o expresión anormal de los genes CCM por sesgo en la metilación de promotor.

Hasta la fecha, han sido asociados tres genes a la Cavernomatosis Cerebral (*CCM1*, *CCM2* y *CCM3*) (Craig *et al.* 1998). Más de 200 mutaciones han sido descritas en estos genes. Una característica importante es la naturaleza estereotipada de las mutaciones puesto que la mayor parte de ellas dan lugar a un codon de terminación prematuro (Cave-Riant *et al.* 2002; Verlaan *et al.* 2002).

Nuestro objetivo principal en esta Tesis ha sido el diagnóstico molecular de la Cavernomatosis Cerebral. Son ya muchos años desde que nuestro laboratorio comenzó el estudio molecular de esta patología (mayo de 1998). Desde entonces hemos podido estudiar 97 formas familiares y 45 casos

aislados, tanto clínicamente como por resonancia magnética así como por genética molecular (Lucas *et al.* 2000; Lucas *et al.* 2001; Ortiz *et al.* 2007). En este estudio describimos nuevas mutaciones no informadas en la literatura y analizamos las consecuencias de algunas de ellas. También analizamos algunos polimorfismos encontrados en los genes CCM.

De forma secundaria, profundizamos en el estudio de formas alternativas de mRNA, pensadas algunas de ellas en un principio como isoformas aberrantes y que son expresadas tanto en pacientes como en controles en cultivo de linfocitos y fibroblastos (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2002). Hemos valorado si algunos de los polimorfismos encontrados en *CCMI* puede tener alguna influencia en la formación de transcritos aberrantes. En este sentido no hemos encontrado ninguna relación, por lo que pensamos en una producción fisiológica. Sin embargo, hemos podido observar que *CCMI* se transcribe a través de distintos inicios de transcripción, repartidos por todo el gen. Este estudio lo hemos llevado a cabo mediante distintos abordajes metodológicos que incluyen técnicas como 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), RT-PCR y RT-qPCR.

Nos hemos aventurado en el estudio la compleja región 5' no codificante de *CCMI*, la cual transcribe múltiples isoformas de splicing, observándose que el patrón de splicing (relativo a ocho variantes) varía entre distintos tipos celulares. La región 5' no codificante juega un papel fundamental en el control de la expresión génica en células eucariotas a través de distintos mecanismos (modificaciones post-transcripcionales del RNA, como estructura secundaria y estabilidad del mRNA, y eficiencia traslacional (Regadas *et al.* 2013; Wang *et al.* 2005)).

Por otro lado, describimos nuevos exones que son transcritos e incluidos como formas minoritarias. Se ha visto que este tipo de exones están regulados positivamente en determinados tejidos de forma específica (Modrek & Lee 2003). Además, planteamos la posibilidad de que mutaciones en estos exones sean la causa del desarrollo de lesiones.

Finalmente, describimos la posible proteólisis de la proteína Krit1, codificada por *CCMI*. Con este nuevo hallazgo, planteamos un modelo de interacciones de las dos isoformas proteolizadas que compatibiliza con las interacciones descritas hasta la fecha.

Introducción

1. Malformaciones vasculares cerebrales

Las malformaciones vasculares cerebrales son lesiones relativamente comunes que representan un grupo heterogéneo de trastornos con una historia natural e implicaciones clínicas muy distintas. Estas lesiones pueden abarcar desde lesiones totalmente benignas, hasta serias discapacidades neurológicas e incluso la muerte en una proporción significativa de individuos. Las más comunes son las malformaciones arteriovenosas (AVMs) y las malformaciones cavernosas cerebrales (CCMs; OMIM 116860), que afectan de forma casi exclusiva al sistema nervioso central (tabla 1). Los síntomas asociados a estas malformaciones vasculares incluyen: infartos hemorrágicos debido a la ruptura de las lesiones, epilepsia y déficits neurológicos focales.

Tabla 1. Malformaciones vasculares del sistema nervioso central.
Telangiectasias capilares
Anomalías venosas del desarrollo (DVAs)
Malformaciones cavernosas (CCM)
Malformaciones arteriovenosas (AVM)

Las malformaciones cavernosas son lesiones de tipo venoso y no visibles mediante arteriografía, de ahí que fueran referidas como angiográficamente negativas debido a su flujo lento. Existen múltiples términos que se han empleado indistintamente para denominar estas lesiones, como son: angiomas cavernosos, cavernomas, hemangiomas cavernosos o malformaciones venosas cavernosas. Su prevalencia se estima, dependiendo de la serie entre 0,1- 0,5% (Lobato *et al.* 1988; Labauge *et al.* 2007) y se crean por la dilatación de agrupaciones de vasos sanguíneos bien delimitados sin intervención del parénquima (Rigamonti *et al.* 1991).

Las lesiones pueden ocurrir tanto de forma esporádica como en un contexto hereditario. A nivel familiar, la cavernomatosis cerebral presenta un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia clínica y radiológica incompleta. Mientras que

algunos cavernomas son clínicamente silentes, otros pueden llegar a causar convulsiones, hemorragias o déficits neurológicos focales.

2. Incidencia y prevalencia

Las lesiones cavernomatosas representan el 5-15% de todas las malformaciones vasculares del sistema nervioso central. Los cavernomas pueden ser asintomáticos y encontrados de manera casual en el curso de una exploración mediante resonancia magnética. Sin embargo, el 50-70% llegan a evidenciarse en edad adulta, entre la segunda y cuarta década sin distinción de sexos. También se han descrito casos de cavernomatosis cerebral en la infancia (Garcia-Morales *et al.* 2002).

La incidencia real de los cavernomas es difícil de estimar, debido a que pueden estar mezclados con otros tipos de malformaciones vasculares (Rigamonti *et al.* 1991). Sólo existen datos aproximados de lo que acontece en la población general a través de estudios de autopsias y de resonancias magnéticas. En 1991, dos estudios (Del, Jr. *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1991) analizaron una gran serie de resonancias magnéticas, estimando una prevalencia del 0,39% y 0,47%. Estudios posteriores confirmaron estos datos estableciéndose la prevalencia de la enfermedad en la población general según la serie analizada entre el 0,1 y 0,5% (Lobato *et al.* 1988; Labauge *et al.* 2007).

3. Diagnóstico clínico

Los cavernomas pueden dar cuadros de alteraciones neurológicas locales, con crisis de epilepsia, o generales tipo cefaleas y accidentes cerebro-vasculares con hemorragia. De hecho, la hemorragia intracraneal es la complicación más temida, ya que puede provocar una grave discapacidad o incluso la muerte (Cordonnier *et al.* 2008). Actualmente, el estándar de oro en la detección de las lesiones de CCMs, es la imagen por resonancia magnética (MRI) en

eco gradiente en T2, debido a que clínicamente pueden compartir sintomatología con otras malformaciones vasculares o con microhemorragias cerebrales de distinta etiología. Los enfermos de cavernomatosis cerebral se pueden clasificar en dos grupos:

1. Forma familiar. Se considera así cuando hay más de un enfermo en la familia o un solo afecto con múltiples lesiones (cavernomatosis múltiple).
2. Forma esporádica. Se considera como tal cuando se trata de un único enfermo y con un solo cavernoma en MRI con eco-gradiente.

Existen estudios que apuntan a la posibilidad de que un 75% de los casos esporádicos sean en realidad formas familiares, con lesiones asintomáticas que enmascaran el patrón de segregación autosómico dominante (Labauge *et al.* 1998). Por otro lado, el diagnóstico genético viene a confirmar los datos de MRI.

3.1. Características clínicas

Los enfermos de cavernomatosis cerebral suelen mostrar un cuadro de alteraciones neurológicas con crisis epilépticas locales o generales, cefaleas y accidentes cerebrovasculares. Las crisis epilépticas suelen ser el síntoma clínico más común ya que están presentes en un 40-70% de los casos sintomáticos (Zabramski *et al.* 1994), los déficits neurológicos focales se manifiestan en un 35-50%, y las cefaleas aparecen en un 10-30% de los casos. Las crisis convulsivas crónicas son típicas de las lesiones hemisféricas superficiales, el déficit neurológico focal es más propio de lesiones de tronco o supratentoriales profundas, y las cefaleas, la progresión de clínica previa o síndrome de hipertensión intracraneal son consecuencia de una hemorragia lesional (Iza-Vallejo *et al.* 2005). Los déficits neurológicos pueden presentarse como debilidad muscular, parálisis, pérdida o deficiencia en el tacto, audición y visión. Es importante resaltar que estos pacientes pueden presentar un cuadro clínico muy variable, lo que puede complicar inicialmente el diagnóstico clínico de la enfermedad.

3.2. Características radiológicas

Los cavernomas suelen localizarse a nivel supratentorial (80% casos) aunque pueden detectarse en cualquier lugar del tronco cerebral (Blitstein & Tung 2007). Se han descrito también casos de lesiones desarrolladas en la retina y a nivel cutáneo. La tomografía computarizada (TC) con contraste intravenoso detecta tan solo el 30-50% de las lesiones, con el consiguiente infradiagnóstico de la enfermedad si solo se emplea esta técnica (Vaquero *et al.* 1987). Como hemos comentado antes, la imagen por resonancia magnética es la prueba de elección para detectar las lesiones, donde su apariencia es variable dependiendo del estadio de la hemorragia (figura 1). En ella, los cavernomas pueden visualizarse como “una palomita de maíz” con un borde de pérdida de señal debido a la hemosiderina. El parénquima cerebral circundante suele ser normal. La mayoría de los cavernomas suelen presentar un tamaño inferior a los 3 cm, siendo muchos de ellos milimétricos. Sin embargo, puede haber lesiones de gran tamaño denominados cavernomas gigantes.

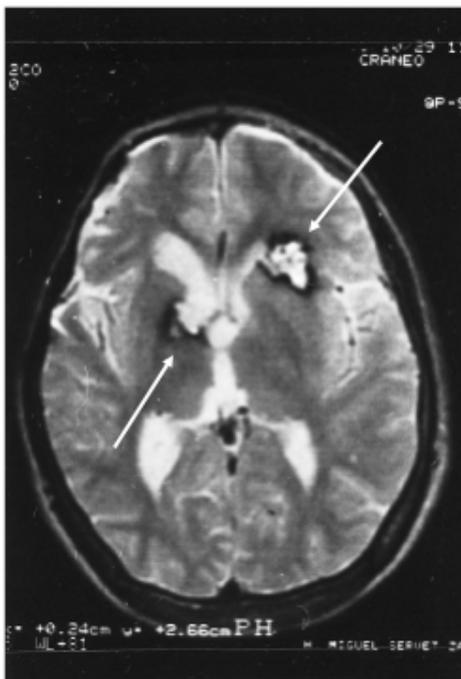


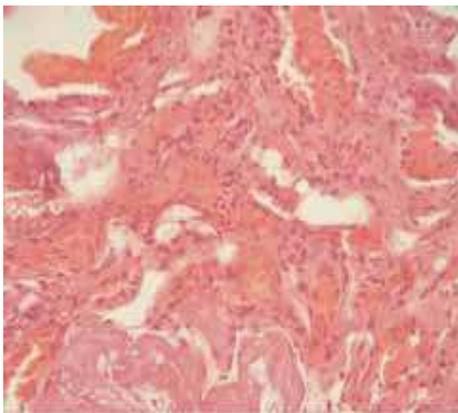
Figura 1. Imagen por resonancia magnética en Eco gradiente en T2 del paciente CV36, en la que se observan dos lesiones tipo “palomita de maíz”.

En aproximadamente un 15-20% de los casos puede hallarse más de una lesión, donde en más del 80% de los pacientes son de tipo familiar, mientras que tan solo hay un 15% de lesiones múltiples en los casos no familiares. Cuando existen lesiones múltiples hay mayor

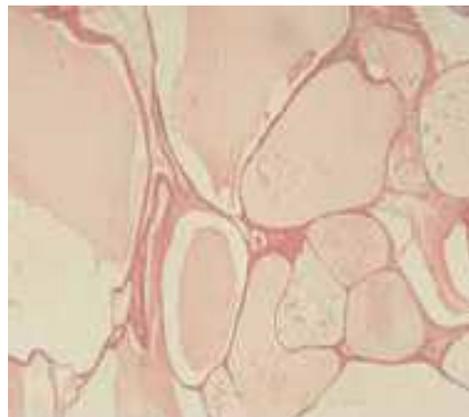
riesgo y tendencia al sangrado, por lo que estos pacientes suelen debutar con clínica a una edad más temprana (Cortes Vela *et al.* 2012).

3.3. Características histológicas

A examen microscópico, los cavernomas están formados por canales vasculares dilatados de distintos tamaños, que se encuentran tapizados por un epitelio fino y débil carente de capa elástica y muscular, lo que predispone al sangrado. La no existencia de un parénquima cerebral entre ellos es su característica histológica principal y que las diferencia de las telangiectasias capilares. La presencia de microhemorragias y cicatrización fibrosa es un hallazgo constante en los cavernomas, independientemente de si son o no sintomáticos, así como grados variables de gliosis en su periferia, macrófagos cargados de hemosiderina y calcificaciones. La membrana basal, situada normalmente bajo el endotelio, está ausente y muchos de los vasos dilatados contienen trombos (Zabramski *et al.* 1994). Episodios recurrentes de hemorragias y trombosis llevan al depósito gradual de hierro, en forma de hemosiderina, y gliosis en el tejido cerebral que rodea la lesión, dando lugar a un “anillo periférico” (Zabramski *et al.* 1999).



A



B

Figura 2. La figura **A** es una imagen histológica de un cavernoma cerebral con tinción de hematoxilina-eosina (H/E) que muestra una abundancia de áreas vasculares en el interior de estas lesiones. La figura **B** muestra un corte de H/E de un cavernoma cerebral, que objetivan los típicos espacios vasculares separados por finos tabiques conectivos (Imagen tomada con permiso de Iza-Vallejo *et al.* 2005)).

A nivel macroscópico, son nódulos de color azulado que contienen hemorragias en distintos estadios. Debido a los sangrados repetidos, se encuentran rodeados por una pseudocápsula de cerebro gliótico teñido de depósitos de hemosiderina. Estas características histológicas condicionan su apariencia radiológica (Cortes Vela *et al.* 2012).

4. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento de elección establecido para la cavernomatosis cerebral, ya que no todos los pacientes siguen un curso clínico agresivo, y por ello, las diferentes estrategias van a depender de la evolución natural de las lesiones en cada uno de los casos. La cirugía (figura 3) debe ser considerada en todos los enfermos con episodios de hemorragias recurrentes, deterioro neurológico progresivo o crisis epilépticas intratables. En pacientes jóvenes con lesiones accesibles, la resección puede ser beneficiosa tanto para controlar la epilepsia como para reducir la evolución del déficit neurológico y en prevención de posibles nuevas hemorragias. En enfermos con lesiones localizadas en regiones críticas habrá que valorar las posibles complicaciones que se puedan presentar en función de la historia natural de la propia lesión.

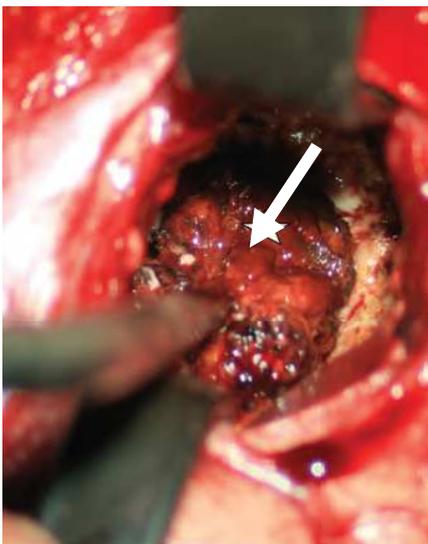


Figura 3. Fotomicrografía que muestra la eliminación de una lesión cavernomatosa grande (flecha blanca) que está siendo eliminada. Imagen modificada de Nussbaum 2013.

Otra alternativa es la radiocirugía, pero inicialmente este tratamiento presenta una serie de dificultades. Por un lado, es difícil establecer la zona de irradiación precisa, ya que el hematoma habitualmente ocupa un gran área y suele ocultar las verdaderas dimensiones de la lesión. Además, la frecuencia de las lesiones en el troncoencéfalo limita la dosis de radiación y, al ser malformaciones angiográficamente negativas, no se dispone de ninguna técnica que confirme el resultado del tratamiento. Por ello, se debe comparar con la evolución natural. Por otro lado, parece que la radiocirugía no elimina el riesgo de sangrado en comparación con la resección completa de la microcirugía (Iza-Vallejo *et al.* 2005).

A nivel farmacológico hasta ahora se ha tratado la sintomatología que presentaba el paciente. Recientemente, se ha abierto la puerta a nuevos tratamientos específicos que podrían disminuir el tamaño de la lesión y restaurar la morfología vascular en ratones (Maddaluno *et al.* 2013).

5. Fisiopatología

El proceso de desarrollo de las lesiones cavernomatosas es aún incierto, aunque la transición endotelial-mesenquimal (EndMT) parece estar implicada. Esta transición ha sido descrita en otras patologías, y es definida por la adquisición por parte del endotelio de características más propias de células mesenquimales y de células madre. Maddaluno y colaboradores mostraron en ratones que la ruptura del gen *CCM1* en el endotelio induce EndMT. En este proceso factores de crecimiento, como el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), y la vía de señalización de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) son activados mediados por una sobreexpresión de la proteína BMP6, de forma más específica en endotelio cerebral (Maddaluno *et al.* 2013). Es por ello que esta transición parece contribuir al desarrollo de las lesiones principalmente a nivel cerebral.

Pacientes con mutaciones que producen pérdida de función en cualquiera de los tres genes CCM desarrollan lesiones similares. Esto soporta la idea de un mecanismo de actuación

común para las proteínas codificadas por estos genes. Las interacciones moleculares de las proteínas CCM con diferentes vías de señalización conforman un complicado puzzle, que intentaremos desgranar más adelante.

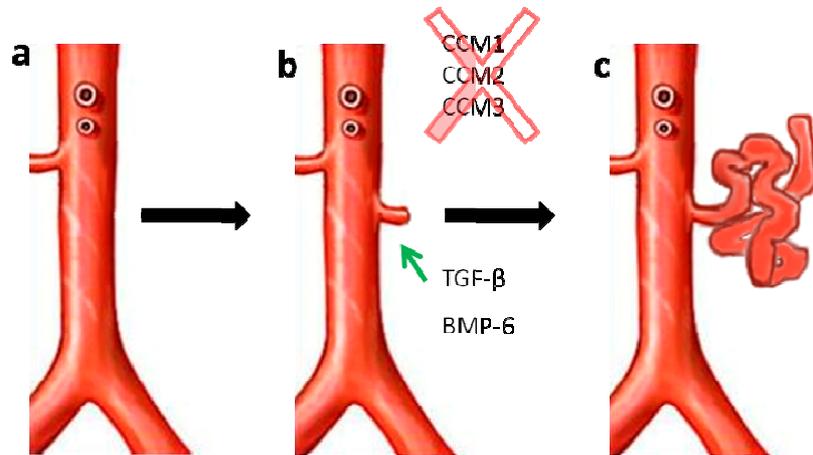


Figura 4. Proceso de formación del cavernoma. a) Territorio venoso cerebral normal. b) Comienzo de la lesión debido a una transición endotelial a mesenquimal provocada por la pérdida de expresión de uno de los genes CCM. c) Desarrollo y agrandamiento de la lesión sin control ni orientación específica.

6. Diagnóstico genético en pacientes con Cavernomatosis Cerebral

Tras el establecimiento del diagnóstico clínico y radiológico de cavernomatosis, el análisis genético debe ser llevado a cabo. Para realizar un estudio coste-efectivo es importante conocer la prevalencia de mutaciones en esta patología. Así, por ejemplo, en la Península Ibérica se ha observado una alta prevalencia de una delección de 14 pares de bases (pb) en el exón 5 de *CCM2* (Ortiz *et al.* 2007). Sin embargo, la mutación c.1363T>C en *CCM1*, altamente prevalente en población hispana (Sahoo *et al.* 1999), no es detectada en pacientes españoles (Lucas *et al.* 2000). El gen *CCM1* es el responsable del 56% de las mutaciones encontradas en formas familiares, mientras que *CCM2* lo es del 33% de ellas y *CCM3* solo del 6%. Existe aún un alto porcentaje de familias en las que no ha sido detectada la mutación responsable. Por otro lado, grandes delecciones han sido identificadas en pacientes con cavernomatosis en los tres genes CCM (Felbor *et al.* 2007; Gaetzner *et al.* 2007; Liquori *et al.* 2007; Riant *et al.* 2013b).

Por todo esto, el algoritmo que usamos en nuestro laboratorio es el que describimos a continuación (figura 5). Realizamos una primera búsqueda de deleciones en los tres genes CCM mediante kits de MLPA (Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification)(P130 y P131, MRC Holland) y el análisis de la deleción prevalente de 14 pb en el gen *CCM2* mediante PCR y digestión o secuenciación directa. Si el número de copias es normal y la deleción de 14 pb es negativa, procedemos entonces a secuenciar de forma seriada las regiones exónicas e intrónicas adyacentes de los genes CCM. Esto es, secuenciamos primero el gen *CCM1*, después *CCM2* y finalmente *CCM3*. En el caso de encontrar una mutación que introduzca un codón de parada prematuro (mutaciones *nonsense* o *frameshift*) daríamos por finalizado el estudio debido a que estas mutaciones producen pérdida de funcionalidad y son por ello patogénicas. Por otra parte, si localizamos una mutación que produzca un cambio de aminoácido (mutación *missense*), una transición silente o mutación intrónica, debemos de secuenciar los tres genes CCM. En estos casos junto con mutaciones producidas en región de splicing, sería recomendable un análisis más profundo. A nivel de cDNA se ha observado que este tipo de mutaciones pueden tener consecuencias inesperadas en el correcto splicing del ARN mensajero (Riant *et al.* 2013b; Verlaan *et al.* 2002).

En la década de los 90 los estudios de ligamiento mediante microsatélites permitieron establecer tres loci ligados a la cavernomatosis cerebral: CCM1, CCM2 y CCM3 (figura 6). El primero de ellos fue el locus CCM1, situado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21-q22). Inicialmente se realizó un estudio de ligamiento en un intervalo de 33-cM en el brazo largo de este cromosoma, delimitado por los microsatélites D7S502 y D7S479 (Dubovsky *et al.* 1995; Riant *et al.* 2013b). Posteriormente fueron confirmados estos resultados e incluso se consiguió reducir el intervalo de estudio a 4-cM, delimitado por D7S2410 y D7S689 (Johnson *et al.* 1995).

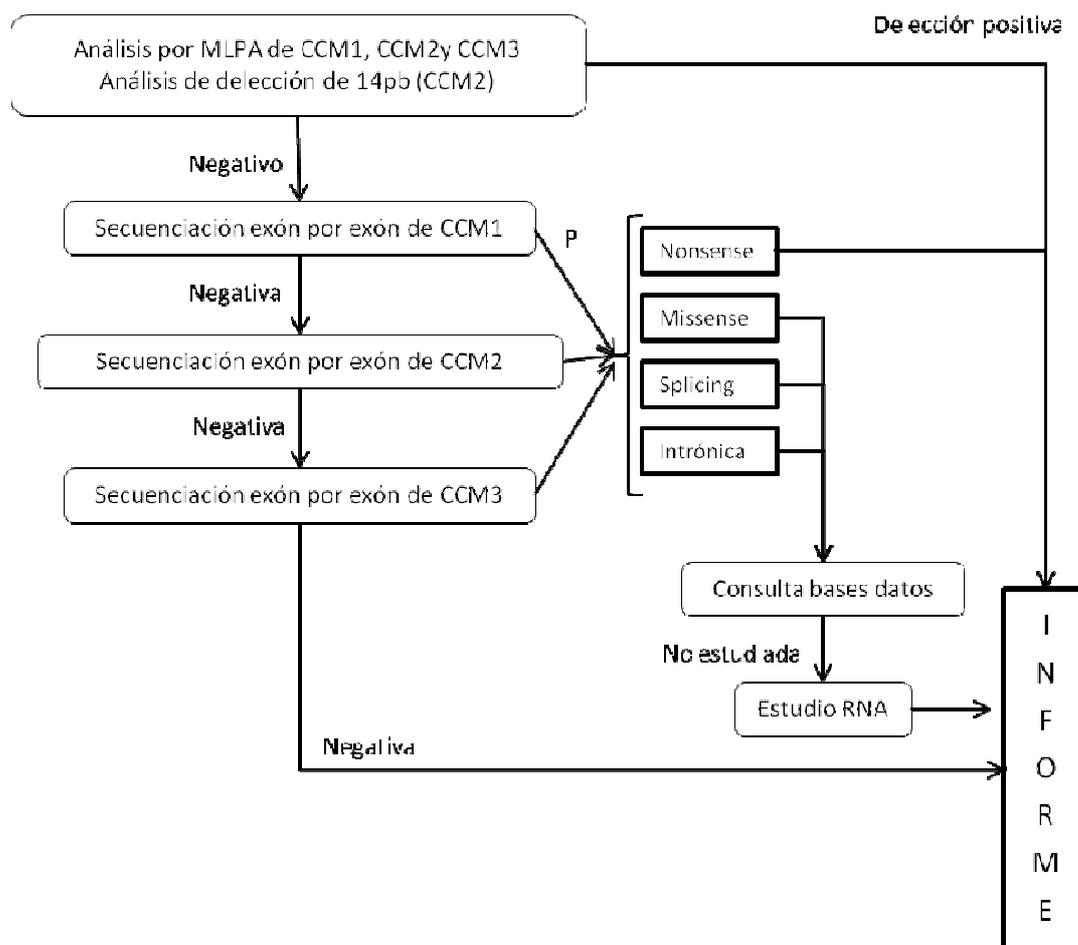


Figura 5. Algoritmo usado en nuestro laboratorio para el estudio genético de cavernomatosis. P: detección positiva

En el estudio realizado por Günel y colaboradores encontraron dos familias que no estaban ligadas al locus CCM1, lo que les llevó a pensar en la posibilidad de otro gen implicado en la enfermedad (Günel *et al.* 1996). Posteriormente, en otro estudio realizado en 20 familias de origen no hispánico observaron que solo 8 de ellas estaban ligadas al locus CCM1. En el mismo realizaron un análisis de ligamiento de genoma completo y establecieron dos nuevas localizaciones asociadas a la cavernomatosis, situadas en el brazo corto del cromosoma 7 (7p13-15, locus CCM2) y en el brazo largo del cromosoma 3 (3q25.2-27, locus CCM3). Aún con ello, había familias no ligadas a estas 3 localizaciones genómicas, por lo que un cuarto locus, CCM4, fue propuesto (Craig *et al.* 1998) y hasta la fecha no ha sido establecido. Estos resultados fueron confirmados años después, reduciendo el intervalo de 22-

cM hasta 7,5-cM en el locus CCM2 (Denier *et al.* 2004) y hasta 970 kb en el locus CCM3 (Bergametti *et al.* 2005).

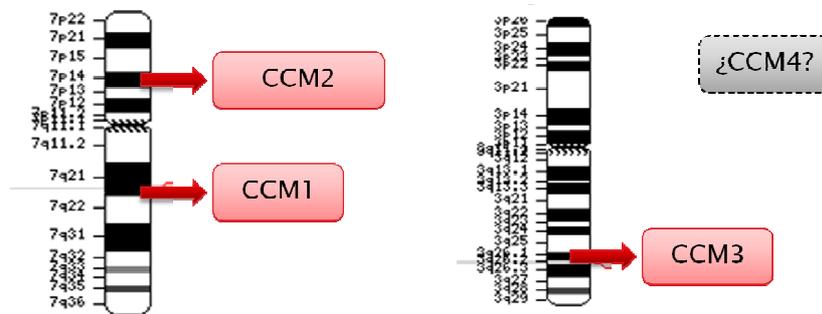


Figura 6. Localización cromosómica de los genes CCM

6.1. Gen *CCM1*

Tras el establecimiento de la primera región genómica ligada a la cavernomatosis cerebral, Sahoo y colaboradores identificaron CCM1 como el gen asociado a la cavernomatosis. En un principio se estableció que este gen tenía un tamaño de 37,7 kb y que estaba dividido en 12 exones (Sahoo *et al.* 1999). Se aisló un cDNA que comprendía 1986 pb con una cola de poli-A adicional de 18 pb. El codón de iniciación ATG se encontraba localizado a 26 pb del extremo 5' y se obtenía una secuencia de 529 aminoácidos (Serebriiskii *et al.* 1997). Posteriormente, otros estudios desvelaron la existencia de 7 nuevos exones, orientados hacia el extremo 5', de los cuales solo 4 de ellos eran codificantes (Eerola *et al.* 2001; Sahoo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000). Distintas variantes con exones alternativos en la región 5' no codificante han sido descritas, no alterando el codón de inicio de traducción (figura 7). Estos nuevos exones codificaban 207 aminoácidos adicionales a los 529 aminoácidos conocidos hasta entonces.

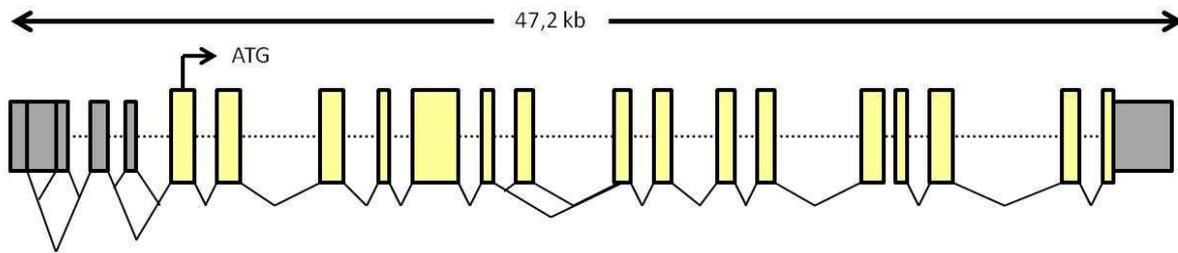


Figura 7. Representación de la estructura del gen *CCMI*. En la imagen se observan diversos splittings alternativos, producidos especialmente en los primeros exones.

Actualmente, la secuencia completa de la proteína Krit1 contiene un total de 736 aminoácidos. A nivel estructural, la proteína contiene varios dominios (figura 8):

- Secuencia de localización nuclear (NLS), aminoácidos 46-51 (Zawistowski *et al.* 2005).
- 3 motivos NPXY/F, localizados entre los aminoácidos 191-194, 231-234 y 250-253. Estos dominios son vistos por interactuar con dominios fosfotirosina (PTB).
- 3 dominios tipo ankirina, entre los aminoácidos 287 y 384. Los dominios tipo ankirina están presentes en muchas proteínas y parecen regular las interacciones entre proteínas.
- Dominio FERM (Family Erzin, Radixin and Miosin), entre los aminoácidos 416 y 640. Los dominios FERM intervienen en las uniones entre proteínas citoplasmáticas y de membrana. Además, se divide en tres subdominios (F1 a F3), teniendo F3 propiedades de unión a fosfotirosina.

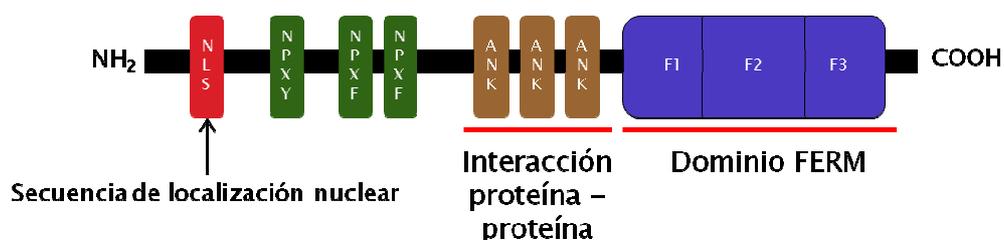


Figura 8. Representación de los dominios estructurales de la proteína Krit1.

Como podemos ver en la figura 8, la proteína Krit1 combina distintos tipos de dominios. Otra peculiaridad radica en los dominios FERM, que en el resto de las proteínas que los contienen están localizados en el extremo N-terminal; sin embargo, en Krit1 este dominio está situado hacia el extremo C-terminal.

6.1.1. Mutaciones en *CCMI*

Hasta el momento se han descrito más de 150 mutaciones para el gen *CCMI*. En un estudio con 21 familias hispanoamericanas se describió la transición c.1363C>T que daba lugar al cambio de una glutamina por un codón de terminación prematuro (p.Q455X). Esta mutación fue hallada en todos los miembros afectados en 16 de las 21 familias del estudio. La identificación de un haplotipo común en los individuos afectados de esta población sugirió un efecto fundador (Sahoo *et al.* 1999). Nuestro grupo de investigación demostró que no existía tal efecto fundador en la población española y que nuestra población de estudio no presentaba esta mutación (Lucas *et al.* 2000). Por otro lado, mutaciones en línea germinal han sido también descritas (figura 9) (Lucas *et al.* 2001). Se descartó una posible falsa maternidad o paternidad mediante el análisis de microsatélites. Es de señalar que esta mutación germinal hace que la paciente se convierta en posible fundadora para su línea parental.

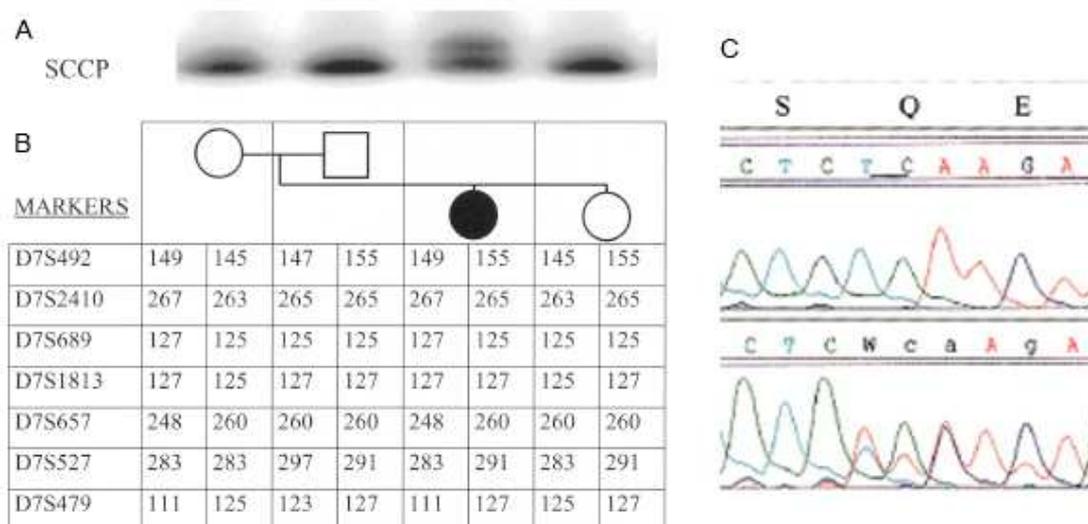


Figura 9. A. Polimorfismo de conformación de hebra simple del exón 13 de CCM1 de la familia CV36. B. Haplotipos de los individuos de la familia CV36, que confirman la germinalidad de la mutación. C. Electroferograma del padre (arriba) e hija (abajo) donde se aprecia una delección de dos bases (c.1362_1363delTC; (Lucas *et al.* 2001)).

Aproximadamente el 56% de las familias con cavernomatosis cerebral tienen mutación en el gen CCM1 (Denier *et al.* 2004). Alrededor del 50% de las mutaciones identificadas en este gen dan lugar a un cambio en la pauta de lectura, mientras que en el 24% de las mutaciones se produce un cambio de un aminoácido por un codón de terminación. En ambos casos se genera una proteína truncada. El 19% de estas mutaciones causan alteraciones en la región *splice* (figura 10); y el 5% dan lugar al cambio de un aminoácido por otro. También se ha descrito una delección de 84 pb hallada por el grupo de investigación de Laberge en el año 1999 (Laberge-le *et al.* 1999). Además, grandes delecciones han sido también halladas (Gaetzner *et al.* 2007).

La gran mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento en el gen CCM1 se encuentran localizadas entre los exones 6 y 15. Dentro de esta región se encuentran las secuencias que van a codificar los tres dominios ankirina (exones 7 y 8) y el dominio FERM (exones 10 a 14), zonas muy importantes para la regulación de las interacciones entre proteínas y para la modulación de las uniones entre proteínas citoplasmáticas y de membrana (Verlaan *et al.* 2002).

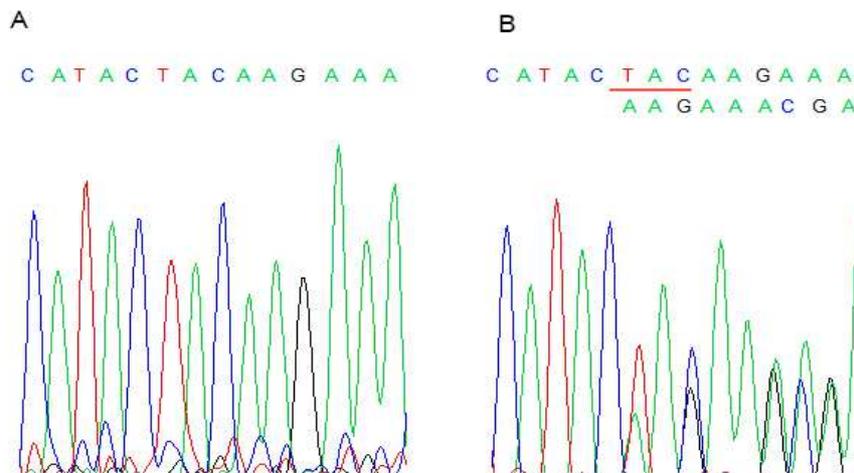


Figura 10. Electroferograma de la hebra complementaria correspondiente a una delección de tres bases (línea roja; c.1255-4delGTA) en la región aceptora de splicing del exón 13 de *CCM1*. **A.** Control sano. **B.** Paciente CV129 donde se puede apreciar las ambigüedades provocadas por la delección.

6.1.2. Papel de la proteína Krit1

A finales de los años 80, la proteína Krit1 (codificada por el gen *CCM1*) fue aislada mientras se estudiaba la proteína Rap1 α , un miembro de la familia Ras GTPasas que presenta actividad supresora tumoral (Serebriiskii *et al.* 1997). Estudios en ARN mostraron niveles de expresión variable en distintos tejidos, no estando restringida al tejido vascular o cerebrovascular (Sahoo *et al.* 1999). La proteína Krit1 parece localizarse principalmente en las membranas plasmáticas (Zhang *et al.* 2001), aunque también se puede encontrar en el citoesqueleto (Gunel *et al.* 2002) y en el núcleo celular (Zawistowski *et al.* 2005).

La primera interacción descrita de Krit1 fue con Rap1a, cuya función celular fue propuesta en un principio como un gen supresor de tumores, pudiendo actuar como un antagonista de la proteína Ras (Serebriiskii *et al.* 1997). Más tarde, se informó su capacidad de estabilizar las uniones endoteliales célula-célula (Glading *et al.* 2007), actuando Krit1 como un efector de Rap1a.

Zhang y colaboradores (Zhang *et al.* 2001) informaron de una fuerte interacción entre la proteína Krit1 e Icap1 α (*integrin cytoplasmic domain-associated protein-1*), a través del primer dominio NPXY de Krit1. Icap1 α es una fosfoproteína con un dominio PTB que

interacciona con $\beta 1$ -integrinas a nivel citoplasmático. Además, Krit1 y $\beta 1$ -integrina compiten por su unión a Icap1 α . Las integrinas son receptores que actúan como mecanismo primario para el reconocimiento de la respuesta a cambios en la matriz extracelular. La unión de las integrinas a sus ligandos en la matriz extracelular activa varias cascadas de señales citosólicas para promover la migración celular, la supervivencia, proliferación y diferenciación. Pero esta unión requiere de una conformación "activada" por parte de las integrinas, donde Icap1 α facilitaría dicho estado de activación (Chang *et al.* 2002). Por tanto, Krit1 a través de la antagonización de la función de Icap1 α puede ejercer un papel importante en la ruta de señalización de las integrinas durante la morfogénesis de los vasos sanguíneos.

Krit1 interacciona con microtúbulos y puede viajar entre el citoplasma y el núcleo, debido a que posee una secuencia de localización nuclear (NLS). Icap1 α tiene también una secuencia NLS, por lo que podrían interactuar en el núcleo, aunque su funcionalidad aquí no ha sido aún desvelada. Por otro lado, la proteína Ccm2 interacciona con Krit1 a través de su tercer motivo NPXY, lo que parece estabilizar en el citoplasma a Krit1. Se ha observado también un complejo ternario formado por Icap1 α -Krit1-Ccm2, no habiendo competición por la unión a Krit1. Por tanto, la abundancia de Icap1 α y Ccm2 podría dictar tanto la localización celular como la función de Krit1 (Zawistowski *et al.* 2005).

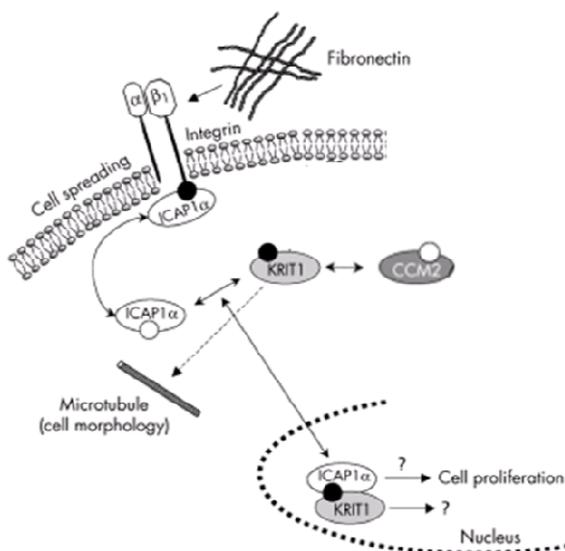


Figura 11. Representación esquemática de la interacción de Krit1 con microtúbulos, β -integrina, Icap1 α y Ccm2. ● Motivo NPXY; ○ Dominio PTB (Modificado de Revencu & Vikkula 2006).

Otra interacción que se ha informado ha sido con el receptor de membrana *heart-of-glass1* (HEG1), expresado en células endoteliales y cardíacas aunque con función desconocida. En este caso se ha descrito la formación de un complejo ternario entre HEG1-Krit1-Ccm2. Finalmente, la interacción con Nd1-L sugiere una cooperación funcional a la respuesta celular frente a estrés oxidativo (Guazzi *et al.* 2012).

6.2. Gen *CCM2*

Como hemos comentado anteriormente, el locus *CCM2* fue ligado a la cavernomatosis en familias con asociación negativa al locus *CCM1* (Craig *et al.* 1998). En el intervalo definido encontraron 55 genes conocidos, entre los que se eligieron 8 genes candidatos para realizar con ellos un análisis en mayor profundidad. De entre estos 8 genes, el gen *MGC4607* (*CCM2*) se seleccionó porque codificaba una proteína con un dominio PTB, similar al encontrado en *Icap1 α* , uno de los ligandos de la proteína Krit1.

En el estudio de estas familias, se detectaron 8 nuevas mutaciones en el gen *CCM2* (Liquori *et al.* 2003). Este gen tiene un tamaño de 77 kb y está dividido en 10 exones codificantes. Actualmente 4 isoformas han sido bien establecidas (figura 12), dos de ellas derivadas de splicing alternativos de los exones 2 y 5 y 6; y otra isoforma con un inicio de transcripción alternativo. La primera isoforma expande 1894 pb y codifica una proteína de 444 aminoácidos, mientras que la resultante del inicio de transcripción alternativo (rio abajo) codifica una proteína ligeramente más grande, de 465 aminoácidos.

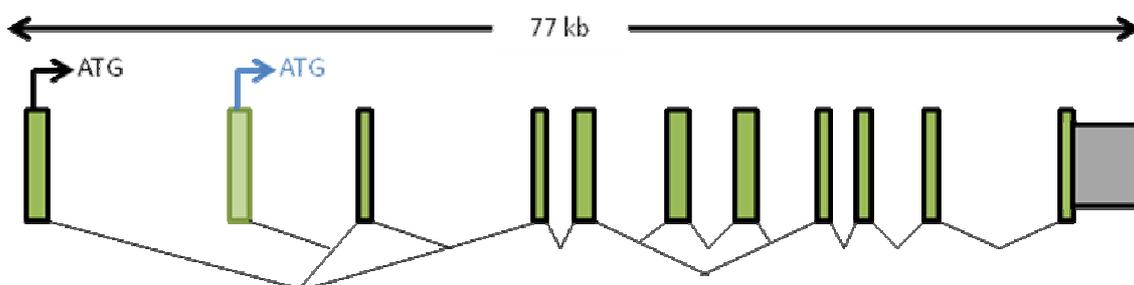


Figura 12. Estructura del gen *CCM2*.

La proteína codificada por *CCM2* se denominó “malcavernin” por su implicación en el desarrollo de las malformaciones cavernomatosas cerebrales (Liquori *et al.* 2003) y OSM (osmosensing scaffold for MEKK3) por estar involucrada en la respuesta de células eucariotas a la hiperosmolaridad inducida por sorbitol (Uhlik *et al.* 2003).

Los estudios *in silico* de predicción de estructuras solo reveló un dominio PTB, entre los aminoácidos 67 y 227, conservado en otras especies homólogas (NCBI Conserve Domain database)(Denier *et al.* 2004). Por otro lado, Harel y colaboradores describen un dominio Karet en la región C-terminal (Harel *et al.* 2009) (figura13).



Figura 13. Dominios estructurales de la proteína Ccm2

6.2.1. Mutaciones en *CCM2*

Cerca de un 33% de las formas familiares de la cavernomatosis cerebral están ligadas al gen *CCM2* (Craig *et al.* 1998). Hasta el momento se han descrito más de 40 mutaciones para este gen. Aproximadamente un 50% de las mutaciones han sido encontradas en los exones 3 a 6, que codifican para el dominio PTB.

La mitad de las mutaciones encontradas dan como resultado la producción de una proteína truncada, bien por introducción de un triplete de terminación o modificando la pauta de lectura. El 20% de las mutaciones localizadas en el gen MGC4607 causan alteraciones en la región *splice* (Stahl *et al.* 2008). Las deleciones parecen darse con una alta frecuencia en este gen (figura 14), muchas de ellas detectadas mediante MLPA. Nuestro grupo detectó una deleción prevalente de 11 pares de bases en población ibérica localizada en el exón 5. Se ha hipotetizado que el gen *CCM2* podría estar en un sitio de hipermutabilidad, ya que se encuentra rodeado por dos retrotransposones Alu (AluSx y AluSg, situados en el intrón 1 y región 3'UTR, respectivamente) (Liquori *et al.* 2007). Se han descrito también mutaciones silentes que pueden provocar la pérdida de expresión de uno de los alelos (c.30G>A (Liquori

et al. 2003)) o la producción de splings crípticos (c.288G>A (Tonelli *et al.* 2009) y c.609G>A(Denier *et al.* 2004)).

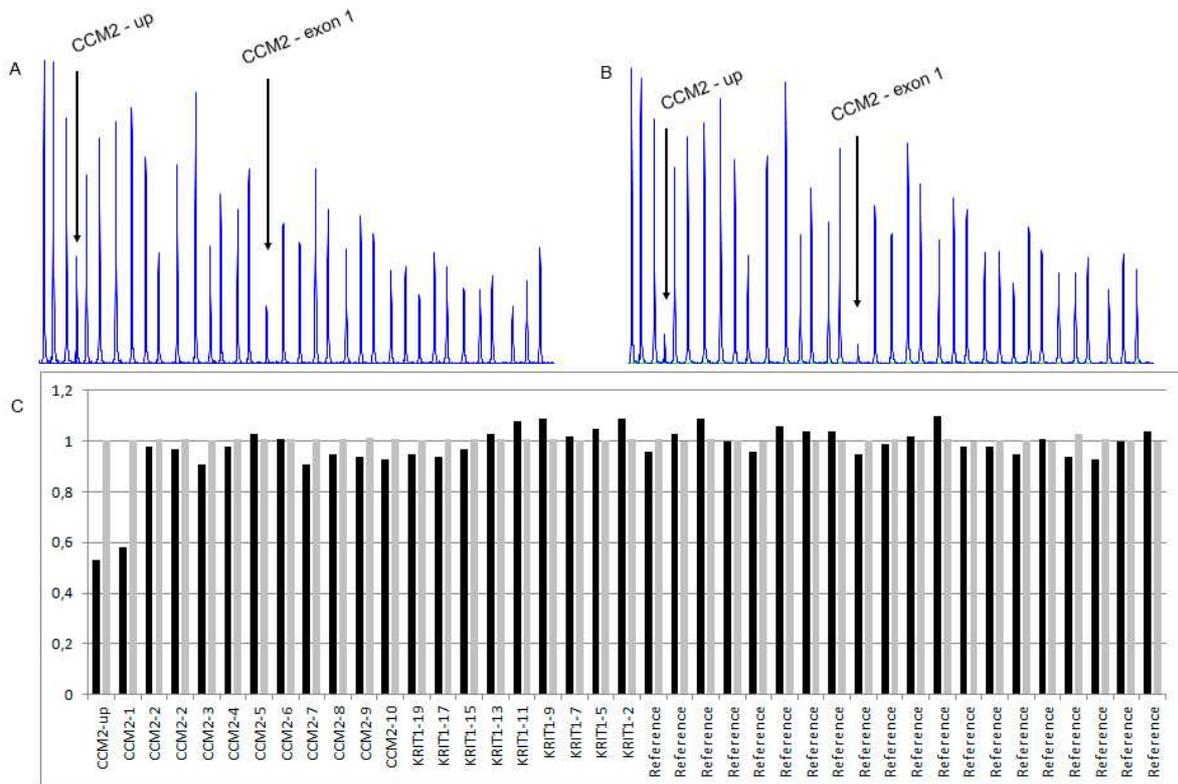


Figura 14. Delección de la región upstream y exón 1 del gen *CCM2* analizado mediante MLPA (Salsa MLPA kit P130). **A.** Electroferograma de un sujeto control y **B** de un paciente con cavernomatosis. Se puede apreciar una disminución en el área de los picos del 50% aproximadamente en las sondas correspondientes a la región upstream y exón 1 de *CCM2*, mientras que en el resto de sondas las diferencias son mínimas. **C.** Análisis cuantitativo realizado con el software Coffalyser.NET (MRC Holland).

6.2.2. Papel de la proteína Ccm2

Se han descrito diferentes niveles de expresión de esta proteína: mantiene un alto nivel de expresión en músculo esquelético, corazón e hígado, mientras que su expresión es mínima o nula en colon y en tejido pulmonar. *CCM2* se expresa también en tejido cerebral; esta expresión sugiere que la formación de las lesiones cavernomatosas puede no ser debida a un defecto vascular intrínseco, sino más bien a que la vascularidad cerebral está respondiendo aberrantemente a señales que provienen del parénquima cerebral (Liquori *et al.* 2003). Estudios posteriores afirman que la expresión de esta proteína es prácticamente ubicua, ya que

mediante análisis de *northern blot* se observa que *CCM2* tiene buenos niveles de expresión en tejido cerebral, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, intestino delgado, colon, pulmón, timo, bazo y leucocitos de sangre periférica (Denier *et al.* 2004). Recientemente se ha observado que se expresa en células neuronales y en vasos cerebrales, tanto en la región meníngea como en el parénquima cerebral (Petit *et al.* 2006). A nivel subcelular, su expresión es principalmente citosólica.

CCM2 fue identificado en un primer momento en un análisis de genes involucrados en la respuesta celular a un shock osmótico. Estas vías de señalización inducidas por estrés involucran a GTPasas de la familia Rho como RhoA, Rac1 y cdc42, y a la vía de las MAPK (mitogen-activated protein kinases) como p38 y JNK (Uhlik *et al.* 2003).

Estudios en ratones han mostrado que la proteína Ccm2 no es requerido en la diferenciación inicial de células endoteliales desde sus precursores (vasculogénesis), pero sí lo es en la formación y remodelado de los vasos sanguíneos (angiogénesis) (Whitehead *et al.* 2009). RhoA es una pequeña GTPasa que regula la actina del citoesqueleto en la formación de las fibras de estrés (figura 15). El complejo formado por Ccm2 y Krit1 podría actuar como regulador negativo de RhoA y de su efector río abajo ROCK1. De esta manera controlarían la permeabilidad endotelial y vascular (Stockton *et al.* 2010).

Ccm2 es una proteína de anclaje para Rac1, MEKK3 y p38 MAPK (figura 14). La actividad de Rac1 contrarresta la formación de fibras de estrés mediada por RhoA y estabiliza la función de barrera microvascular (Stockton *et al.* 2010). El complejo formado por MEKK3/MKK3 es necesario para restaurar el volumen y forma celular en respuesta a shock osmótico. p38 MAPK es un sustrato río abajo de MEKK3. Esta vía, que está muy conservada desde levaduras hasta mamíferos, regula la transcripción génica y el remodelado de la actina en una exposición hiperosmótica prolongada. Se ha observado que Ccm2 forma un complejo estable con MEKK3, que es reclutado a la membrana bajo shock hiperosmótico (Uhlik *et al.* 2003), a través de una interacción directa con Rac y donde se colocaliza la actina-F. Por ello, Ccm2 podría servir como proteína de andamiaje para el ensamblaje de la maquinaria de polimerización de la actina.

Ccm2 ha sido descrito por intraccionar en la región yuxtamembrana con la proteína TrkA, un receptor tirosin-quinasa que induce la muerte celular en tumores de origen neural.

Aunque el mecanismo por el que TrkA induce muerte celular no es conocido, la regulación negativa de Ccm2 parece atenuar la muerte inducida por TrkA en células de meduloblastoma o neuroblastoma. Y de forma inversa, una mayor expresión de Ccm2 y TrkA se ha visto por incrementar la supervivencia a largo plazo en pacientes con neuroblastoma. Tanto el dominio PTB como el dominio Karet son necesarios para inducir apoptosis dependiente de TrkA, donde el dominio PTB parece determinar la especificidad de la interacción mientras el dominio Karet vincula la vía de muerte celular (Harel *et al.* 2009).

Ccm2 interacciona con Ccm3 y con Krit1. Aunque los sitios de unión con Ccm3 no son aún conocidos parece que son distintos a Krit1. Se ha observado que las tres proteínas CCM forman un complejo ternario, donde Ccm2 sería la base de dicho complejo. Asimismo, se ha comprobado que no existe interacción directa entre Krit1 y Ccm3 (Stahl *et al.* 2008; Voss *et al.* 2007). Como hemos comentado anteriormente, Ccm2 parece anclar a Krit1 en el citosol (Zawistowski *et al.* 2005). Finalmente, estudios proteómicos realizados en líneas celulares de macrófagos y astrocitos han ayudado a identificar más de 114 proteínas que interaccionan con Ccm2 (Hilder *et al.* 2007).

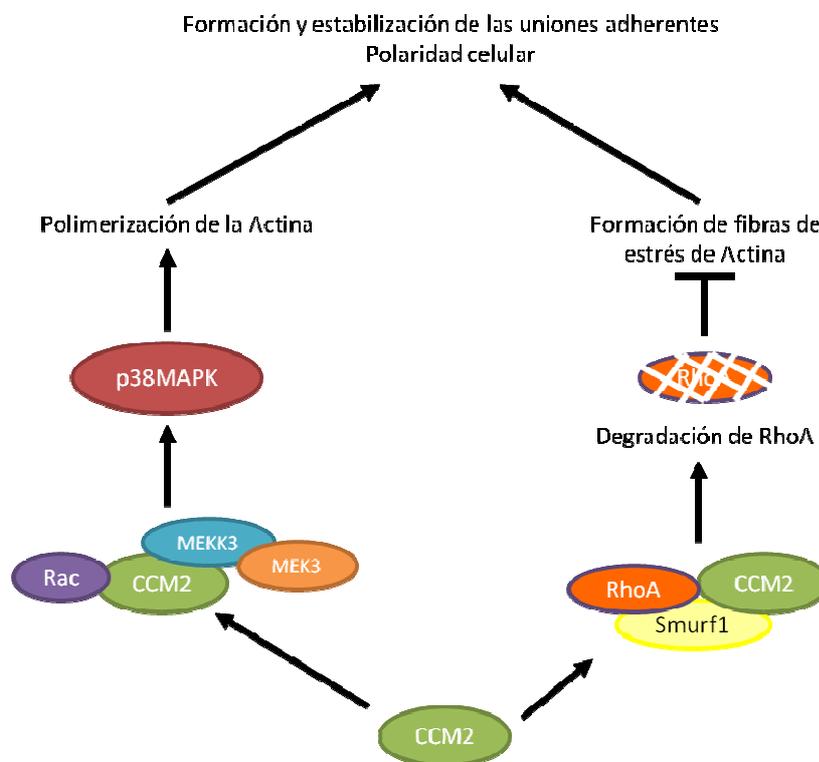


Figura 15. Ccm2 es una proteína de anclaje para pequeñas GTPasas de la familia Rho y p38MAPK. Está envuelta en el remodelado del citoesqueleto a través de anclaje con Rac, activación de la vía p38 MAPK (izquierda) y en la degradación proteosómica de RhoA (derecha). Modificada de Faurobert & Albiges-Rizo 2010.

6.3. Gen *CCM3*

Al igual que el locus *CCM2*, el locus *CCM3* fue ligado a la cavernomatosis cerebral en familias con asociación negativa para el locus *CCM1* (Craig *et al.* 1998). El gen *CCM3* (*programmed cell death 10 gene*, *PDCD10*), también llamado *TFAR15* o *CCM3*, fue identificado mientras se realizaba una búsqueda de genes diferencialmente expresados durante la inducción de la apoptosis en la línea pre-mieloide TF-1 (Busch *et al.* 2004). Se han encontrado transcritos homólogos parciales de *PDCD10* en numerosas especies vertebradas e invertebradas. Su implicación en las malformaciones cerebrales cavernomatosas sugiere que es un nuevo e importante factor relacionado con la morfogénesis y la remodelación vascular. El cDNA fue inicialmente clonado en base a su expresión en una línea celular mieloide humana, TF-1, en la cual la apoptosis fue inducida por privación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Wang *et al.* 1999).

El gen *CCM3* tiene un tamaño de más de 50 kb e incluye 10 exones, 3 de ellos no codificantes en su extremo 5' (figura 16). Han sido identificados tres transcritos para este gen que se diferencian únicamente en sus regiones 5'UTRs, y que codifican para una proteína (*Ccm3*) de 212 aminoácidos.

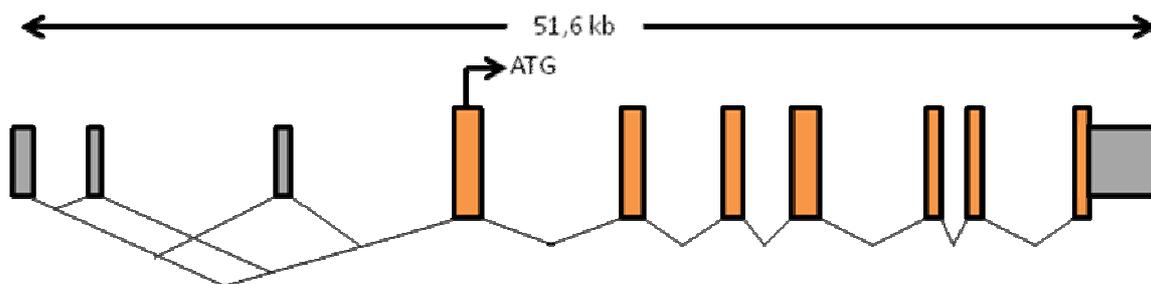


Figura 16. Estructura del gen *CCM3*, mostrando splicing alternativos en la región 5'UTR. En cajas grises se representan los exones no codificantes.

El estudio de predicción de estructuras no arrojó ningún resultado de dominio funcional conocido. Recientemente, dos estudios cristalográficos describen una estructura en α -hélice y dos dominio estructurales (figura 17), un dominio N-terminal de dimerización y un

dominio homólogo a (focal adhesión targeting) en un extremo C-terminal (Ding *et al.* 2010; Li *et al.* 2010).

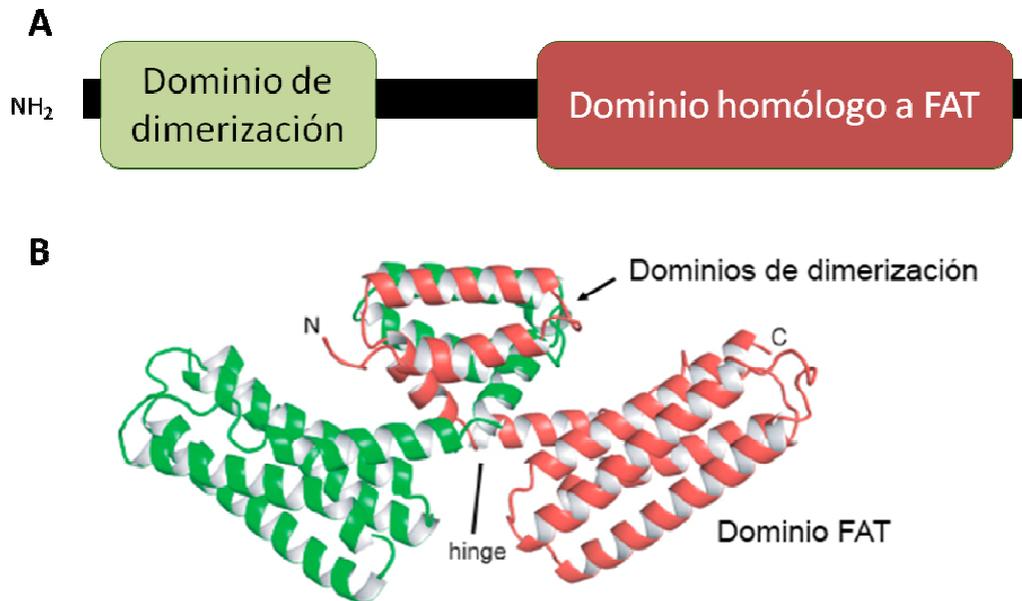


Figura 17. Dominios estructurales de la proteína Ccm3. **A.** Estructura primaria de la proteína. **B.** Estructura tridimensional de un dímero de Ccm3 (modificado de Li et al (Li *et al.* 2010)).

6.3.1. Mutaciones en *CCM3*

El grupo de Craig y colaboradores observaron en su estudio que un 40% de las formas familiares de la cavernomatosis cerebral estaban ligadas a *CCM3* (Craig *et al.* 1998). Sin embargo, este porcentaje ha ido reduciéndose con posteriores estudios descendiendo dicho porcentaje a menos de un 10% (Liquori *et al.* 2006). Actualmente más de 15 mutaciones y cuatro grandes deleciones han sido descritas para este gen.

6.3.2. Papel de la proteína Ccm3

La expresión de esta proteína es ubicua, pudiéndose detectar en tejido cerebral, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, intestino delgado, colon, pulmón, timo, bazo, placenta y leucocitos de sangre periférica (Bergametti *et al.* 2005). Recientemente, se ha observado su expresión en células neuronales, en regiones de neurogénesis activa durante el desarrollo embrionario así como en neuronas postmitóticas en la fase adulta. A diferencia de Krit1, Ccm3 se ha detectado en vasos sanguíneos cerebrales, tanto en la región meníngea como en el parénquima cerebral (Petit *et al.* 2006).

Ccm3 ha sido identificado mediante estudios proteómicos como componente de un gran complejo denominado STRIPAK (*striatin-interactin phosphatase and kinase*) el cual agrupa a fosfatasa y quinasas alrededor del núcleo de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Sin embargo, ni Krit1 ni Ccm2 han sido detectados en este complejo (Goudreault *et al.* 2009).

También se han descrito interacciones con un grupo de serin/treonin quinasas pertenecientes a la familia GCKIII (germinal center kinases III), como son STK24, STK25 y MST4. Parece ser que Ccm3 es fosforilado por STK25, aunque sus consecuencias no son aún conocidas. Por otro lado, Ccm3 parece aumentar la actividad *in vitro* de MST4. Las quinasas GCKIII han sido asociadas con la proliferación, apoptosis, y respuesta a estrés, pero los sustratos y los mecanismos moleculares permanecen aún por desvelarse (Voss *et al.* 2007; Faurobert & biges-Rizo 2010).

Li y colaboradores nos muestran que el dominio homólogo a FAT interacciona de forma directa con el dominio PTB de Ccm2. Por ello, mutaciones en este dominio podrían afectar a la colocalización de Ccm2 y Ccm3 en la célula (Li *et al.* 2010).

7. Transcripción y splicing.

La transcripción del ADN es el primer paso de la expresión génica. Éste es un proceso dinámico que implica distintas etapas, incluyendo la iniciación, elongación, splicing y terminación.

Por lo general, la localización del punto de inicio de transcripción de un gen viene determinada por una secuencia específica, denominada promotor. La estructura del promotor contiene secuencias que sirven para el anclaje de un grupo de proteínas, factores generales de transcripción, organizadas como un complejo proteico (Smale & Kadonaga 2003). Estos factores llevan a la formación del complejo de preiniciación, el cuál es reconocido por las RNA polimerasas, iniciándose la síntesis de ARN. Las regiones promotoras poseen típicamente una estructura abierta de cromatina, lo que permite la unión de estos factores de transcripción y la iniciación de la maquinaria de transcripción.

En la siguiente etapa de la transcripción, cabe recalcar que las fases de elongación y splicing vienen reguladas de forma coordinada en el núcleo de células humanas de una manera espacio-temporal (Kelemen *et al.* 2013). El splicing del pre-mRNA, donde se produce la eliminación de los intrones, es esencial para la generación de mensajeros de longitud completa que serán traducidos en proteínas funcionales. El splicing alternativo es un mecanismo altamente regulado que hace que un gen pueda formar múltiples mensajeros. De hecho, más del 90% de genes que codifican para proteínas usan el splicing alternativo. Se ha descrito que diferencias en la velocidad de transcripción de la RNA polimerasa modula la elección del sitio de splicing alternativo (Kornblihtt 2007). Además, hay estudios que sugieren que diferencias en el patrón de splicing alternativo contribuyen a diferenciar la expresión génica y fenotipos entre individuos. Puede resultar de especial interés ver cómo polimorfismos de un solo nucleótido pueden contribuir al splicing alternativo y a las diferencias entre individuos. Sin embargo, una regulación aberrante del splicing alternativo puede llevar a desencadenar una enfermedad. Se han detectado mutaciones puntuales como las causantes de la modificación en el splicing alternativo (Kelemen *et al.* 2013). Esto es algo bien estudiado en cáncer. Diversas isoformas proteicas generadas mediante splicing

alternativo son cruciales para la progresión del cáncer y están siendo estudiadas para abordarlas a nivel terapéutico (Kelemen *et al.* 2013).

Mutaciones en los sitios consenso AG/GT aceptores y donadores de splicing que flanquean a los exones modifican prácticamente siempre el splicing normal, provocando la eliminación del exón o la activación de un sitio críptico de splicing. Sin embargo, es conocido que variantes exónicas e intrónicas (Vreeswijk & van der Klift 2012; Riant *et al.* 2013c) fuera de estos sitios consenso son capaces de afectar al splicing normal a través de la creación de nuevos sitios de splicing, activación de sitios crípticos o disrupción de motivos reguladores de splicing (sitios potenciadores o inhibidores exónicos, ESEs y ESSs, e intrónicos, ISEs e ISSs; figura 18). Mutaciones dentro de los elementos reguladores del splicing son, a menudo, muy complicadas de definir desde la secuencia nucleotídica. En el caso de variantes intrónicas profundas que normalmente no son detectadas mediante el proceso de secuenciación exón por exón, pueden llegar a ser la causa responsable de una enfermedad (Riant *et al.* 2013c).

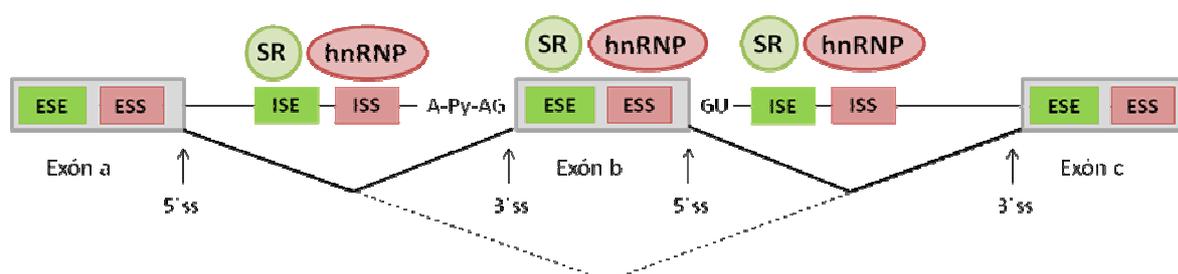


Figura 18. Secuencias reguladoras del splicing. ESE: Elemento exónico potenciador de splicing; ESS: elemento exónico silenciador de splicing; ISE: elemento intrónico potenciador de splicing; ISS: elemento intrónico silenciador de splicing. Las secuencias potenciadoras de splicing son reconocidas por proteínas SR, favoreciendo la inclusión del exón. Por el contrario, las proteínas hnRNPs reconocen las secuencias silenciadoras, inhibiendo la inclusión del exón. 3'ss: sitio de splicing 3'; 5'ss: sitio de splicing 5'

En cuanto al gen *CCM1*, se ha descrito en la literatura un splicing alternativo en el que se elimina el exón 15 en ratones (Retta *et al.* 2004), provocando dos isoformas con distinta localización subcelular y diferencias en las interacciones con otras proteínas (Francalanci *et al.* 2009). Por otro lado, se ha observado la producción de splicing aberrantes en cultivo de linfocitos y fibroblastos de sujetos sanos (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2002). Este tipo de splicings

han sido identificados también en otros genes, como el gen *NF1* (Wimmer *et al.* 2000) o el gen *ATM* (Teraoka *et al.* 1999).

7.1. Exones vs pseudo-exones

¿Cómo podemos definir un exón? Esta es una pregunta que en principio tiene fácil contestación. Se define un exón dentro de una secuencia nucleotídica flanqueada por: i) sitios consenso 3' y 5' altamente conservados (AG/GT), ii) presencia de un tracto pirimidínico, y iii) presencia de un sitio de ramificación en upstream del sitio de splicing 3' (figura 19). Los pseudo-exones tienen aparentemente estas mismas características, pero no son transcritos ni incluidos en mRNA. Por este motivo, se ha visto como un cambio conceptual cómo la maquinaria de splicing puede distinguir verdaderos exones de pseudo-exones. La caracterización de los motivos ESE y ESS ha mostrado que los pseudo-exones pueden diferenciarse en base a un menor contenido de ESE y a un mayor número de ESS (Wang *et al.* 2004; Zhang & Chasin 2004; Sironi *et al.* 2004). Muchos de estos pseudo-exones contienen codones de terminación prematuros. Como hemos indicado en apartado anterior, mutaciones intrónicas puntuales pueden ser la causa de enfermedades a través de la activación de pseudo-exones, siendo eficientemente empalmados y detectándose en mRNA (Riant *et al.* 2013c).

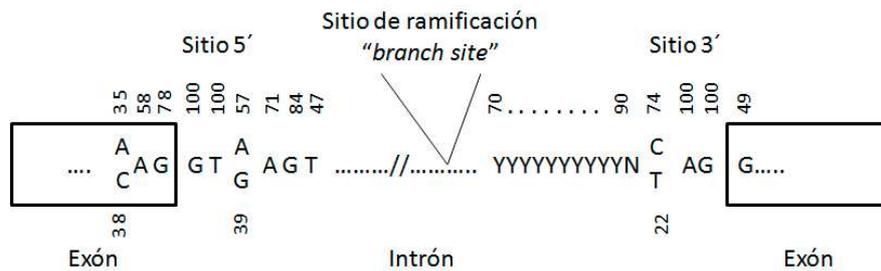


Figura 19. Secuencias consenso del lugar donador (5'), aceptor (3') y punto de ramificación. Los números indican las frecuencias de cada nucleótido en cada posición.

Objetivos

OBJETIVOS

Esta tesis tiene como objetivo principal el diagnóstico molecular de la Cavernomatosis. Por ello, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio por MLPA de deleciones de tamaño superior a un exón en la población de pacientes de cavernomatosis
2. Estudio a través de secuenciación directa de mutaciones en ADN y análisis bioinformático de patogenicidad.
3. Estudio funcional de mutaciones de significado incierto (mutaciones silentes, *missense* e intrónicas).
4. Análisis y descripción de formas alternativas de mRNA en el gen *CCM1*.
5. Estudio en linfocitos de pacientes y controles sanos de la expresión de los genes en cultivos primarios: *CCM1*, *CCM2*, *CCM3*, *HPRT* (como gen reporter).

Material y métodos

1. Pacientes del estudio

Tras el diagnóstico clínico y radiológico de Cavernomatosis Cerebral, se estudiaron a un total un total de 97 familias, que comprenden 264 sujetos, y 45 casos esporádicos. Un consentimiento escrito fue recogido por cada paciente y sus familiares incluidos en el estudio. Éste se ajustó a los principios recogidos por la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena. Las muestras fueron remitidas por los Servicios de Neurología o Genética de distintos hospitales repartidos por la geografía española. Entre otros, se incluyen los Hospitales Universitarios Virgen Macarena, Virgen del Rocío y Nuestra Señora de Valme (Sevilla), Hospital Universitario Carlos Haya (Málaga), Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hopital Universitario Son Espases (Mallorca), Hospital de Vall d'Hebron (Barcelona), etc.

2. Procedimientos de extracción de ADN

Las muestras de los pacientes fueron extraídas mediante venopunción en tubos que contenían K₃EDTA como anticoagulante, aproximadamente unos 10 ml de sangre total. El aislamiento de ADN fue realizado bien por un método manual, previa separación de células nucleadas en dextrano, o bien por un método automatizado.

Para el primer método, añadimos 2,5 ml de dextrano T500 al 6% en suero fisiológico (previamente preparado) por cada 10 ml de sangre total. Agitamos por inversión y dejamos reposar una hora aproximadamente. En muestras frescas se puede apreciar una separación de dos fases, una de color rojiza en la que decantan los hematíes, y otra blanquecina donde quedan en suspensión las células blancas. Recogemos el sobrenadante en un tubo nuevo de 15 ml y lo centrifugamos 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. Desechamos el sobrenadante y añadimos 4-5 mL tampón de lisis de hematíes (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche Applied Science) con el que producimos

un choque hipotónico y eliminamos los hematíes que puedan quedar. Tenemos que tener en cuenta que la hemoglobina inhibe el proceso de PCR. Resuspendemos e incubamos 10 minutos en agitación en un balancín. Volvemos a centrifugar 10 minutos a 3000 rpm y deseamos el sobrenadante (En este punto las células pueden resuspenderse en PBS y congelarse a -20°C para su posterior uso). Una vez tenemos los leucocitos, procedemos a aislar el ADN. Para ello resuspendemos las células en 3 ml de tampón de lisis de leucocitos (composición del tampón: 4 ml de NaCl 5M, 200 μl de EDTA, 500 μl de Tris-HCl 1M, completado hasta 50 ml con agua destilada), añadimos 100 μl de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) al 20% y 35 μl de proteinasa K (20 mg/ml) y dejamos toda la noche a 37°C . Al día siguiente añadimos 1 ml de NaCl 6M para precipitar las proteínas. Seguidamente centrifugamos 30 min a 3000 rpm y recogemos el sobrenadante en un tubo de 50 ml al que hemos añadido 2 volúmenes de etanol frío. Agitamos por inversión y recogemos la medusa pasándola a un tubo de congelación y dejando secar. Finalmente, añadimos en función de la medusa de ADN obtenida un volumen comprendido entre 200 y 500 μl de TE 10:1 a pH 8 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) y dejamos hidratar a 37°C una hora aproximadamente. Es importante una correcta hidratación del ADN. Por ello, en caso en que no estemos seguros podemos dejar hidratando toda la noche a 4°C .

El método automatizado nos permite la extracción de ADN en menos de 40 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante (Maxwell® 16, Promega Biotech Ibérica). Este método se basa en el uso de partículas paramagnéticas para capturar y purificar el ADN. Es este instrumento, partiendo de 600 μl de sangre periférica, podemos obtener 12-16 μg de ADN.

2.1. Medida de la concentración de ADN

La determinación de la concentración de ADN la hemos podido realizar mediante dos métodos, uno espectrofotométrico y otro fluorimétrico. En el primer caso, hemos usado un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Este aparato se basa en la Ley de Lambert Beer, que relaciona la densidad óptica con la concentración. Así, la absorbancia de

luz ultravioleta (UV) a 260 nm (A_{260}) igual a 1, corresponde a una concentración de 50 ng/ μ l de ADN de doble cadena. Además, permite una medida rápida de volúmenes de muestra muy pequeños (de 0,5 a 1 μ l), con un límite de detección de 0,4 ng/ μ l. Los datos espectrales permiten evaluar la presencia de contaminantes en la muestra, tales como EDTA, fenol o guanidina. La pureza se evalúa mediante las proporciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La proporción A_{260}/A_{280} indica la presencia de proteínas y debe aproximarse a 1,8 en ADN puro, mientras que A_{260}/A_{230} detecta contaminaciones y debe encontrarse entre 1,8 y 2,2.

Por otro lado, el método fluorimétrico (Qubit® dsDNA BR Assay Kits, Invitrogen) nos permite una medición más exacta de la concentración de ADN, tolerando muchos de los contaminantes que pueden interferir en la medida espectrofotométrica. Por el contrario, es necesario un tiempo de incubación y puede requerir un volumen de muestra mayor.

3. Procedimientos para la detección de mutaciones en ADN en los genes *CCM1*, *CCM2* y *CCM3*

3.1. Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación

Como comentamos en la introducción, esta técnica es la primera prueba que utilizamos en el análisis genético de cavernomatosis. Con ella podemos determinar si hay grandes inserciones o deleciones en los genes CCM a nivel de exones. La técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) se basa en la amplificación dependiente de ligación de varias sondas al mismo tiempo (Figura 20). Para ello, los kits SALSA MLPA probemix P130 y P131 (MRC Holland) fueron utilizados según las indicaciones del fabricante. La mezcla P130 y P131 contiene 9 sondas para *CCM1*, 10 sondas para *CCM2* y 19 sondas de referencia; y la mezcla P131 contiene 10 sondas para *CCM1*, 10 sondas para *CCM3* y 18 sondas de referencia. El producto de la amplificación fue separado mediante un equipo de electroforesis capilar (ABI 3130, Applied Biosystem) y

analizado mediante el software GeneMapper (Applied Biosystem) y Coffalyser.NET (MRC Holland).

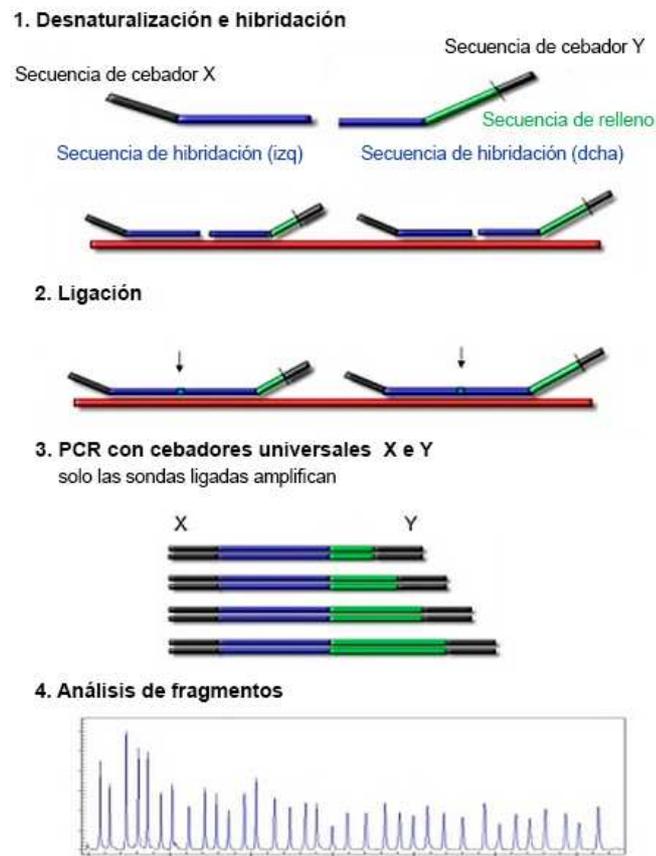


Figura 20. Esquema general de la técnica MLPA (modificado de MRC Holland)

3.2. Secuenciación exón por exón

Tras haber descartado la posibilidad de deleciones o inserciones en alguno de los tres genes CCM, el siguiente paso en nuestro esquema de trabajo es la secuenciación exón por exón (figura 5). La PCR es una técnica rápida y eficaz para duplicar una secuencia corta y específica de ADN, de forma que podemos producir millones de copias a partir de pequeñas cantidades de una muestra.

Esta técnica usa una enzima recombinante termoestable para duplicar las cadenas de ADN. En nuestro caso, para la amplificación de ADN usamos la enzima Taq polimerasa, (AmpliTaq Gold DNA polymerase, Applied Biosystems), 1,5mM de iones Mg^{2+} , cebadores específicos de la secuencia que queremos amplificar, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs, Promega) y la muestra de ADN.

La PCR se fundamenta en la repetición de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En la primera etapa los puentes de hidrógeno formados entre las bases son eliminados y las cadenas de ADN separadas por medio del incremento de la temperatura, hasta llegar a 94-96°C. En la etapa de alineamiento la temperatura disminuye para que los cebadores hibriden con la secuencia complementaria. Normalmente la temperatura de alineamiento oscila entre 40 y 65 °C, dependiendo de la longitud y contenido en GCs (guaninas y citosinas) de los cebadores. De esta manera quedan enlazados y preparados para la extensión. Esta tercera etapa se realiza a 72°C generalmente, donde la enzima tiene máxima actividad. Sin embargo, la temperatura de extensión puede oscilar entre 68 y 75°C. A mayor temperatura la enzima tardará menos tiempo en inactivarse, mientras que a menor temperatura será menos activa (aunque a veces es recomendable para amplificaciones de grandes fragmentos). Con la repetición de estas 3 etapas el fragmento específico de ADN es duplicado. Finalmente, añadimos una etapa de extensión de 7-10 minutos para la terminación de las cadenas.

La amplificación de cada uno de los exones codificantes se realizó en todos los pacientes utilizando los siguientes cebadores (tabla 2).

Gen	Exón	Cebador	Forward	Reverse	Tm (°C)	Tamaño producto (pb)
CCM1 ^a	1 ^d	KA	TCTTGCCATCAAATGTGCAT	GACAAAATAATGGGCAGAGACC	60	299
	2	KB	TGCAGCTAGAGTTGAGAAAGACTG	TTTCTCCACAAGTATTTTAAACAATG	55	308
	3	KC	TTCCTCTTAATGCTGCCTTTT	GAATGCAAATCTTAACTTCCTCAA	60	285
	4	KD	TTATATGGTAGCATAATTCTT	AGTGTCTGTATCTATGACAACCTA	45	249
	5	K1	GAGCGGATAAAAACTAAT	GAGCTAAAATTCATTCAA	43	205
	6	K2	GCTCTTAATGGGTTTTTG	AGCAATGTGGAGTAAAC	50	183
	7	K3	GTCCTGTTGTATTTTCA	TTTGGAAATGAGAACAGTC	50	275
	8	K4	TTTGGAAATGAGAACAGTC	TGTCATTAATTGTTATTCACTGCT	50	286

	9	K5	ATGTAATGCCTTTTTCC	ATGCCTGGCTCTAACTAT	47	181
	10	K6 ^c	CATGAAGTTGAAGGAAAGTA	CACTCCCAAAAAGGAATAA	50	292
	11	K7 ^c	TTCAGTACAGAAGTGCAGACAGTT	GAAACTCAACAGATTTTGTGCATT	55	306
	12	K8	TGTAGCCTAATAACCAA	AGCATAGCACAAAGACCAT	50	242
	13	K9	AATTACGTTACTGAAAGC	TGCTTTTTCTTTCTATT	50	213
	14	K10	TGGTACATTTTCCTTCA	TGACATGATTGGTAAAAA	44	297
	15	K11	GGTGAAGTTTTAATATG	CAATAGTTTATGAAGTCC	40	205
	16	K12	AATAGATAGGGAAGTCC	GTGGCTTGAGTAACAGTT	50	184
CCM2 ^b	1	CV21	TCGAGCATGTAGCGGCTG	ACCACAGCAGTAGGACGC	64 ^e	139
	2	CV22	CCATAGGTACAACAAAAGC	TTTGGCAGGCACGTCTG	55	274
	3	CV23	TAGTGATGGTGGTGTGGC	AAGAGTACAGGGACCAAGG	55	216
	4	CV24	GCCAGCACAATATTCTCAG	TCACACATGTACTCCTTAGG	48	320
	5	CV25	CCTTCCACTGTGCTAAACT	GGAGCCAGTTCTGAGTAAG	50	215
	6	CV26	TCCAGCCAGACTGACCGA	ACTGCAGTAGCCCTCCT	55	235
	7	CV27	ACTCAAATGCCTCCAC	CACCAGACAACGCATTTGG	58	180
	8	CV28	ACGTGTGTGGGATGGAG	CCCCCTCCCTCATGCAG	58	215
	9	CV29	ACTCTTGCCTACTGTGCCA	ACATTCAGGAGGGATCAG	54	259
	10	CV210	TGAGAGAAGAGCTGAGTGG	ATGACGACTGCGGGAAG	60	392
CCM3 ^c	3	PDCD4	TTGGTATTTGCTTTCTCCTT	GCAGGAATTAAGAATTGCAGA	55	326
	4	PDCD5	TCTCAGAAATGTGCTTTTCCA	GAAAATAAAGTGGCAACCATCA	55	202
	5	PDCD6	CGCTCCAACAGATTCTAAA	GGGAAGGAAGATCCTTTGGT	55	300
	6	PDCD7	GACCAACATTGAAATCTTAGATG	TCGGAAGTACTTTAAGAAAAGAAGAA	55	256
	7	PDCD8	GCTGATGTTCTTTCTCACAAA	CCAACAATCAATCTTATTTTAAGTCA	55	238
	8	PDCD9	TCTCTTGCCTTGCCCTTGG	CTTCATTATCAGTTGCCTGGAG	55	288
	9	PDCD10	TTGGATGAAATTAATGCTTATTCTTT	CCCTTCAGGAGGGACTGATA	55	226

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación de los exones codificantes. ^a Cebadores previamente descritos por Sahoo et al 1999(Sahoo *et al.* 1999) y Laberge S. et al 1999 (Laberge-le *et al.* 1999). ^b Cebadores descritos por Denier et al 2004 (Denier *et al.* 2004). ^c Cebadores diseñados por el laboratorio. ^d Debido a la complejidad de los exones no codificantes de CCM1, el exón 1 corresponde al primer exón codificante ^e DMSO 10%

En la siguiente tabla se recogen otros cebadores usados para la amplificación de otras regiones de ADN:

Gen	Cebador	Localización	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
CCM1	Kup1F	Upstream CCM1	AACATGCCTGAAGATCTGTT	55
CCM1	KXR	Intrón NC3	TGTGAAAGGTTTTGAGGACG	56
CCM1	KX2R	intrón NC3	GAGTTGCTTATCACAGAACC	55

Tabla 3. Otros cebadores usados para la amplificación de ADN. Cebadores diseñados por nuestro laboratorio.

La mezcla de reacción y el programa de amplificación utilizado son los siguientes, para 40 µl de volumen final:

			Programa de amplificación		
	Volumen (µl)	Concentración final en tubo	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Tampón 10X MgCl ₂ 15mM	4	1X	94°C	5 min	1
dNTPs 10mM	0,8 (x dNTP)	0,2 mM	94°C	30 s	} 35
Agua	20,48	-	Tm	30s	
Cebador F (20 µM)	2	0,5 µM	72°C	30s	
Cebador R (20 µM)	2	0,5 µM	72°C	10 min	1
Taq polimerasa 5 U/µl	0,32	3,2 U	4°C	∞	
Muestra cDNA	8				

3.2.1 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de amplicones.

El producto anteriormente amplificado es separado en geles de agarosa al 1,5% en TBE 1X. Para hacer el gel, pesamos una cantidad de agarosa (Agarose D-1 Low EEO, Pronadisa) y añadiremos un volumen de TBE 1X, dependiendo del tamaño del portagel y el grosor que necesitemos. Una vez gelificado, precorremos el gel en la cubeta de electroforesis cubriendo totalmente el gel con buffer TBE 1X adicionado con bromuro de etidio. Añadimos a cada muestra tampón de carga 6X (sacarosa 40% en agua destilada, 0,005% de xilen cianol y 0,005% de azul de bromofenol). Preparamos en paralelo un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Molecular Weight XIV, Roche Diagnostics). La electroforesis se realiza a 100V durante 30-45 minutos.

Tras la electroforesis, visualizamos el gel con luz ultravioleta y cortamos las bandas con un bisturí depositándolas en tubos *ependorf* independientes. La purificación del producto de PCR se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche Diagnostics).

3.2.2. Secuenciación

El proceso de secuenciación utilizado se basa en el método descrito por Sanger (Sanger *et al.* 1977), el cual utiliza ddNTPs provocando la finalización de la cadena amplificada. Además, cada ddNTPs contiene un fluoróforo distinto. La separación se realiza en un equipo automatizado de electroforesis capilar (ABI 3130, Applied Biosystems). De esta manera, se visualiza en un mismo proceso todos los fragmentos pudiendo leer la secuencia con gran facilidad.

Para la secuenciación utilizamos BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), realizando algunas modificaciones sobre el protocolo. En nuestro caso, utilizamos 2 µl de Ready Reaction Premix, 2 µl de BigDye Sequencing buffer 5X, 1 µl de cebador 2µM y 5 µl del amplicón purificado. La amplificación fue realizada en un termociclador Verity (Applied Biosystem) siguiendo el siguiente programa: desnaturalización a 96°C durante 1 minuto; 25 ciclos de 96°C 10s, 50°C 5s y 60°C 75s; y mantener a 4°. Finalmente, el producto de esta secuenciación es purificado con BigDye Sequencing (Applied Biosystems), según instrucciones del fabricante), para eliminar restos de ddNTPs y enzima.

Por último, el análisis de las secuencias lo realizamos con el software Sequencing Analysis (Applied Biosystems) y la herramienta web BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

4. Aislamiento y cultivo de linfocitos

Linfocitos de sangre periférica de 9 pacientes CCM, un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B (LLC) y 7 sujetos sanos fueron aislados mediante Lymphoprep (Axis-Shield, Norway) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron resuspendidas en PBS 1X y se realizó un recuento celular en cámara de Thoma. Mediante

citometría de flujo (FACs, Beckon Dickinson) se comprobó que el paciente LLB1 contenía un 96% de células B.

Para el cultivo celular, las células fueron centrifugadas a baja velocidad (1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (TA)) y se descartó el sobrenadante. El *pellet* de células se resuspendió en medio de cultivo atemperado (1 ml por 10^6 células). Se utilizó medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% L-glutamina, 100 U/ml L-penicilina y 100 μ g/ml de Estreptomicina. Para esta tesis se utilizó también la línea celular linfocítica T Jurkat (Clon E6-1) obtenida de la *American Type Culture Collection*. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (BD Falcon) toda la noche en condiciones de 5% de CO₂ y 37°C.

5. Procesamiento del ARN

Las células fueron recogidas en tubos de 15ml y centrifugadas a baja velocidad (1300 rpm durante 5 min a TA). Las células se resuspendieron en 1 ml de TRIsure (Bioline) e incubaron 5 minutos a TA y se pasaron a un tubo *epENDORF* de 1,5 ml. En esta etapa, las muestras pueden guardarse hasta un mes a -60 a -70°C. A continuación, se añadió 0,2 ml de cloroformo a cada muestra, se agitaron durante 15s en vortex y se incubaron durante 2-3 min a TA. Las muestras se centrifugaron a 11800 rpm durante 15 minutos a 4°C en una microfuga y se recogió la fase acuosa en tubos nuevos. Se añadió 0,5 ml de isopropil alcohol frío a cada muestra, resuspendiendo e incubando 10 minutos a TA. Posteriormente, se centrifugaron a 11800 rpm durante 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol 75% y se centrifugó a 9300 rpm durante 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar boca abajo el tubo durante 30-45 minutos, hasta asegurarnos de la completa evaporación del etanol. Finalmente, hidratamos el *pellet* con agua libre de RNAsas e incubamos a 37°C durante 10 minutos. La concentración de ARN fue medida espectrométricamente en Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Las muestras de ARN se guardaron a -80°C hasta su uso.

5.1. Síntesis y amplificación del cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics), siguiendo sus instrucciones. Para ello, se utilizaron los cebadores aleatorios y dT₁₈ para la formación de cDNA, a excepción de los experimentos RACE (ver sección 5.2). Para la amplificación del cDNA se utilizaron los cebadores descritos en la tabla 4.

Gen	Cebador	Exon	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
CCM1	KXZF	NC1	CAGTGAAAAGGAGCAGGAAC	56
	KN11cF	NC1	GAAGCTCTTTCACCGCCAAC	62
	KN11dF	NC1	GTAGTTTCGGGAGAGGGTGAG	60
	KN1F	NC1	GGGAGGAGGGAAGGAGGAATGA	62
	KXYR	NC2	GGAGGGCATTCTGGTTGTC	56
	KXAF	1	TGGGAAATCCAGAAAACATAGA	55
	KXBR	2	ACTGTTGCCTTGAAGTTTCGT	58
	Ki5F	2a	TGATGTGAAGTGTAGTTCCC	55
	KXCR	3	ATAATGATGCTTCTCTGCC	55
	K1F	5	GAGCGGATAAAAACTAAT	47
	KX1R	5	AACAAAGGGTTGTAATACAGG	56
	KX3F	7	ACGACAGTGGGTAGATGATT	56
	Ki10R	7a	TTTTGCCGCCAGTATTTTCT	56
	K4SR	8	GTTTAGGAGAATCTGTAC	47
	KX7F	11	GAAGAGATGTGAGACTTCCC	55
	KX8R	12	TCAGGAGCTGTATAAAAGCC	55
	K9F	IVS12	AATTACGTTACTGAAAGC	48
	K13LR	IVS12	ACAAATGGCTTTCAGTAACGT	56
	KX10R	14	ATTTCTTACTGACACCTTC	50
	K12R	16	GTGGCTTGAGTAACAGTT	52
KX12R	16	TGCATTACAAAATGTGGTGG	55	
K7T11R	11/15	GACTGATGAGTAAAGCCTGTTTTT	58	
CCM2	CX1F	1	GCACGCGCGATATGGAAGA	63
	CC21F	1	TCGAGCATGTAGCGGCTG	60
	CCM2F	1-2	GCAAGAAGCCTGGAATTGTC	57
	CX1aF	1a	TGTCGGCAGAGGAGGAAC	59
	CX2R	2	AATGGCGAGACAATTCCAGG	58
	CV24BF	4	TCAGCCTGTCTGCGTACAA	59
	CX4F	4	GGATGACGCTGCACACCTGG	63
	CV24AR	4	CCTGAGGATGATATCTCC	53
	CX5R	5	TGCACTCTCCGACAGGGAGC	64
	CV29BF	9	GCTGTCATCACAGGAGATCC	58

	CV29AR	9	TAGAGCTGCCGCAGGTTGAT	62
	CX9R	9	GCCCCATTGCGGTACTCGTG	64
	CV210BF	10	TCACTGACAGCTTTGGCAG	58
	CV210AR	10	AACTGGATGTGGTGCTCAG	58
	CV210BR	10	ATGACGACTGCGCGGAAG	60
CCM3	CCM3F	3	TGGCTTTTGAATGAGGATGA	55
	CCM3R	8	GCTCGTGCCTTTTCGTTTAG	58
	PDCD10R	9	CCCTTCAGGAGGGACTGATA	58

Tabla 4. Cebadores usados para el estudio del cDNA en los genes CCM1, CCM2 y CCM3.

La amplificación del cDNA se realizó siguiendo dos esquemas, dependiendo del tamaño del fragmento amplificado, en un volumen final de 40 μ l:

Esquema 1					
			Programa de amplificación		
	Volumen (μ l)	Concentración final en tubo	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Tampón 10X MgCl ₂ 15mM	4	1X	94°C	5 min	1
dNTPs 10mM	0,8 (x dNTP)	0,2 mM	94°C	30 s	} 35
Agua	26,48	-	Tm	30s	
Cebador F (20 μ M)	1	0,5 μ M	72°C	60s	
Cebador R (20 μ M)	1	0,5 μ M	72°C	10 min	1
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0,64	3,2 U	4°C	∞	
Muestra cDNA	4				

Esquema 2					
			Programa de amplificación		
	Volumen (μ l)	Concentración final en tubo	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Tampón 10X MgCl ₂ 15mM	4	1X	94°C	5 min	1
dNTPs 10mM	1 (x dNTP)	0,25 mM	94°C	30 s	} 35
Agua	25,1	-	Tm	30s	
Cebador F 20 μ M	1	0,5 μ M	68°C	2-4 min*	
Cebador R 20 μ M	1	0,5 μ M	68°C	7 min	1
Taq polimerasa 3,5U/ μ l	0,9	3,15 U	4°C	∞	
Muestra cDNA	4				

* Se aumenta 5s por ciclo a partir del ciclo 10.

Los fragmentos amplificados se corren en gel de agarosa al 1,5-2,5%. El proceso de purificación de bandas y secuenciación es seguido tal y como describimos en los apartados 3.2.1 y 3.2.2 del Material y métodos. En el análisis bioinformático de las secuencias de cDNA se utilizó, además, la herramienta web BLAT (genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat) de la Universidad de Santa Cruz, en el que se alinearon las secuencias frente a un genoma de referencia (GRCh37/hg19; Feb 2009).

5.2. Amplificación rápida de las terminaciones del cDNA (RACE)

Para la realización de esta técnica se utilizó 5´/3´RACE Kit, 2nd Generation (Roche Applied Science). Varios son los usos de la técnica RACE, entre los que se incluyen: i) generación de cDNAs de longitud completa; ii) aislamiento y caracterización de las terminaciones 5´ o 3´, incluso para mRNA con bajo número de copias; iii) amplificación y posterior clonaje de mRNAs atípicos; y iv) amplificación y secuenciación directa de sin necesidad de clonaje. En esta tesis, la hemos utilizado para aislar y caracterizar terminaciones 5´ del gen *CCMI*, amplificando y secuenciando directamente sin paso previo de clonación.

La técnica 5´RACE se fundamenta en la adición de una cola de poliA en el extremo 3´ del cDNA, correspondiente a la región 5´ del mRNA. Para ello, utiliza la enzima recombinante transferasa terminal (TdT), que cataliza la adición independiente de la plantilla de deoxi- o dideoxinucleótidos trifosfato en las terminaciones 3´ tanto de fragmentos de ADN de doble cadena como de simple cadena. En nuestro caso, se siguieron las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. A continuación se describe el proceso seguido (figura 21):

- 1- Síntesis de cDNA con un cebador específico de la secuencia de estudio (GSP1) a partir de 1µg de ARN.

2- Purificación el cDNA obtenido con High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics), siguiendo las indicaciones del fabricante. Adición de la cola de poliA con la enzima TdT y nueva purificación.

3- Amplificación primaria con un cebador específico de la secuencia (GSP2), río arriba respecto a la posición de GSP1 en el gen, y el cebador APdT (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'). Para esta PCR se siguió el segundo esquema de amplificación del apartado 5.1, utilizando 4 minutos de extensión y 30 ciclos.

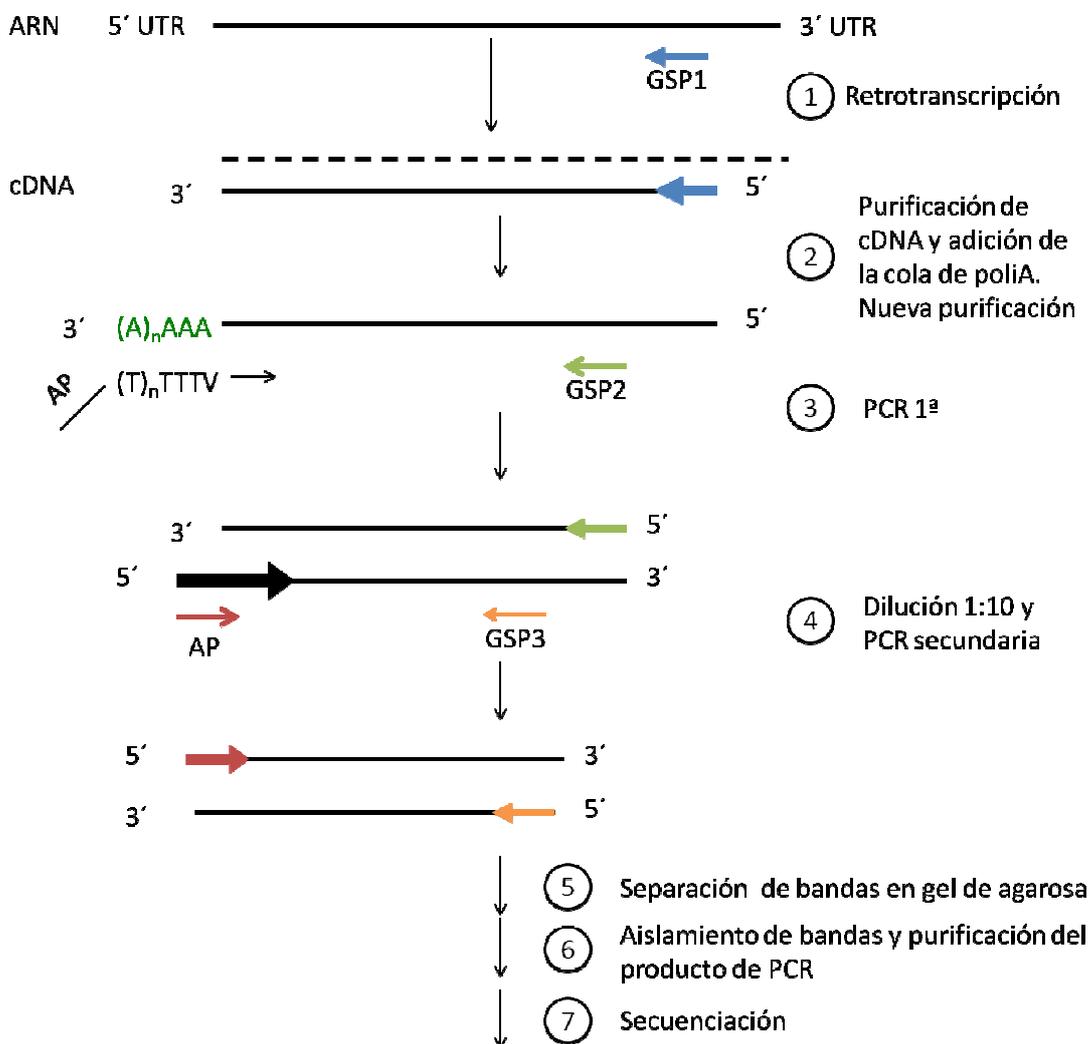


Figura 21. Representación esquemática de la técnica 5'RACE utilizada.

- 4- El producto obtenido fue diluido 1:10 en agua destilada. De esta dilución se realizó una PCR secundaria. En este caso, un cebador específico de la secuencia (GSP3), río arriba respecto a la posición de GSP2 en el gen, y el cebador AP (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3') fueron utilizados siguiendo el mismo esquema que para la PCR primaria.
- 5- El producto de PCR secundaria se separó en gel de agarosa 2-2,5%, a 90V durante 3-5h.
- 6- Las bandas visualizadas (figura 22) son cortadas y purificadas.
- 7- Secuenciación directa de los productos purificados (figura 22).

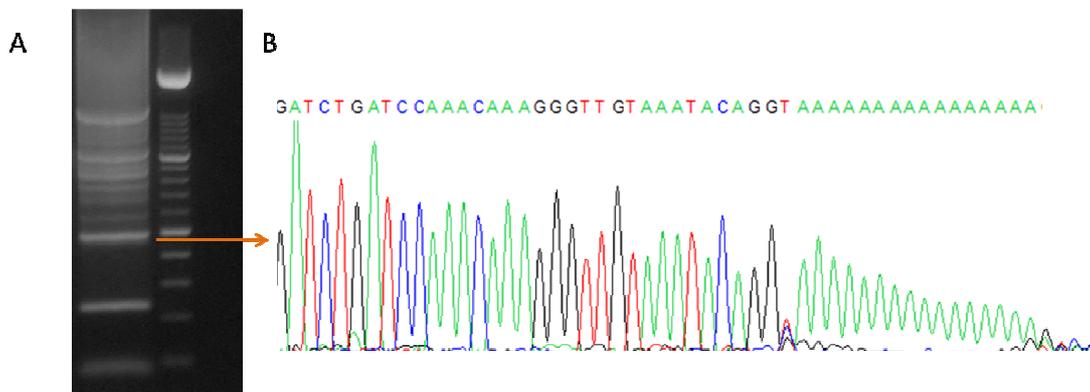


Figura 22. **A.** Fotografía tomada de la electroforesis de un gel de agarosa correspondiente a la PCR secundaria realizada con los cebadores AP y K4SR (*CCMI*). En ella, se visualizan bandas de distintos tamaños, con mayor o menor intensidad. **B.** Secuenciación de la banda indicada por la flecha naranja, en la que se observa la cola de poliA añadida con la enzima TdT, correspondiente a la terminación 5' de dicho fragmento.

5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para la determinación del nivel de transcripción partimos de 500 ng de ARN para la síntesis del cDNA, utilizando los cebadores aleatorios y dT₁₈, siguiendo las instrucciones del fabricante (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics).

Todas las reacciones se realizaron al menos por duplicado usando placas de 96 pocillos (MicroAmp, Applied Biosystems) en un sistema de detección ABI Prism[®] 7300

(Applied Biosystems). Para cada reacción se utilizaron 2 µl de cDNA en una mezcla de reacción que contenía 10 µl de SYBR® Premix Ex Taq™ (2x), 0,4 µl de ROX™ Reference Dye (normalización de la intensidad de señal) y 0,2 µM de cada cebador (tabla 5). La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: i) desnaturalización inicial 95°C durante 10 minutos; ii) 40 ciclos de desnaturalización 95°C durante 15 segundos, alineamiento durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; y iii) curva de disociación. El programa informático empleado fue System Detection Software v1.4 (Applied Biosystems).

Gen	Fragmento	Secuencia (5' - 3') del cebador forward	Secuencia (5' - 3') del cebador reverse	T (°C) alineamiento	Tamaño producto (pb)
CCM1	Spl1	KN11aF: TCATAGCCACGGTGACTGTCCC	KN2a1a: AAAGCCAAAACCTGGGGCAAC	63	192
	Spl2	KN11bF: GTAAAGAGCAGGTGACTGTCCCA	KN1b1a: CTGGTGAGGCTGGGGCAACTAG	63	156
	Spl3	KN11aF: TCATAGCCACGGTGACTGTCCC	KN2b1b: GACTTCTGGTGAGGCTCCGTTTTTC	63	189
	Spl4	KN11bF: GTAAAGAGCAGGTGACTGTCCCA	KAN1a: GGATTTCCCATTTGCTGGGGCAAC	63	154
	Spl5	KN1F: GGGAGGAGGGAAGGAGGAATGA	KAN1b: GATTTCCCATTTGCTCCGTTTTCCC	63	193
	Spl6	KN11bF: GTAAAGAGCAGGTGACTGTCCCA	KAN1b: GATTTCCCATTTGCTCCGTTTTCCC	63	199
	Spl7	KN11aA: GATTCATAGCCACGCAATGGG	KXBR: ACTGTTGCCTTGAAGTTTCGT	58	204
	Spl8	KN11b2: GGACAGTAAAGAGCAGGTTTTTG	KXYR: GGAGGGCATTCTGGTTGTC	58	266
	Ex 1-2	KXAF: TGGGAAATCCAGAAAACATAGA	KXBR: ACTGTTGCCTTGAAGTTTCGT	56	185
	Ex 11-12	KX7F: GAAGAGATGTGAGACTTCCC	KX8R: TCAGGAGCTGTATAAAAGCC	56	118
	Ex 2a	Ki5F: TGATGTGAAGTGTAGTCCC	KXCR: ATAATGATGCTTCTCTGCC	56	92
	Ex 7a	KX3F: ACGACAGTGGGTAGATGATT	Ki10R: TTTTGCCCCAGTATTTTCT	56	167
	Ex 13L	K9F: AATTACGTTACTGAAAGC	KX10R: ATTTCTTACTGACACCTTC	50	219
Δ12-14	KX7F: GAAGAGATGTGAGACTTCCC	K7T11R: GACTGATGAGTAAAGCCTGTTTTT	56	58	
HPRT1		AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	GACTTTGCTTCTTGGTCAGG	58	101

Tabla 5. Secuencias de cebadores usados en RT-qPCR.

Se realizaron curvas de calibrado partiendo de distintas concentraciones de ARN de PBMC de un control sano (1000 ng a 0,1 ng, mediante diluciones seriadas, figura 23) y se calcularon las eficiencias para cada reacción (tabla 6). Los niveles de transcripción se

calcularon relativizando frente al gen constitutivo HPRT1 utilizando para ello el método Pfaffl (Pfaffl 2001).

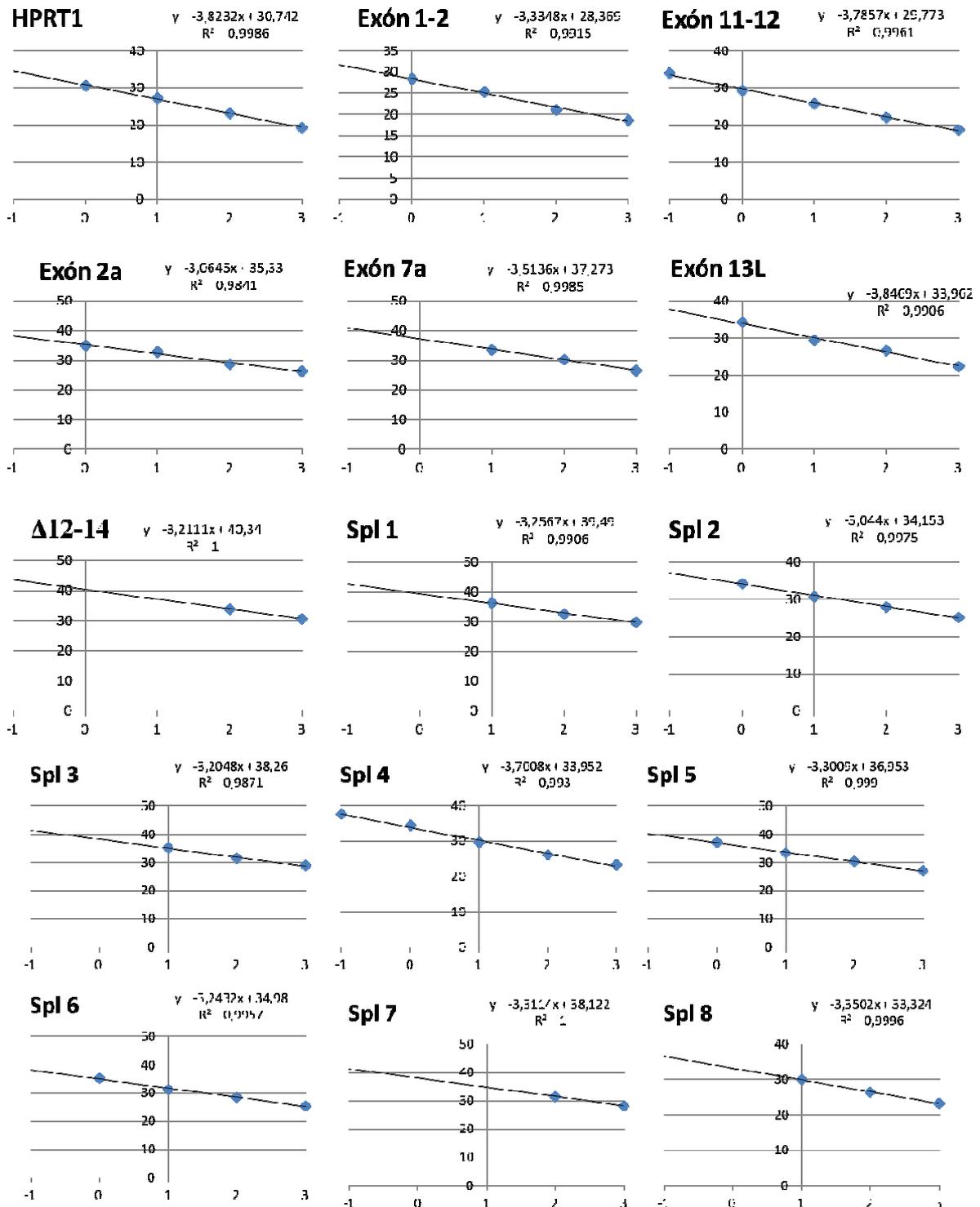


Figura 23. Curvas de eficiencia

Cebador	HPRT	Exón 1-2	Exón 11-12	Exón 2a	Exón 7a	Exón 13L	Δ12-14	
Eficiencia	83%	99%	84%	112%	93%	82%	105%	
Cebador	Spl1	Spl2	Spl3	Spl4	Spl5	Spl6	Spl7	Spl8
Eficiencia	103%	113%	105%	86%	101%	103%	100%	99%

Tabla 6. Eficiencias de las amplificaciones con los cebadores usados para RT-qPCR

6. Otras herramientas bioinformáticas y análisis *in silico*

Los cebadores se diseñaron con Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y se comprobaron las posibles amplificaciones cruzadas mediante PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tanto para cebadores usados para amplificar ADN como para cDNA. Los electroferogramas obtenidos mediante 5'RACE se comprobaron con Sequencing Analysis (Applied Biosystem) y las secuencias nucleotídicas se alinearon con BLAST y BLAT. Las herramientas Human Splicing Finder (HSF) (Desmet *et al.* 2009) y MaxEnt (Yeo & Burge 2004) se usaron para analizar los sitios de splicing de los nuevos exones y las variantes de splicing. Los sitios de inicio de transcripción se comprobaron en la base de datos de sitios de inicio de transcripción (The Database of Transcriptional Start Sites, DBTSS; <http://dbtss.hgc.jp/>). El análisis de promotores se realizó con MPrompDB (<http://mprompdb.wistar.upenn.edu/>). Los tamaños moleculares y puntos isoeléctricos teóricos se calcularon con la herramienta Compute pI/Mw de ExPasy (http://web.expasy.org/compute_pi).

Por otro lado, las mutaciones encontradas en las familias con CCM se analizaron *in silico* para predecir su posible papel sobre la proteína codificada. El software utilizado se detalla a continuación:

- PolyPhen-2 y SIFT: algoritmos que predicen el efecto de la mutación en la secuencia proteica en base a datos de estructura y secuencia de la proteína (Adzhubei *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2009).

- Human Splicing Finder (HSF): predicción del efecto de cambios en el ADN sobre la maduración del ARNm.

7. Análisis mediante *Western blot*

Los experimentos del presente trabajo se han desarrollado siguiendo protocolos contrastados por diversos autores y metodologías similares a las ya empleadas en trabajos que sirven de base al presente. En ocasiones, estos procedimientos han sido adaptados al tipo celular en estudio y optimizados según las indicaciones de las compañías biotecnológicas.

A. LISADO CELULAR

1. Los linfocitos (PMBC) cultivados toda la noche se recogieron en tubos de 15 ml y los pocillos se lavaron con PBS 1X, manteniéndolos en frío. En el caso de células Jurkat T, éstas fueron cultivadas 2h en ausencia o presencia de 4-PB. Las células se centrifugaron a 1500rpm, y se descartó el sobrenadante
2. Se añade 150 μ l de tampón de lisis frío (20mM TrisHCl pH 7,4; 135 mM NaCl; 1mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1% glicerol; 10% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich); inhibidor de fosfatasa 1X; inhibidores de proteasas 1X; 2 mM PPI).
3. Se traspasa el lisado a tubos de 1,5 ml manteniéndose durante 30 minutos a 4°C en rotación suave y constante para que se produzca una mejor solubilización de las proteínas.
4. Las muestras se centrifugan a 4°C durante 20 minutos a 13000 rpm.
5. El sobrenadante se traspasa a otro tubo de 2 ml, retirando una pequeña alícuota de 30 μ l que emplearemos para la normalización de la concentración de proteínas.
6. Medición de proteínas: Se utiliza un kit muy sensible, método del ácido bincinconínico) para la determinación colorimétrica cuantitativa del contenido proteico total en soluciones acuosas diluidas. Se prepara una recta patrón con

albúmina, siendo el blanco el tampón de lisis. Se sigue el protocolo que marca la casa comercial.

7. Una vez normalizada la cantidad de proteína, se separa un volumen pequeño del lisado de células, alrededor de 100 μ l, a otro tubo de 2 ml al que se le añade unos 30 μ l de tampón-SDS de desnaturalización 5X con DTT 100 mM.
8. Se homogeniza el lisado con el tampón de carga y se desnaturaliza en el termobloque a 95 °C durante 5 minutos. Se deja enfriar las muestras, que se someterán a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa para el análisis del *Western blot*.

B. INMUNODETECCIÓN (“WESTERN BLOTTING”)

El primer paso en un *Western blotting* es la separación de las proteínas utilizando un gel de electroforesis. Los lisados celulares solubles, son desnaturalizados en el tampón de carga y separados por SDS-PAGE (Laemmli 1970) . Tras la electroforesis, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa con ayuda de un campo eléctrico. Mediante técnicas inmunológicas unidas a quimioluminiscencia enzimática (Whitehead *et al.* 1979; Durrant *et al.* 1990) se analizan dichas proteínas con gran sensibilidad. Con el uso de peroxidasa de rábano y luminol en nuestro caso (Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate), se origina luminiscencia como subproducto, que es captada por una película de revelado. La intensidad de la señal es proporcional a la abundancia del antígeno en la membrana.

Procedimiento:

1. Los lisados celulares solubles, son desnaturalizados en el tampón de carga y separados por SDS-PAGE (10-15%). La cantidad de proteína por carril de electroforesis oscila entre 30-100 μ g.

2. El contenido del gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, (Hybond; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), mediante un sistema semi-seco, utilizando una intensidad de corriente de 100 mA por gel a transferir.
3. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, se incuba la membrana a temperatura ambiente (25°C) y 30 minutos con solución de bloqueo, con agitación orbital suave. Pasados los 30 minutos, se realizan cuatro lavados utilizando PBS-T, con agitación y a mayor velocidad.
4. La membrana se incuba con el anticuerpo primario, en nuestro caso, anticuerpo Krit1 N-term (dilución 1:1000; AP18206a, ABGENT) o GAPDH (dilución 1:5000; Calbiochem) durante toda la noche en agitación a velocidad lenta.
5. Se lava cuatro veces durante 5 minutos con PBS-T.
6. Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón (según sea el primario Krit1 o GADPH), que se encuentra unido a peroxidasa de rábano. Se prepara a una dilución 1:10000 en PBS-T y se incuba en agitación lenta durante 30 minutos.
7. Se lava 5 veces con PBS-T.
8. La peroxidasa de rábano origina una reacción de quimioluminiscencia altamente sensible al aplicar el sustrato del kit “Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate”.
9. Se obtienen autorradiografías de la membrana, revelando películas fotográficas, con la utilización de líquido revelador y fijador, en cuarto oscuro.
10. Se escanean las bandas obtenidas por el *immunoblot* para su posterior análisis semicuantitativo.

Resultados

El objetivo tanto del primer como del segundo apartado fue el estudio de la genética molecular y la descripción de las características clínicas de las malformaciones cerebrales cavernosas en una cohorte de pacientes españoles. Los resultados de ambos apartados forman parte del siguiente manuscrito:

- Mondejar R, Solano F, Rubio R, Delgado M, Perez-Sempere A, Gonzalez-Meneses A, Vendrell T, Izquierdo G, Martinez-Mir A, and Lucas M (2014). Mutation prevalence of cerebral cavernous malformation genes in spanish patients. *PLoS One* **9**, e86286

1. Sintomatología clínica de los pacientes CCM

Los principales síntomas al debut de la enfermedad fueron dolores de cabeza (36%), convulsiones epilépticas (18%), inestabilidad y mareos (18%), migrañas (12%), hemorragia cerebral (5%) y crisis mioclónicas (1%). Tres casos fueron descubiertos de forma casual tras una MRI en pacientes con diagnóstico clínico de: i) Síndrome de Noonan asociado a malformación de Arnold-Chiari; ii) menarquia prematura en una niña de 9 años; y iii) cáncer no cerebral con posibles metástasis secundarias en un paciente. En la siguiente tabla se describen las características clínicas y radiológicas de algunos pacientes con mutación detectada.

Pedigrí	nº lesiones	Tamaño ^a	Localización	Convulsiones epilépticas	Hemorragia	Dolor de cabeza	Otros
CV 105	Múltiples	12x10 mm	Área subcortical de las circunvoluciones largas insulares del lado izquierdo	No	Si	No	
CV 114	Múltiples	-	En pedúnculo cerebeloso con sangrado, en localización supratentorial, infratentorial y en medula espinal	No	Si	No	
CV 116	Múltiples	-	-	Si	Si	No	

RESULTADOS

CV118	Múltiples	-	-	-	-	-	Síndrome de Noonan y Chiari
CV 125	Múltiples	-	Ambos hemisferios	Si	Si	No	
CV126	Múltiples	3x4 cm	A nivel frontal bilateral con predominio derecho a nivel parietal, temporal bilateral en cabeza de núcleo caudado izquierdo, mesencéfalo y en protuberancia.	Si	Si	No	Parestesia izquierda desde los 7 años
CV 133	2	-	Región pineal y temporal derecha	-	-	-	
CV136	2		Frontal y parietal derecha	-	-	Si	Menarquia prematura
CV 139	Múltiples	-	-	-	-	Si	
CV 148	Múltiples (17)	-	Supra e infratentorial, en ambos hemisferios cerebrales y cerebelosos. Otro en troncoencéfalo a nivel medio protuberancial.	-	-	-	
CV 163	Múltiples (50-70)	-	Hemisferios cerebrales. Cerebelo y tronco	-	Si	-	
CV 146 II1	4	-	-	Si	No	Si	
CV 146 I1	2	-	-	No	No	Si	
CV 147	Múltiples	4x3 cm	La mayor en región occipital derecha. Otros pequeños a nivel infra y supratentorial.	No	Si	Si	
CV150	Múltiples		Supra e infratentorial				
CV170	Múltiples	14mm	A nivel forntal derecho	Si			Desorientación y déficit de memoria

Tabla 7. Descripción clínica y radiológica de pacientes con mutación detectada. ^a Tamaño de la lesión de mayor tamaño.

2. Prevalencia de mutaciones de genes CCM en población española.

En esta Tesis, el estudio molecular de los genes CCM incluyó un total de 264 pacientes, detectando 32 mutaciones diferentes. En la tabla 8 se detallan las mutaciones encontradas así como su condición. De estas mutaciones, 27 de ellas fueron consideradas como patogénicas, encontrándose en 31 formas familiares y 4 casos esporádicos. En dos casos, a pesar de los estudios realizados en cDNA, no se pudo determinar la patogeneidad de

la mutación. En el gen *CCM1* se detectaron 19 mutaciones localizadas en 65 pacientes. De ellas, el 63% de las mutaciones fueron de tipo nonsense o frameshift. En los genes *CCM2* y *CCM3*, se localizaron siete y cuatro mutaciones en ocho (23,1%) y cuatro pacientes (5,5%), respectivamente. En *CCM3*, las mutaciones afectaron al sitio de splicing y al marco de lectura (tabla 9). En cuanto a las formas familiares, la prevalencia de mutaciones fue del 38%, mientras que en casos esporádicos fue sólo del 9%.

Pedigrí	Nº de individuos afectados	Forma ^b	Exon/Intron	Gen	Mutación	Tipo de mutación	Cambio de aminoácido predicho	Condición
CV171, 172, 175	6	F	NC1-NC3	<i>CCM1</i>	5'UTR del <i>CCM1</i>	Delección genómica	Ausencia del transcrito (Riant <i>et al.</i> 2013b)	Patogénica ^c
CV126	4	F	5	<i>CCM1</i>	c.619_620delinsG ^a	Frameshift	p.His207ValfsX6	Patogénica
CV122	1	S	5	<i>CCM1</i>	c.691A>G ^a	Missense	p.N231D	Posiblemente patogénica
CV148	6	F	6	<i>CCM1</i>	c.801delA ^a	Frameshift	p.Lys267AsnfsX8	Patogénica
CV150	1	S	6	<i>CCM1</i>	c.842A>G ^a	Missense > Sitio de splicing alterado	p.Asp281GlyfsX5	Patogénica ^c
CV118	2	F	7	<i>CCM1</i>	c.880C>T	Nonsense	p.R294X (Riant <i>et al.</i> 2013b)	Patogénica
CVs 133, 163	3	F	7	<i>CCM1</i>	c.902C>G	Nonsense	p.S301X (Sahoo <i>et al.</i> 1999)	Patogénica
CV59	2	F	7	<i>CCM1</i>	c.923T>A	Missense	p.L308H (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Desconocida ^c
CV87	7	F	8	<i>CCM1</i>	c.968_971dupCACC	Frameshift	p.Ile325ThrfsX11 (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV160	2	F	9	<i>CCM1</i>	c.1114C>T ^a	Nonsense	p.Q372X	Patogénica
CV129	2	F	IVS9	<i>CCM1</i>	c.1255-4delGTA	Sitio de splicing alterado	ND (D'Angelo <i>et al.</i> 2011)	Patogénica
CV170	1	F	10	<i>CCM1</i>	c.1267C>T	Nonsense	p.R423X (Cave-Riant 2002) (Cave-Riant <i>et al.</i> 2002)	Patogénica
CV116	1	F	10	<i>CCM1</i>	c.1314_1325del ^a	Frameshift	p.Gly439HisfsX36	Patogénica
CV79	1	F	10	<i>CCM1</i>	c.1360_1363delTCTC	Frameshift	p.Ser454LysfsX39 (Cave-Riant <i>et al.</i> 2002; Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV36	1	F	10	<i>CCM1</i>	c.1362_1363delTTC	Frameshift	p.Gln455ArgfsX23 (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV136	1	S	12	<i>CCM1</i>	c.1579G>A	Missense	p.A527T (Cave-Riant <i>et al.</i> 2002)	Patogénica
CV105, 147	2	F	IVS12	<i>CCM1</i>	c.1730+5G>A	Sitio de splicing alterado	NA (Riant <i>et al.</i> 2013b)	Patogénica
CV86	3	F	IVS12	<i>CCM1</i>	c.1730+4delAGTA	Sitio de splicing alterado	NA (Cave-Riant <i>et al.</i> 2002; Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV166	1	F	13	<i>CCM1</i>	c.1775G>C	Missense	p.S592T	Desconocida ^c
CV10	5	F	14	<i>CCM1</i>	c.1904InsA	Nonsense	p.Y635X (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica

RESULTADOS

CV146	2	F	12-16	CCM1	Exones 12-16 del ^a	Delección genómica	NA	Patogénica
CV77	1	F	-	CCM2	delCCM2	Delección genómica	NA (Felbor <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV128	5	F	1	CCM2	5' UTR-exon1del	Delección genómica	NA (Denier <i>et al.</i> 2004; Felbor <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV168	1	F	IVS1	CCM2	c.30+1G>A	Sitio de splicing alterado	Ausencia de transcrito (Verlaan <i>et al.</i> 2004)	Patogénica ^c
CV140	1	F	2	CCM2	c.55C>T	Nonsense	p.R19X (Verlaan <i>et al.</i> 2004)	Patogénica
CV100	1	F	2	CCM2	c.169_172delAGAC	Frameshift	p.Arg57CysfsX1 (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV145	2	F	3	CCM2	c.222G>A	Transición	None	Polimorfismo
CV ^e	15	F	5	CCM2	c.554_567del	Frameshift	p.Ala186GlyfsX44 (Ortiz <i>et al.</i> 2007)	Patogénica
CV114	1	F	6	CCM2	c.713C>A ^a	Missense	p.S238Y	Posiblemente patogénica
CVs 119, 124	6	F	IVS9	CCM2	c.1054+12C>T	Intrónica	NA	Desconocida
CV139	1	F	5	CCM3	c.211delA ^a	Frameshift	p.Ser71AlafsX18	Patogénica
CV127	1	F	IVS6	CCM3	c.395+1G>C ^a	Sitio de splicing alterado	NA	Patogénica
CV164	1	S ^d	IVS7	CCM3	c.474+5G>A	Sitio de splicing alterado	p.Asp133HisfsX10 (Liquori <i>et al.</i> 2006)	Patogénica ^c
CV125	2	F	8	CCM3	c.538dupA ^a	Frameshift	p.Tyr180AsnfsX3	Patogénica

Tabla 8. Mutaciones encontradas en los genes CCM en población española. *CCM1* (NM_004912), *CCM2* (NM_031443), *CCM3* (NM_145859). ^a Mutación no descrita en la literatura. ^b F: forma familiar; S: forma esporádica. ^c Mutaciones estudiadas en cDNA. ^d Mutación *de novo*.

Tipo de mutaciones	CCM1	CCM2	CCM3
Nonsense / Frameshift	10	3	2
Missense	6	1	0
Sitio de splicing alterado	3	1	2
Delecciones genómicas	2	2	0
Total	21	7	4
Nº casos índices	23	12	4
Nº sujetos con mutación	65	21	5

Tabla 9. Tipo de mutaciones encontradas en los genes CCM

2.1. Mutaciones detectadas en el gen CCM1.

El análisis mediante MLPA y secuenciación de los exones codificantes y región intrónica colindante, identificó un total de 20 mutaciones (figura 24), siendo 8 de ellas nuevas descritas en esta tesis. A continuación se describen las mutaciones más relevantes.

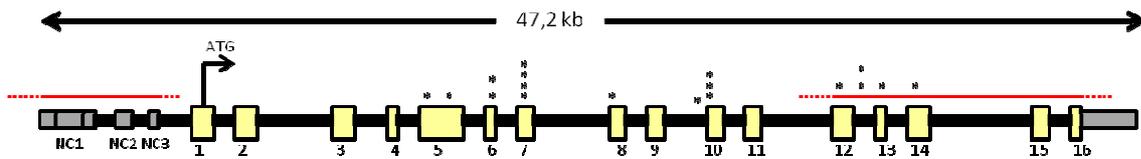


Figura 24. Mutaciones localizadas en *CCM1*. Las líneas rojas indican regiones delecionadas y los asteriscos la localización de las mutaciones.

2.1.1. Delección de los exones 5' no codificantes.

Se recibieron muestras de dos pacientes diagnosticados clínicamente y radiológicamente de cavernomatosis (CV171, padre; y CV172, hija menor). Posteriormente, se recibió muestra de la hija mayor (CV178) pero no tenía clínica sugestiva ni lesiones localizadas en la MRI. De forma independiente, se estudió a un hermano del padre (CV175), el cual presentaba lesiones en MRI. Los sujetos CV171 y CV175 pertenecen a una amplia familia que comprenden 14 hermanos, 5 de ellos afectados (3 varones y dos mujeres). Debido a la alta dispersión geográfica de los mismos no ha sido posible estudiar hasta la fecha a los otros hermanos.

El análisis mediante MLPA arrojó una disminución en la intensidad de los picos que corresponden a las sondas localizadas en los exones no codificantes (figura 25) en los cuatro sujetos estudiados. Se realizaron amplificaciones sucesivas para detectar el tamaño delecionado con los cebadores descritos en las tablas 2 y 3 (Material y métodos). Se amplificó con un cebador localizado unas 5kb *upstream* de *CCM1* (Kup1F) hasta el intrón NC3 (cebadores KXR y KX2R) e intrón 1 (cebador KAR). En todas ellas se visualizó una única banda, detectándose mediante secuenciación el exón NC3. Por ello, se determinó una

delección superior a 8 kb. Por otro lado, se cuantificó el nivel de transcripción de *CCMI* en linfocitos de sangre periférica de los pacientes CV171 y CV172 mediante RT-qPCR. La comparación frente a un grupo de 7 controles sanos mostró una disminución del 48-75% en el nivel de transcripción de *CCMI*, relativo a los exones 1-2 (figura 26). Por tanto, la delección de la región 5' no codificante produciría la ausencia del transcrito completo en el cromosoma afecto, justificando así el diagnóstico molecular de cavernomatosis.

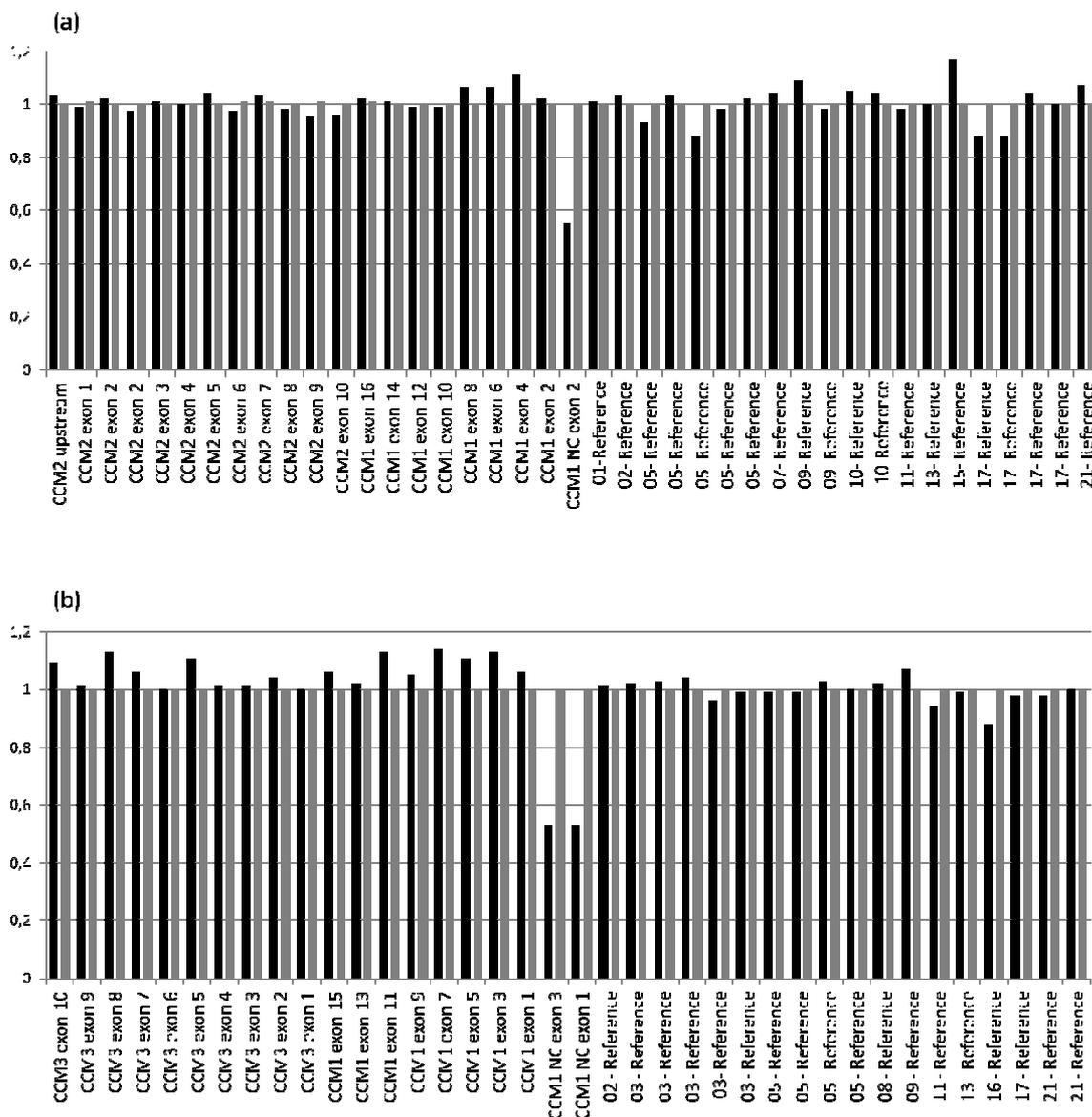


Figura 25. Análisis cuantitativo de MLPA de las mezclas de sondas (a) P130 y (b) P131. Las columnas negras representan al paciente CV171 y las columnas grises representan un sujeto sano. La delección de los exones no codificantes se muestran como la disminución del 50% aproximadamente en la intensidad de los fragmentos respecto al sujeto sano.

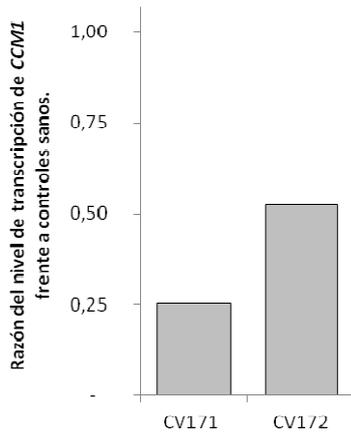


Figura 26. Nivel de transcripción de CCM1 (relativo a los exones 1-2) en los pacientes CV171 y CV172 frente a PBMC de controles sanos (n=7) en linfocitos de sangre periférica, donde se observa una disminución del 75% y 48% de expresión, respectivamente.

2.1.2. Mutación c.619_620delinsG

En este caso familiar de cuatro generaciones, la sospecha de cavernomatosis surgió tras varias crisis epilépticas de la paciente II-3 e historia familiar de fallecimiento materno debido a un derrame cerebral. La paciente II-3, de 66 años, refirió hemiparestesia izquierda desde los siete años y crisis epilépticas desde los 11 años de edad. La resonancia magnética mostró múltiples cavernomas, siendo el mayor de ellos de 3x3x4 cm. Dichas lesiones se localizaron a nivel frontal bilateral, con predominio derecho a nivel parietal, temporal bilateral en cabeza de núcleo caudado izquierdo, mesencéfalo y en protuberancia. Tres miembros más de su familia presentaron lesiones cavernomatosas (figura 27).

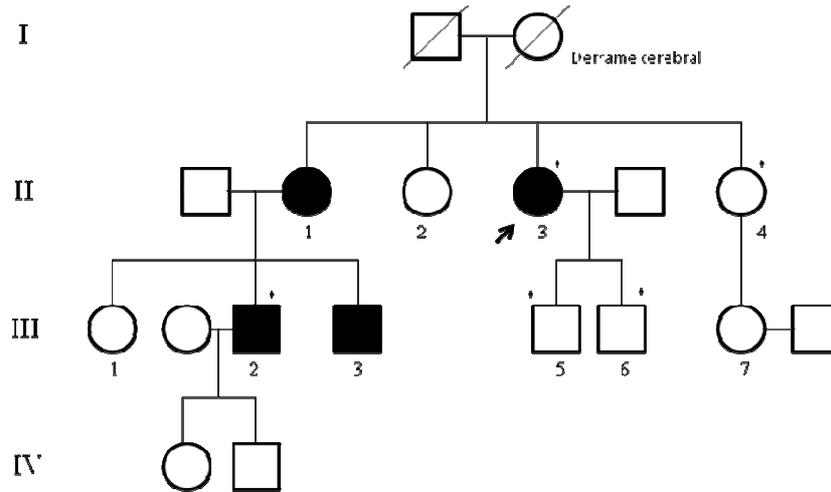


Figura 27. Pedigrí de la familia CV126. Los asteriscos indican los sujetos estudiados.

En cuanto al diagnóstico molecular, el análisis mediante MLPA resultó normal. La secuenciación del gen *CCMI* reveló una mutación en el exón 5 en la que se produce la delección de dos bases (C y A) y la inserción de una guanina, c.619_620delinsG (figura 28). Esta mutación fue detectada también en el sujeto III-2, con MRI positiva. Por el contrario, la mutación fue negativa en los probandos II-4, III-5 y III-6, con RM negativa. La consecuencia de la mutación es el desplazamiento del marco de lectura, lo que lleva a la producción de una proteína truncada de 212 aminoácidos (p.His207ValfsX6). Esto justificaría el diagnóstico molecular de la enfermedad.

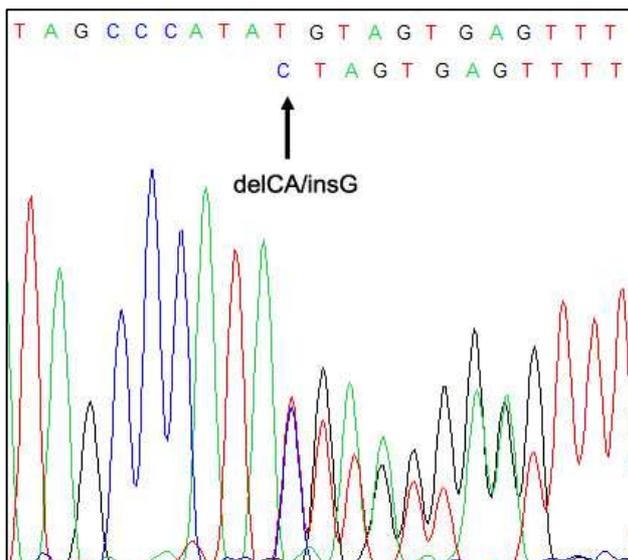


Figura 28. Secuenciación del exón 5 de *CCMI* (hebra reversa) del paciente índice CV126, en la que se muestra la delección de dos nucleótidos (CA) y la inserción de una G en la posición 618 del cDNA (NM_194455.1).

2.1.3. Mutación c.691A>G

Paciente de 65 años, cuya secuenciación del gen *CCM1* arrojó una mutación en el exón 5, c.691A>G (figura 29), no descrita previamente en la literatura. Esta mutación produce un cambio de aminoácido en el residuo 231 (p.N231D), no siendo detectada en 200 cromosomas de controles sanos. El análisis *in silico* realizado con Polyphen-2 (puntuación: 0,982) y SIFT (puntuación: 0) estimó que dicha mutación era posiblemente patogénica. Además, el cambio de aminoácido se produciría en el segundo motivos NPXY/F, algo que podría influir en las interacciones con otras proteínas. Sin embargo, no estuvo disponible el cDNA para la comprobación de la mutación. Con esto, sólo pudimos concluir que esta mutación es posiblemente patogénica.

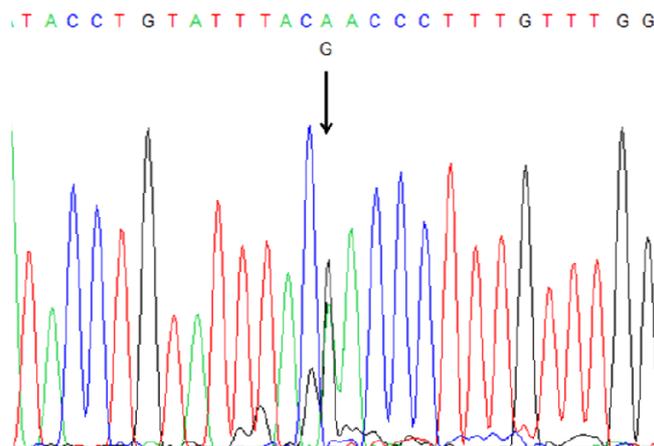


Figura 29. Secuenciación del exón 5 de *CCM1* (hebra sentido) del paciente CV122, en la que se muestra la transición A>Gen la posición 691 del cDNA (NM_194455.1).

2.1.4. Mutación c.801delA

Se recibió muestra del paciente índice III-6 (familia CV148, figura 30) de 11 años con diagnóstico clínico y radiológico e historia familiar de Cavernomatosis. En la RMN se detectaron múltiples lesiones, al menos 17, localizadas a nivel supra e infratentorial, en ambos hemisferios cerebrales y cerebelosos, y otro en troncoencefalo a nivel medio protuberancial.

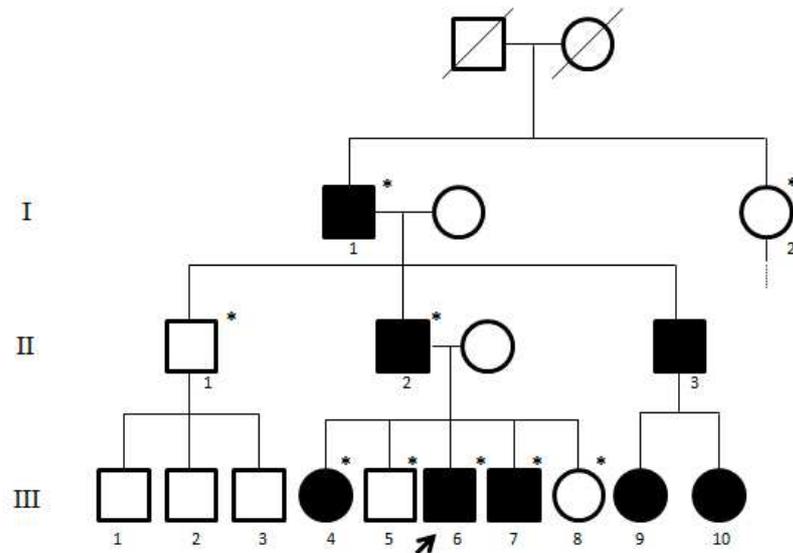


Figura 30. Pedigrí de la familia CV148. Los asteriscos indican los sujetos estudiados.

El análisis mediante MLPA resultó normal y la posterior secuenciación de *CCMI* reveló una delección de una única base en el exón 6, c.801delA (figura 31). Dicha mutación provoca una alteración del marco de lectura, llevando a la producción de una proteína truncada de 274 aminoácidos (p.Lys267AsnfsX8). Esto justificaría el diagnóstico molecular. La mutación resultó positiva en los 5 miembros afectados y negativa en 3 familiares asintomáticos (figura 30). El sujeto III-5 no ha desarrollado lesiones hasta la fecha.

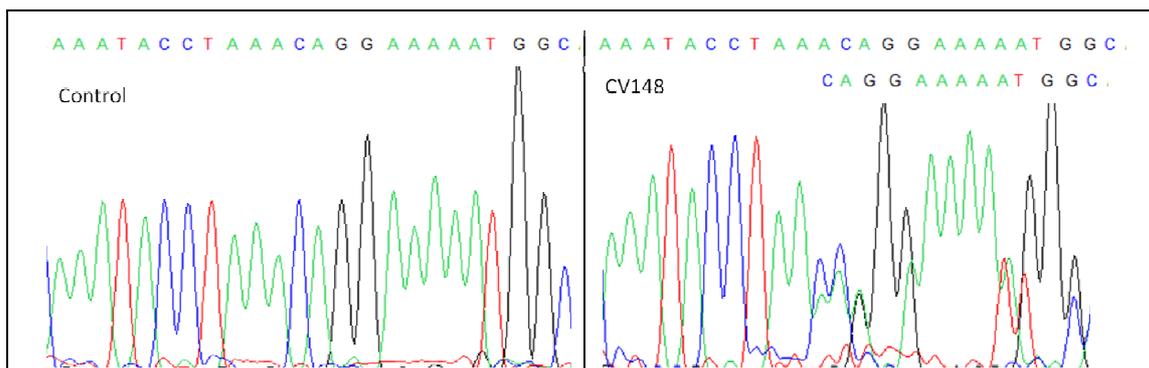


Figura 31. Secuenciación del exón 6 de *CCMI* (hebra sentido) del paciente índice CV148 III-6, en la que se muestra la delección de una A en la posición 801 del cDNA (NM_194455.1).

Sujeto	Clínica	RM	nº lesiones	c.801deIA
I-1		NR		+
I-2		NR		-
II-1		NR		-
II-2	No	-		+
II-3	Crisis parciales. Hemiparestesia	+		NR
III-1		-		NR
III-2		-		NR
III-3		-		NR
III-4	Episodios paroxísticos	+	1	+
III-5	No	-		+
III-6	Parestesia de miembros inferiores	+	17	+
III-7	Desvanecimiento	+	7-8	+
III-8		NR		-
III-9	Sí	+		NR
III-10	Hemorragia intracraneal	+		NR

Tabla 10. Resumen de los datos clínicos, radiográficos y genéticos recogidos de la familia CV148. NR: No realizado.

2.1.5. Mutación c.842A>G

La mutación c.842A>G fue localizada en una paciente de 70 años que presentó cavernomas a nivel supra e infratentorial en la imagen por MRI. La búsqueda en bases de datos resultó negativa para esta mutación, la cual no fue detectada en 200 cromosomas. Del estudio de ADN se dedujo que la mutación provoca un cambio de aminoácido en el residuo 281 de Krit1 (p.D281G). El análisis *in silico* realizado con PolyPhen-2 (score: 0,182) y SIFT (score: 0,08) mostró que esta mutación podría ser bien tolerada y, por tanto, no patogénica. Sin embargo, el estudio realizado en cDNA reveló la introducción de un sitio crítico de splicing en la posición 841 (exon 6) del cDNA (NM_194455.1). Esto provoca una modificación del marco de lectura introduciendo un triplete de terminación prematuro que conlleva la producción de una proteína truncada (p.Asp281GlyfsX5, figura 32). El análisis bioinformático del sitio crítico de splicing realizado con HSF mostró una mayor puntuación en el sitio de splicing mutante (72,21) que en el salvaje (66,21). De esta manera se justifica el diagnóstico molecular de cavernomatosis.

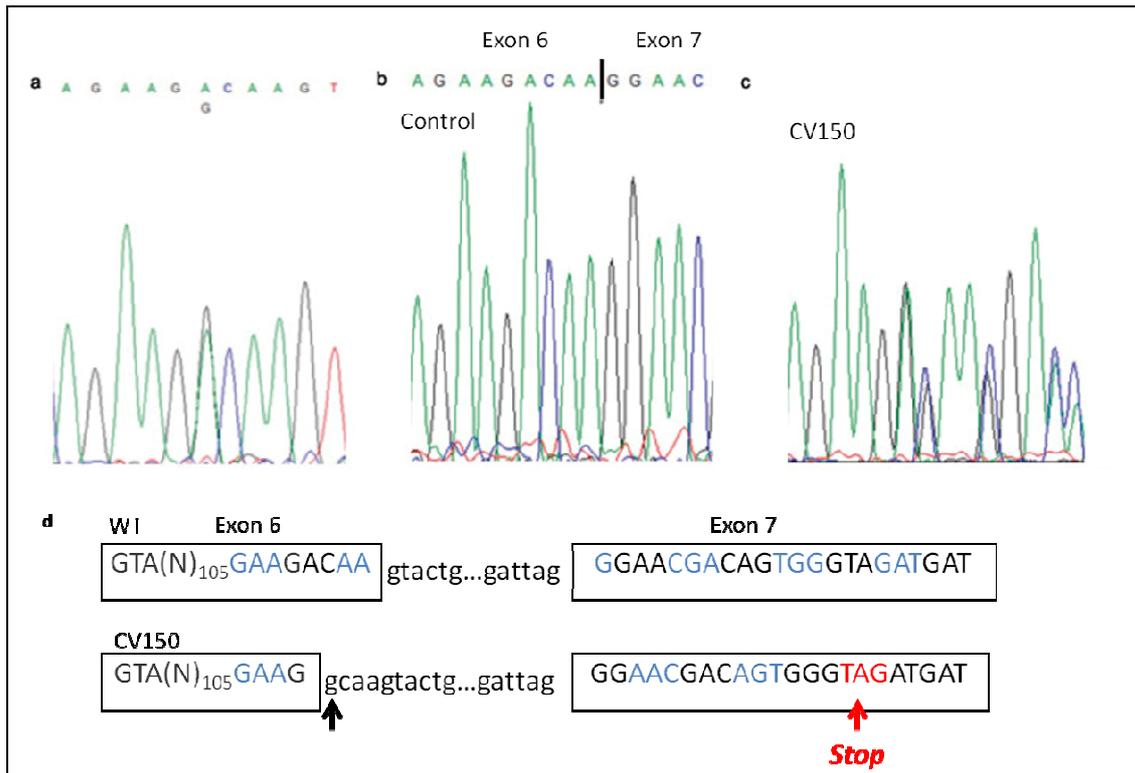


Figura 32. Análisis de la mutación en el paciente CV150. (a) Secuenciación del ADN del exón 6 de CCM1, en la que se muestra la transición A>G en la posición 842. (b) Secuenciación del cDNA de los exones 5 a 8 de un control sano y (c) del paciente CV150. Un nuevo sitio 5' de splicing se crea en el punto de la mutación. El nuevo splicing altera el marco de lectura del exón 7 generando un codón de parada prematuro (p.Asp281GlyfsX5). (d) El diagrama muestra el splicing críptico producido en el paciente. Los codones son mostrados de forma alterna en color azul y negro y el codón de parada en rojo. La flecha indica el nuevo sitio donador de splicing.

2.1.6. Mutación c.1114C>T

La mutación c.1114C>T fue localizada en el paciente índice CV160 con lesiones detectadas mediante MRI. El análisis de MLPA resultó normal. La secuenciación de ADN mostró la ambigüedad C>T en el exón 8 de *CCMI* (figura 33). Dicha mutación introduce un codón de parada prematuro, provocando una proteína truncada (p.Q372X). Por ello, esta mutación se considera patogénica, justificando el diagnóstico molecular de la enfermedad. Posteriormente, un familiar afecto mostró también dicha mutación.

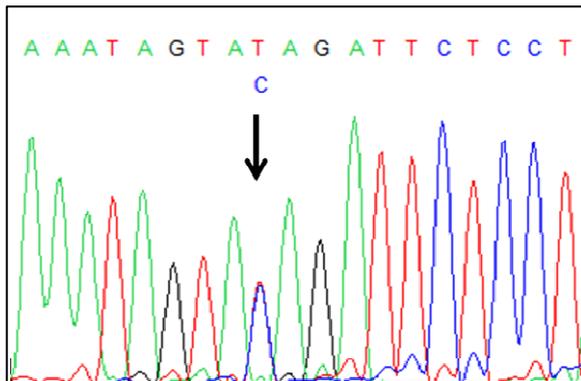


Figura 33. Secuenciación del exón 8 de CCM1 en el paciente CV160, donde se muestra la ambigüedad C>T en la posición 1114 del cDNA (NM_194455.1). La flecha indica el punto donde se produce la mutación.

2.1.7. Mutación c.1314-1325del

Se recibió una muestra de un paciente de 25 años de edad, el cual había presentado un cuadro de epilepsia, siendo éste el motivo de ingreso hospitalario. El estudio de MRI resultó positivo, donde se observaron múltiples lesiones.

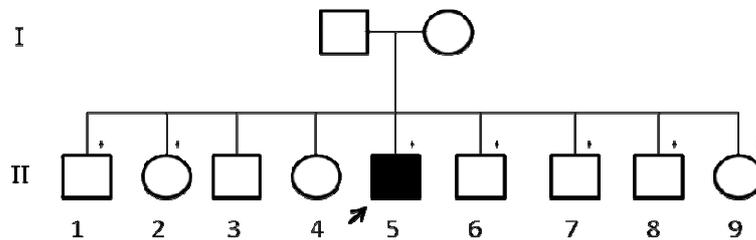


Figura 34. Pedigrí de la familia CV116. Los asteriscos indican los sujetos estudiados.

A nivel molecular, el análisis de MLPA fue normal. La secuenciación de ADN arrojó una delección de 11pb en el exón 10 de *CCM1* (figura 35). La consecuencia de esta mutación es la modificación del marco de lectura, que introduce un codón de parada prematuro y provoca la producción de una proteína truncada de 475 aminoácidos (p.Gly439HisfsX36).

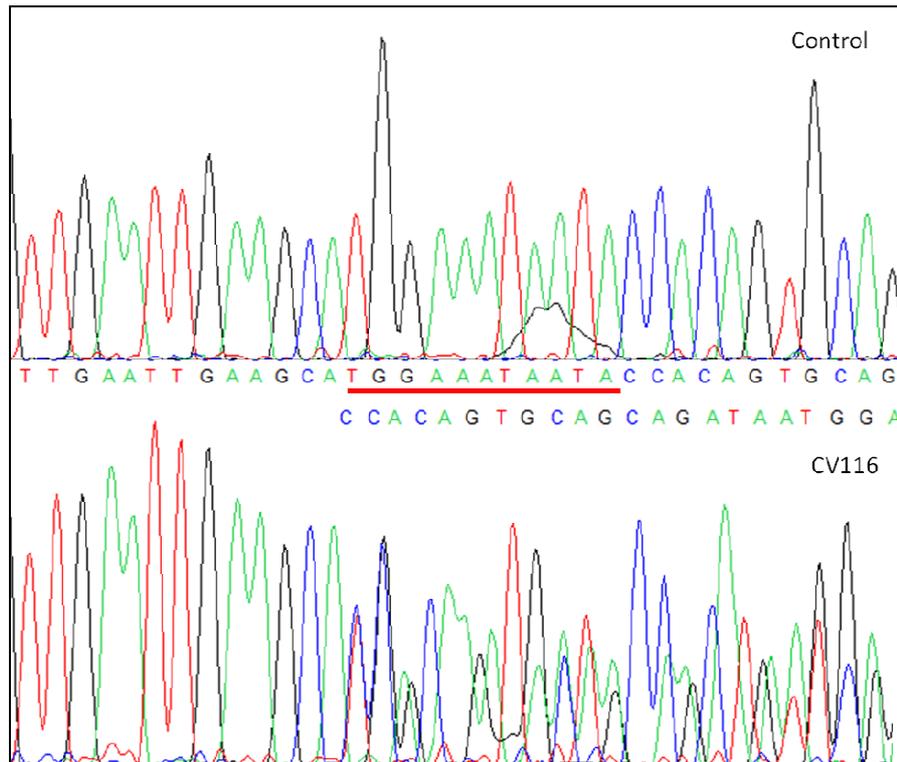


Figura 35. Secuenciación del exón 10 de *CCM1* de un control sano (arriba) y del paciente CV116 (abajo). El paciente CV116 porta una delección de 11pb, delimitada por la línea roja.

2.1.8. Mutación c.1775G>C

La mutación c. 1775G>C fue detectada en la secuenciación del exón 13 de *CCM1*, en un único paciente con MRI positiva. La búsqueda de esta mutación en bases de datos resultó negativa, con la excepción de la base de datos ESP (Exome Sequencing Project), donde está descrita en un sujeto de ascendencia europea (1 cromosoma frente a 8597) y clasificada como polimorfismo (rs372952135). Esta mutación da lugar a un cambio de aminoácido en el residuo 592 (p.S592T, treonina por serina), localizada en el dominio F2-FERM de Krit1. El análisis bioinformático realizado con PolyPhen-2 (score: 0,709; posiblemente dañina) y SIFT (score: 0,08; tolerada) mostró un resultado dispar. Por tanto, se decidió llevar a cabo un estudio en cDNA, donde se amplificó la región comprendida entre los exones 11 y 16 de *CCM1*. El producto de PCR fue analizado en gel de agarosa al 2% y se observaron dos bandas (figura 36). Tras el aislamiento y secuenciación de las mismas se visualizó que la banda de mayor tamaño extendía en 102 nucleótidos el exón 13 hacia el intrón 12. Para

comprobar si dicha inclusión se debía a la mutación c.1775G>C, amplificamos con un cebador situado en el intrón 12 (cebador K9F) y otro exónico localizado en el exón 14 (cebador KX10R). La amplificación resultó ser positiva tanto en controles como en otros pacientes (figura 36). La secuenciación de este último producto en el paciente CV166 mostró de nuevo la ambigüedad G/C. Por tanto, pudimos concluir que esta mutación no produce un splicing aberrante. Sin embargo, con los estudios realizados no podemos concretar su patogenicidad, siendo necesarios otros estudios.

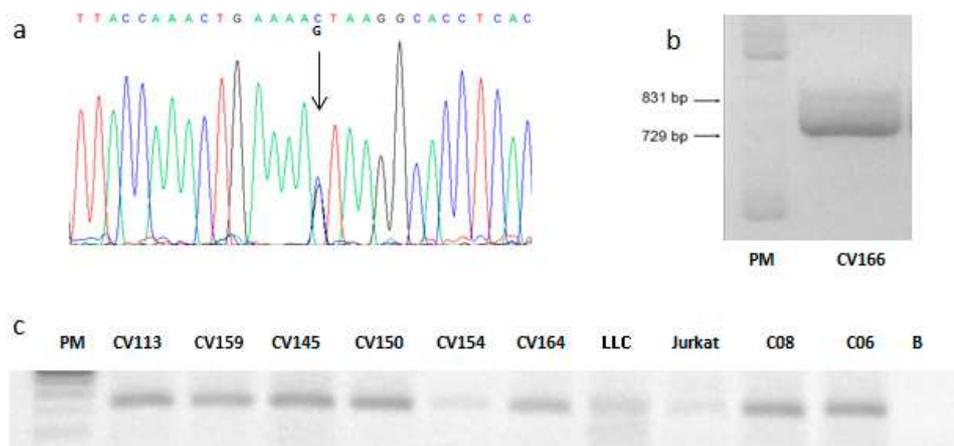


Figura 36. Análisis de la mutación c.1775G>C de *CCM1*. (a) Electroferograma del exón 13, mostrando la transición G>C. (b) Análisis del gel de agarosa de la amplificación del cDNA, exones 11 a 16, detectándose una banda de mayor tamaño y menor intensidad. (c) Amplificación del intrón 12-exón 14 en otros pacientes y sujetos sanos.

2.1.9. Delección de los exones 12 a 16

Esta delección fue hallada en la familia CV146. La paciente III1, de 33 años de edad, fue la primera en estudiarse y refirió dolores de cabeza y crisis epilépticas a los 27 años. En la imagen de MRI se observaron cuatro lesiones cavernomatosas. El análisis de MLPA reveló una delección de los últimos cinco exones codificantes (figura 37). El cDNA no estuvo disponible para la comprobación de la delección.

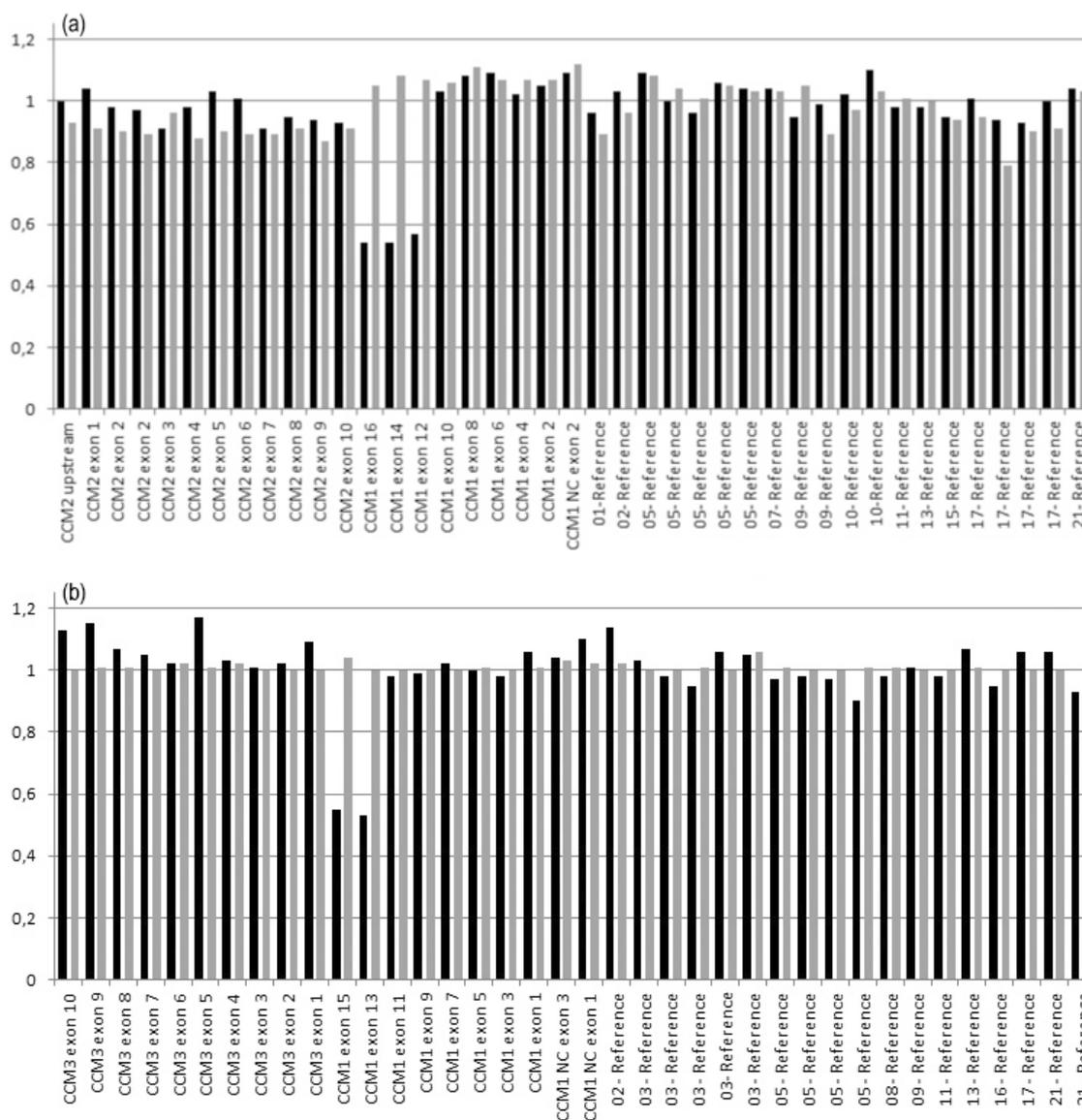


Figura 37. Análisis cuantitativo de MLPA de las mezclas de sondas (a) P130 y (b) P131. Las columnas negras representan el paciente CV146 III y las columnas grises representan un sujeto sano. La delección de los exones 12 a 16 se muestra como la disminución del 50% aproximadamente en la intensidad de los fragmentos respecto al sujeto sano.

Tras el resultado positivo en la paciente, se decidió estudiar al padre y al hermano, debido a que refieren también dolores de cabeza. La imagen por MRI mostró dos lesiones en el padre y ninguna en el hermano. El estudio molecular arrojó un resultado positivo solamente en el padre. Por otro lado, la MRI mostró imágenes compatibles con anomalías del desarrollo venoso en el hermano, pero no en los miembros afectados de CCM.

2.2. Mutaciones en *CCM2*

El análisis mediante MLPA y secuenciación del gen *CCM2* identificó 7 mutaciones (figura 38), dos de ellas no descritas previamente en la literatura. A continuación se detallan las mutaciones más relevantes.

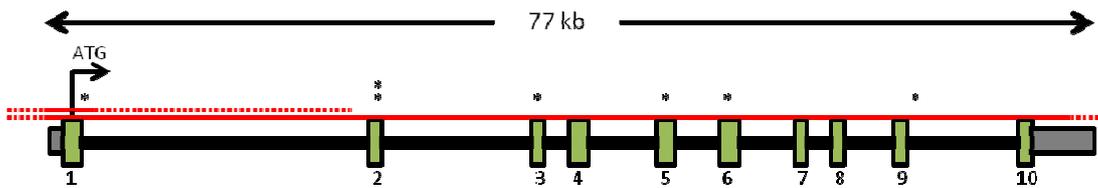


Figura 38. Mutaciones localizadas en *CCM2*. Las líneas rojas indican la región deleccionada y los asteriscos la localización de las mutaciones.

2.2.1. Mutación c.30+1G>A

Esta mutación fue detectada en una niña de 9 años, presentando una crisis epiléptica como motivo de ingreso hospitalario. En la MRI realizada se visualizaron múltiples lesiones cavernomatosas. El estudio familiar radiográfico mostró lesiones en cuatro miembros más, siendo dos de ellos asintomáticos (figura 39).

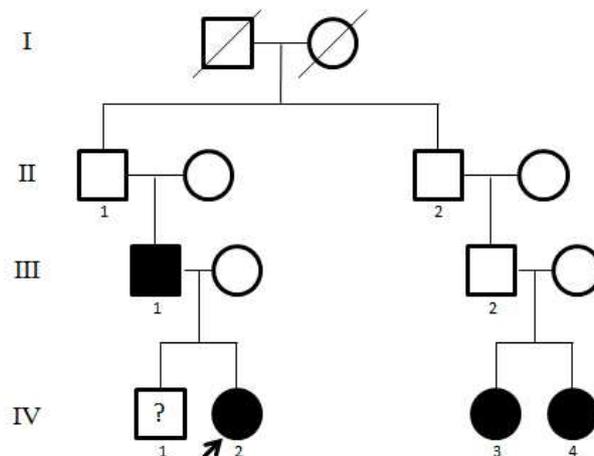


Figura 39. Pedigrí de la familia CV168. En negro se indican los sujetos con RMN positiva.

Sujeto	Clínica	RM	nº lesiones
III-1	No	Si	1
III-2	No	NR	
IV-1	No	Dudoso	2
IV-2	Si	Si	Múltiples
IV-3	Si	Si	Múltiples
IV-4	No	Si	

Tabla 11. Resumen de los datos clínicos, radiográficos y genéticos recogidos de la familia CV168. NR: No realizado.

El estudio molecular detectó una mutación localizada en la región de splicing invariante del primer exon de *CCM2*, c.30+1G>A (figura 40), descrita previamente por Verlaan y colaboradores (Verlaan *et al.* 2004). Sin embargo, en dicho artículo no se realizó estudio en cDNA. Las mutaciones en estas regiones invariantes suelen ser patogénicas, debido a que alteran el splicing provocando una alteración del marco de lectura debido a la pérdida del sitio donador de splicing. El análisis *in silico* realizado con HSF y MaxEnt mostró una pérdida del 28,04% y 85,21%, respectivamente, en las puntuaciones del sitio donador de splicing, sin arrojar un sitio alternativo o críptico de splicing. Por ello, llevamos a cabo un análisis en cDNA amplificando la región comprendida entre el exón 1 (cebador CV21F) y exón 2 (cebador CX2R), observando únicamente el transcrito salvaje. Estos resultados nos sugieren que el cromosoma afecto no transcribe el mensajero completo.

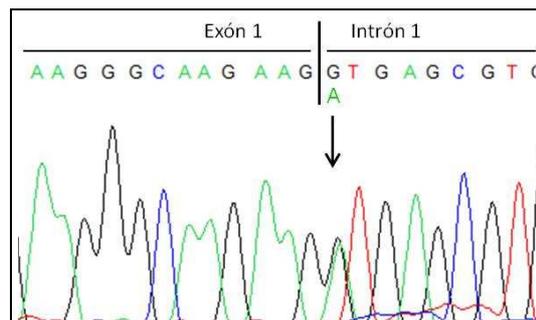


Figura 40. Electroferograma del exón 1 de *CCM2* de la paciente CV168, en el que se observa la mutación G>A en la posición +1 de la región invariante de splicing.

2.2.2. Mutación c.222G>A

La mutación fue detectada en un paciente de 34 años (CV145), cuya madre falleció a causa de un accidente cerebrovascular. Esta mutación se localizó en el exón 3 (figura 41), sin dar lugar a un cambio de aminoácido. En la base de datos ESP encontramos esta transición silente en un sujeto afroamericano, con una frecuencia del alelo menor de 0,027%. Se decidió estudiar el cDNA para valorar la producción de un splicing críptico. Para ello, se amplificó la región comprendida entre el exón 1 (cebador CX1F) y exón 4 (cebador CX4R). Sin embargo, no se observó ningún splicing aberrante, mostrando ambos alelos en la secuenciación. Por tanto, concluimos que esta transición silente puede considerarse como no patogénica.

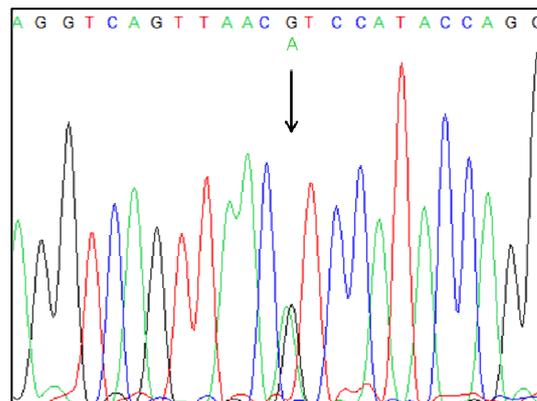


Figura 41. Análisis de la mutación c.222G>A. Se muestra el electroferograma del exón 3 de *CCM2*, tanto en ADN como en cDNA.

2.2.3. Mutación c.713C>A

Se recibió una muestra de un paciente (CV114) en que se habían detectado múltiples cavernomas. Las lesiones fueron localizadas en pedúnculo cerebeloso con sangrado, en localización supratentorial, infratentorial y en medula espinal. Además, el paciente refirió que su madre falleció debido a una hemorragia cerebral a los 33 años.

Se procedió al estudio molecular de los genes *CCM*, detectándose en el exón 6 una mutación, c.713C>A (figura 42), que produce el cambio de una serina por una tirosina en el residuo 238, p.S238Y. Aunque el cDNA no estuvo disponible para el estudio de splicing

crítico, el análisis bioinformático sugirió que esta mutación podría ser patogénica (Puntuación PolyPhen-2: 0,993; puntuación SIFT: 0,03). Por otro lado, el estudio realizado por Kim y colaboradores (Kim *et al.* 2011) informa de múltiples sitios de fosforilación en la proteína CCM2, siendo la serina 238 uno de estos sitios. Por ello, la mutación p.S238Y podría afectar a la función de CCM2. A falta de estudios más profundos, etiquetamos dicha mutación como posiblemente patogénica.

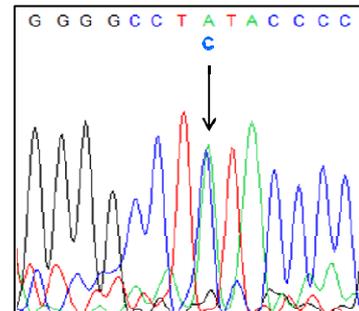


Figura 42. Análisis de la mutación c.713C>A. Se muestra el electroferograma correspondiente al exón 6 de *CCM2* en el paciente CV114.

2.3. Mutaciones en *CCM3*

El análisis mediante MLPA y secuenciación del gen *CCM3* identificó 4 mutaciones (figura 43), tres de ellas nuevas. A continuación se describen las mutaciones más relevantes.

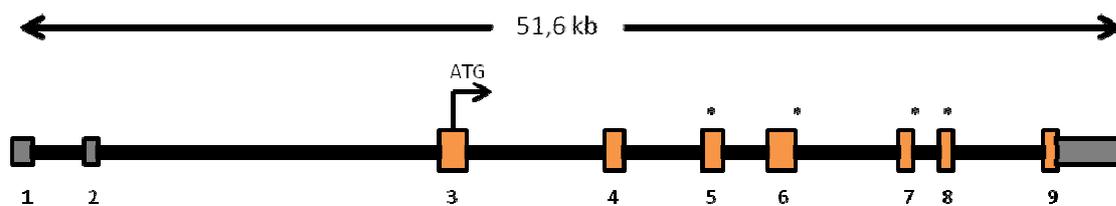


Figura 43. Mutaciones localizadas en *CCM3* (NM_007217.3). Los asteriscos indica la localización de las mutaciones.

2.3.1. Mutación c.211delA

Esta mutación fue detectada en un paciente (CV139) que ingresó por un síndrome vertiginoso con características periféricas y síndrome constitucional que fue orientado en un

principio como secundario a metástasis cerebrales. La historia familiar recoge presencia de neoplasias en varios miembros de su familia y un accidente cerebro-vascular en el padre. Es por ello que se realizó un despistaje tumoral exhaustivo. Es en la imagen por MIR donde se sugieren múltiples lesiones cavernomatosas. A nivel molecular, el análisis por MLPA resultó negativo, al igual que la secuenciación de *CCM1* y *CCM2*. Sin embargo, en el exón 5 de *CCM3* se localizó una delección de una adenosina en la posición 211 (figura 44) del cDNA (NM_007217). La consecuencia de esta mutación es el desplazamiento del marco de lectura introduciendo un codón de parada prematura y provocando la producción de una proteína truncada de 88 aminoácidos (p.Ser71AlafsX18).

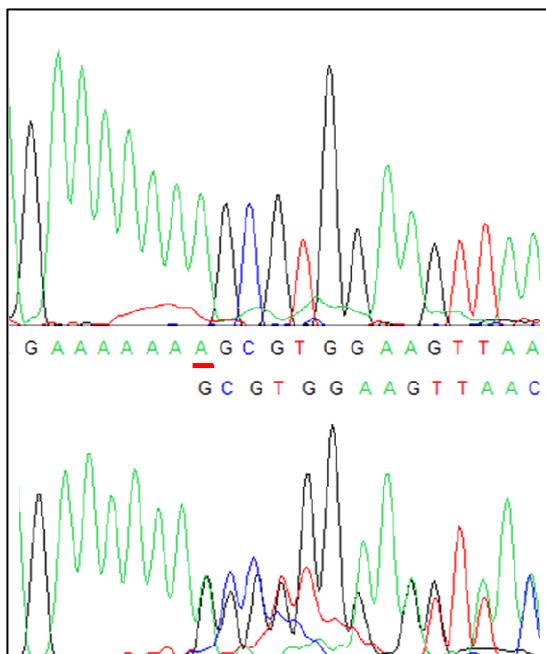


Figura 44. Análisis de la mutación c.211delA. Se muestra el electroferograma del exón 5 de *CCM3* en el paciente CV139.

2.3.2. Mutación c.395+1G>C

En este caso se recibió una muestra de un paciente de 34 años (CV127). El análisis mediante MLPA y la secuenciación de los genes *CCM1* y *CCM2* resultó normal. La secuenciación de *CCM3* reveló una mutación en la región 5' invariante de splicing del intrón 6 (figura 45). El análisis bioinformático realizado con HSF y MaxEnt nos informa de una pérdida de 30,76% y 110,58%, respectivamente, del sitio donador de splicing. A falta de estudios en cDNA, podríamos sugerir que la consecuencia de esta mutación es el salto del

RESULTADOS

exón 6, produciendo una modificación del marco de lectura e introduciendo un codón de parada prematuro. Esto provocaría la producción de una proteína truncada de 92 aminoácidos (p.Glu90GlyfsX3).

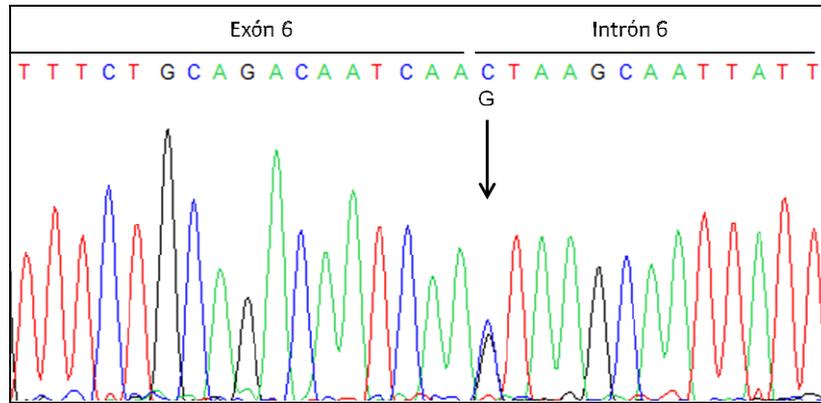


Figura 45. Electroferograma del exón 6 de *CCM3* (NM_007217). El paciente CV127 muestra una ambigüedad G>C en la posición +1 de la región invariante de splicing.

2.3.3. Mutación c.474+5G>A

Se recibió una muestra de un paciente (CV164) diagnosticado de cavernomatosis sin antecedentes familiares. La historia familiar recoge cefaleas y mareos en los últimos 15 años, pérdidas de conocimiento con posible ataque epiléptico y MRI dudosa por parte del padre. Los otros miembros de la familia permanecen asintomáticos y con MRI negativa (figura 46).

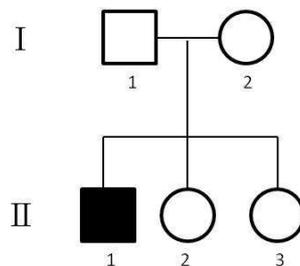


Figura 46. Pedigrí de la familia CV164. Todos los miembros fueron estudiados

El análisis genético fue realizado, detectándose mediante secuenciación una mutación en el intrón 7 de *CCM3* (c.474+5G>A; figura 47). Tal y como describe Liquori et al (Liquori *et al.* 2006), esta mutación afecta al splicing de *CCM3* provocando el salto del exón 7 del transcrito completo. Esto conlleva la modificación del marco de lectura con la introducción de un codón de parada prematuro (p.Asp133HisfsX10) y produciendo una proteína truncada de 142 aminoácidos. Esto justifica el diagnóstico molecular de la enfermedad. Por otro lado, el estudio familiar de esta mutación resultó negativo para los padres y hermanas. La paternidad del paciente fue asegurada desde la consulta de genética del hospital peticionario. Desde nuestro laboratorio, la realización de un análisis de microsatélites confirmó dicha paternidad (datos no mostrados). Por ello, nos encontramos ante una mutación *de novo*.

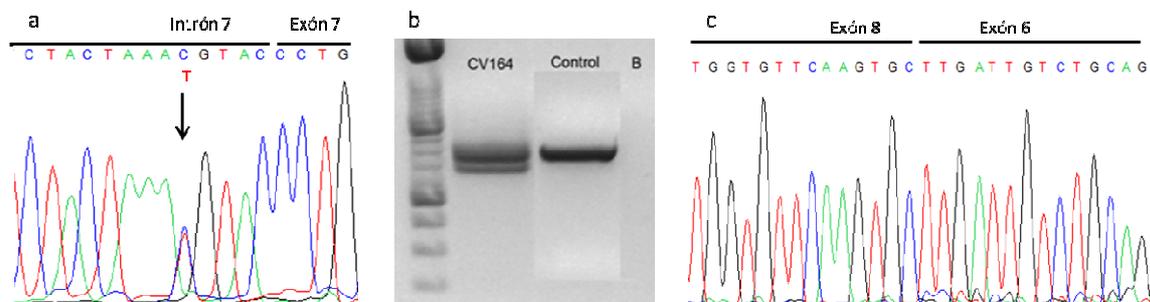


Figura 47. Análisis de la mutación c.474+5G>A en *CCM3* (NM_007217). a) Electroferograma de la amplificación en ADN del exón 7. b) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación de los exones 4 a 9 del cDNA en el paciente CV164 y en un control sano. c) Electroferograma de la banda de menor tamaño observada en el paciente CV164, mostrando la eliminación del exón 7 en cDNA.

2.3.4. Mutación c.538dupA

Paciente de 49 años (CV126) afecta de cavernomatosis cerebral sin antecedentes familiares que debuta a los 41 años con crisis comicial. La paciente presentó en RMN múltiples lesiones intraparenquimatosas en ambos hemisferios cerebrales de localización preferentemente profunda, de tamaño heterogéneo y con señal irregular compatible con presencia de calcificaciones y restos de hemosiderina. En la región adyacente al ventrículo lateral izquierdo y núcleo caudado se observó una pequeño área de sangrado reciente.

RESULTADOS

A nivel molecular, la paciente presentó una duplicación de una adenina en la posición 538 del cDNA (NM_007217) (figura 48). Esto provoca la modificación del marco de lectura que introduce un codón de parada prematuro y predice una proteína truncada de 182 aminoácidos (p. 180fs183X).

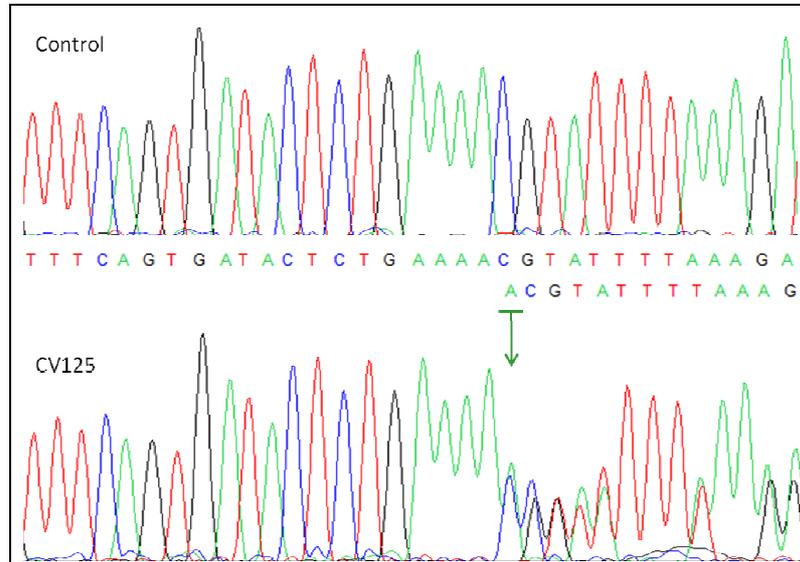


Figura 48. Análisis de la mutación c.538dupA. Se puede observar la duplicación de una adenina en la posición 538 de CCM3 (NM_007217). Arriba, control sano; abajo, paciente CV125.

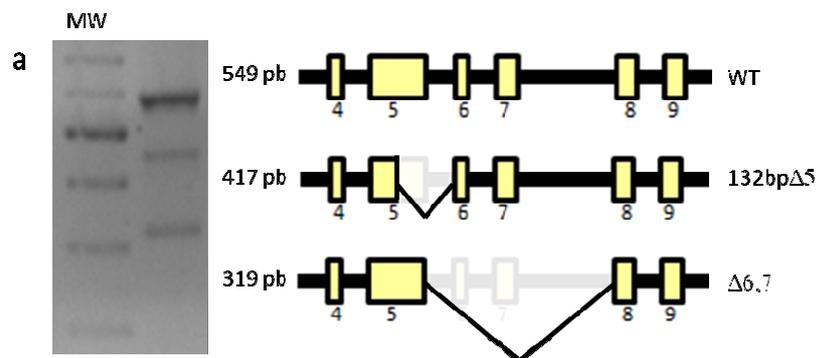
2.4. Estudio de variantes alélicas

El estudio mediante secuenciación de los tres genes relacionados con la cavernomatosis detectó además varios polimorfismos (tabla 12). En este punto nos planteamos la posibilidad de que algunos polimorfismos pudieran tener alguna influencia en el correcto splicing de los mensajeros. Por ello, comenzamos realizando un estudio en *CCM1* de los anteriores polimorfismos.

Gen	Variante	SNP	MAF	Tipo de mutación
CCM1	c.989+63C>G	rs2027950	0,489 (G)	Intrónica
CCM1	c.1980A>G	rs11542682	0,063 (G)	Transición
CCM2	c.205-36A>G	rs2304689	0,22 (G)	Intrónica
CCM2	c.157G>A	rs2107732	0,085 (A)	Missense (p.V53I)
CCM2	c.358G>A	rs11552377	0,133 (A)	Missense (p.V120I)
CCM2	c.905G>A	rs2289367	0,214 (A)	Transición
CCM2	c.1054+12C>T	rs190686229	0,002 (T)	Intrónica
CCM3	c.268+53C>T	rs200180968	0,006 (T)	Intrónica

Tabla 12. Polimorfismos encontrados en la población española. MAF: Frecuencia del alelo menor.

En el gen *CCM1* nos encontramos con dos polimorfismos, localizamos en el intrón 7 y en el exón 14. Para el estudio del primer caso, c.989+63C>G, se llevó a cabo una amplificación en cDNA de los exones 5 a 8. La electroforesis en gel de agarosa reveló 3 bandas. La banda de mayor tamaño e intensidad, correspondió al mensajero salvaje. La secuenciación de las bandas de menor tamaño reveló dos splicings en la que se producen una eliminación parcial del exón 5 (132bp menos en región 3' del exón 5, 132bpΔ5) y una eliminación de los exones 6 y 7 (Δ6,7), respectivamente (figura 49). Para el splicing 132bpΔ5 procedimos a realizar un análisis del sitio alternativo 5' de splicing con HSF y MaxEnt, dando como resultado una puntuación de 92,64 y 7,41. En el caso del exón 5 las puntuaciones fueron de 92,81 y 9,84, para el sitio de splicing salvaje.



RESULTADOS

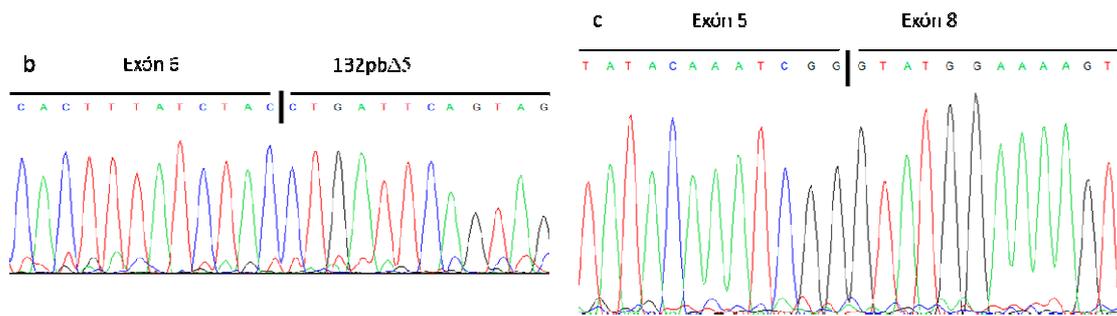


Figura 49. a) Análisis de los exones 5 a 8 en gel de agarosa y representación gráfica de los splicing observados. Secuenciación de los splicing b) 132bp Δ 5 (reverse) y c) Δ 6,7.

Para estudiar el polimorfismo c.1980A>G, amplificamos los exones 11 a 16. En este caso, el análisis en el gel de agarosa mostró una banda intensa, correspondiente al mensajero salvaje, y otra de menor tamaño e intensidad, casi imperceptible. La secuenciación de esta segunda banda mostró un splicing entre el exón 11 y 15, en el que se eliminaron los exones 12, 13 y 14 (Δ 12-14; figura 50) Además, pudimos cuantificar este nuevo splicing llevando a cabo un análisis mediante RT-qPCR en controles sanos. En él, determinamos que el splicing Δ 12-14 se transcribe en un 0,01% respecto a los exones 1-2 (figura 50).

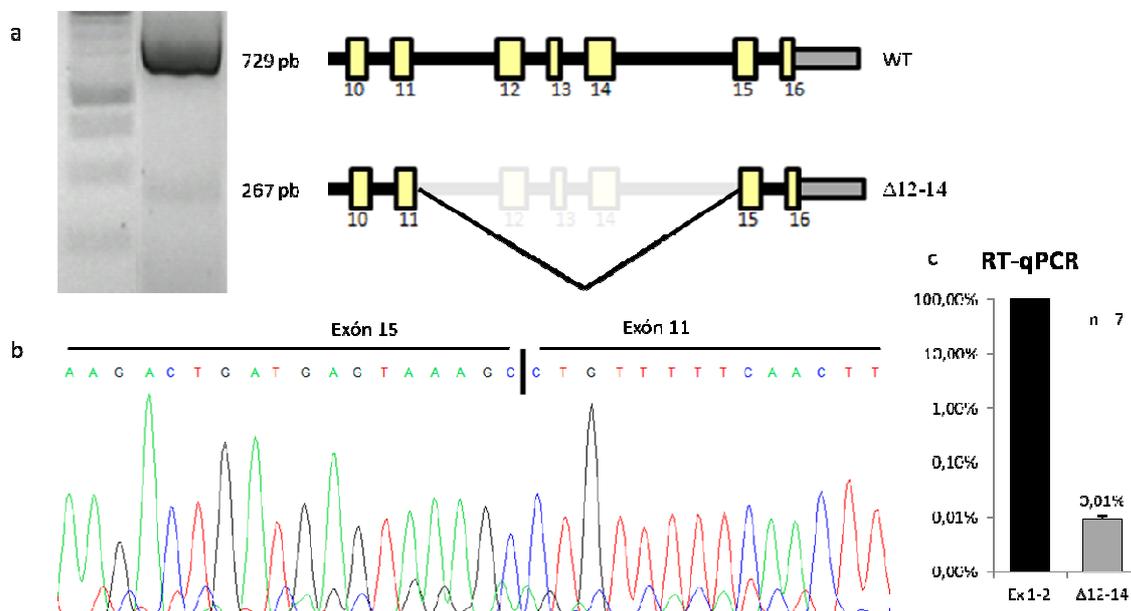


Figura 50. a) Análisis de los exones 11 a 16 en gel de agarosa y representación gráfica del splicing observado. b) Electroferograma de la banda de menor tamaño correspondiente al splicing Δ 12-14. c) Determinación del nivel de transcripción del splicing Δ 12-14 relativo a los exones 1-2.

Las bandas correspondientes a los splicing fueron observadas tanto en pacientes como en controles, con todos los genotipos. En el gen *CCMI*, algunos de estos splicing han sido observados previamente en un trabajo presentado por Kehrer-Sawatzki et al (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2002), tanto en linfocitos de sangre periférica como en fibroblastos de sujetos sanos. Nosotros, al igual que otros autores, observamos splicings en los que se producen saltos de exones completos (uno o varios) y splicings en los que hay un uso de un sitio alternativo de splicing dentro de un exón. Considerando un mismo marco de lectura inicial, los tres splicings observados modifican dicho marco de lectura provocando la introducción de un codón de parada prematuro. Por ello, son considerados en un principio como transcritos aberrantes. Decidimos amplificar las regiones comprendida entre los exones 1 a 8 y exones 5 a 12 (figura 51). El análisis en gel de agarosa y posterior secuenciación de las bandas mostró que los splicing 132bp Δ 5 y Δ 6,7 estaban presentes en la amplificación de los exones 5-12, pero no en los exones 1 a 8. Esto nos sugirió la posibilidad de la existencia de diferentes orígenes de transcripción en el gen *CCMI*.

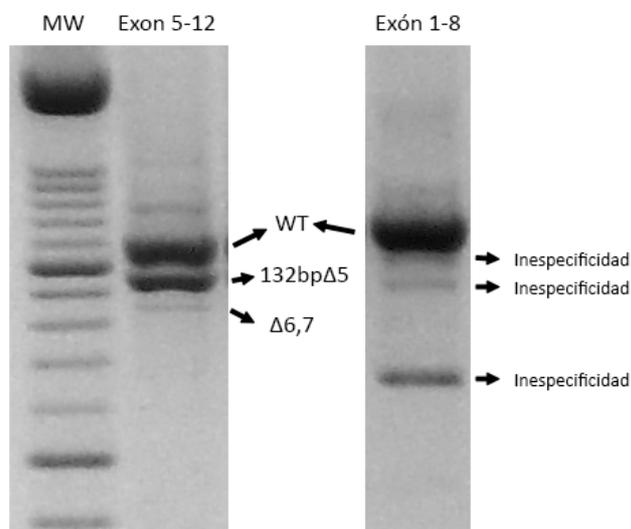


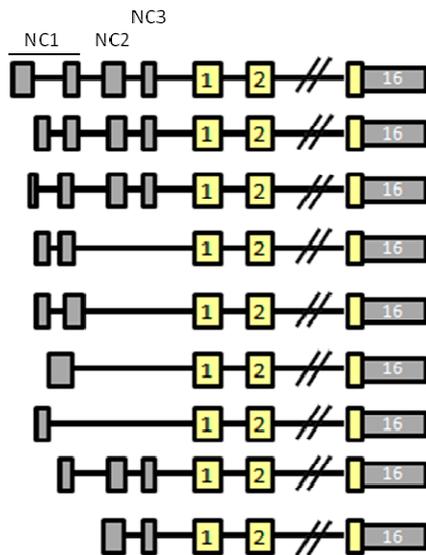
Figura 51. Análisis en gel de agarosa de la amplificación de los exones 5 a 12, izquierda, y 1 a 8, derecha.

3. Diversidad transcripcional en el gen *CCMI*

Como hemos comentado en el apartado anterior, nos planteamos la posibilidad de inicios de transcripción (TSS) alternativos. Para la determinación de estos TSS, la técnica elegida por su fácil aplicabilidad en nuestro laboratorio fue la determinación rápida de terminaciones del cDNA (RACE; apartado 5.2 de Material y métodos). Se utilizaron para ello, cuatro muestras: dos controles sanos, la línea celular Jurkat T y linfocitos en su mayoría B de un paciente con LLC. En todos los casos la retrotranscripción se realizó con el cebador específico KX12R (GSP1), localizado en el exón 16 de *CCMI*.

3.1. Región 5' no codificante

La región 5' no codificante (5'UTR) ha sido estudiada por varios autores (Eerola *et al.* 2001; Sahoo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000). En esta Tesis, hemos querido estudiar esta región en primer lugar con la finalidad de asegurar la replicabilidad y precisión de la metodología utilizada. Para ello, la primera amplificación fue realizada con el cebador KX8R (GSP2). Tras la dilución 1:10 del producto amplificado, se realizaron dos PCR secundarias, con los cebadores (GSP3) localizados en el exón 2 (KXBR) y exón 2 no codificante (KXYR). Las secuencias en la que se observó la adición de la cola de poliA fueron analizadas y alineadas con las herramientas BLAT y BLAST, anotando la posición anterior a la adición de la cola de poliA (tabla 13). En la figura 52 se muestra una representación de los inicios detectados. Además de los diferentes TSS, y al igual que otros autores, observamos una compleja distribución de splicing en esta región, donde al menos ocho variantes de splicing fueron detectadas.



Posición de TSS en el cromosoma 7. GRCg37/hg19	Región CCM1
91875414, 91875245, 91875227, 91875218, 91875217, 91875196, 91875172, 91875121, 91875120, 91875041	Exon NC1
91874487	Exon NC2

Tabla 13. Posiciones de sitios de inicio de la transcripción observados.

Figura 52. Representación gráfica de los sitios de inicio de transcripción detectados mediante 5'RACE en la región 5' no codificante.

Tras la observación de estas variantes de splicing se diseñaron cebadores específicos para su cuantificación relativa (tabla 5, apartado 5.3, Material y métodos). Además, se aislaron los fragmentos correspondientes a cada splicing, comprobando su pureza mediante secuenciación y determinando el grado de amplificación cruzada mediante RT-qPCR (tabla 14). De esta manera, aseguramos la especificidad de cada reacción. En todos los casos, el nivel de expresión fue relativizado frente a la expresión de los exones 1-2, cogiendo el gen *HPRT1* como gen de referencia para la normalización.

Cebadores Fragmentos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Sp1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sp2	0,00%	100,00%	0,02%	2,04%	0,00%	0,07%	0,00%	0,18%
Sp3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sp4	0,00%	20,69%	0,00%	100,00%	0,02%	1,11%	0,01%	0,00%
Sp5	0,00%	0,59%	0,05%	7,08%	100,00%	54,48%	0,00%	0,00%
Sp6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sp7	0,00%	0,04%	0,00%	1,03%	0,27%	0,16%	100,00%	0,00%
Sp8	0,00%	0,01%	0,00%	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	100,00%

Tabla 14. Pruebas de amplificación cruzada de los cebadores usados. NR: No realizado.

El análisis de RT-qPCR incluyó un total de 7 controles sanos y la línea celular Jurkat T (dos cultivos independientes). Los resultados mostraron una expresión variable de las variantes de splicing, tanto en controles sanos como en Jurkat T (figura 53). En ambos casos, los niveles de transcripción de las ocho variantes 5'UTR de splicing estudiadas suman el 54,9% relativo al nivel de los exones 1-2. De las variantes estudiadas, observamos que Spl4 es la variante mayoritaria (46,18%) en sujetos sanos, mientras que en el caso de Jurkat, la expresión parece estar repartida entre las variantes Spl4 (26,73%) y Spl8 (24,93%). El resto de isoformas son transcritas en menor medida, entre 60 y 350 veces para Spl2, Spl5, Spl6 y Spl7, y más de 1000 veces para Spl1 y Spl3.

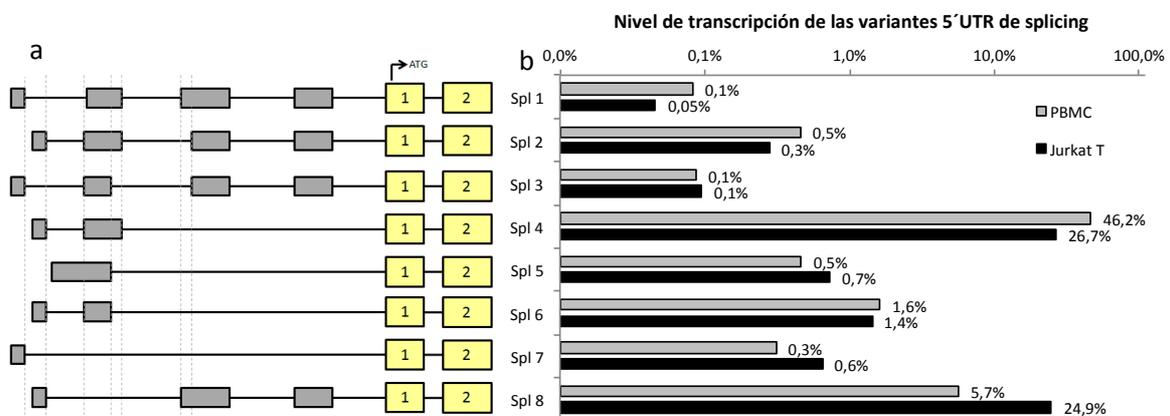


Figura 53. Cuantificación relativa de las variantes 5'UTR de splicing. **a)** Representación gráfica de las variantes de splicing Spl1 a Spl8. Las líneas verticales discontinuas muestran los diversos sitios de splicing en esta región. **b)** Nivel de transcripción de cada variante de splicing relativo a los exones 1-2. Las barras de color gris representan PBMC de controles sanos y las barras negras representan células Jurkat T.

3.2. Región codificante

Una vez estudiada la región no codificante de *CCM1*, proseguimos con la región codificante. Para ello, aplicamos la misma metodología descrita en el apartado anterior. En este caso, el cebador GSP2 se localizó en el exón 16 (cebador K12R) y el cebador GSP3 en los exones 14 (cebador KX10R), 12 (cebador KX8R), 8 (cebador K4SR), 5 (cebador KX1R) y 3 (cebador KXCR). El análisis en gel de agarosa y la posterior secuenciación de las bandas reveló distintos TSS en esta región codificante (figura 54 y tabla 15). Para comprobar si estos TSS son activos, analizamos el nivel de transcripción de una región codificante

interna, en concreto los exones 11-12. Esta región mostró un mayor nivel de transcripción comparado con los exones 1-2, siendo más de tres veces en PBMC y más de seis veces en células Jurkat T (figura 55).

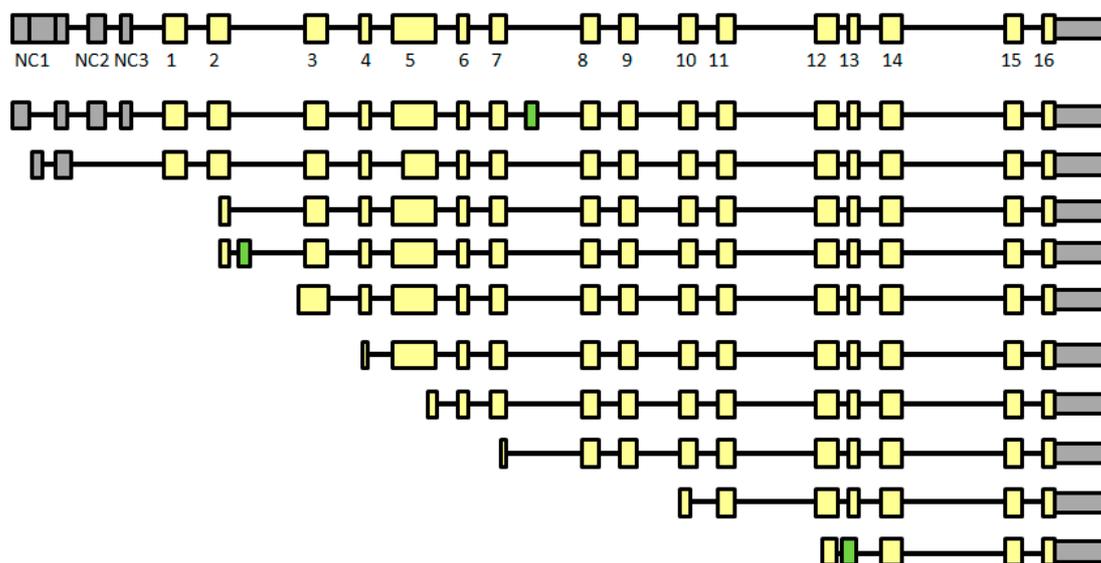


Figura 54. Representación gráfica de los sitios de inicio de transcripción detectados mediante 5'RACE en la región codificante de *CCM1*. Los cuadros grises y amarillos representan exones no codificantes y codificantes, respectivamente. Los cuadros verdes representan nuevos exones detectados.

Posición de TSS en el cromosoma 7. GRCg37/hg19	Región <i>CCM1</i>
91870340, 91870339	Exon 2
91867242	Intron 2
91865877, 91865827	Exon 4
91864767	Exon 5
91863793	Exon 7
91852233	Exon 10
91844045	Exon 12

Tabla 15. Posiciones de sitios de inicio de la transcripción observados en la región codificante de *CCM1*.

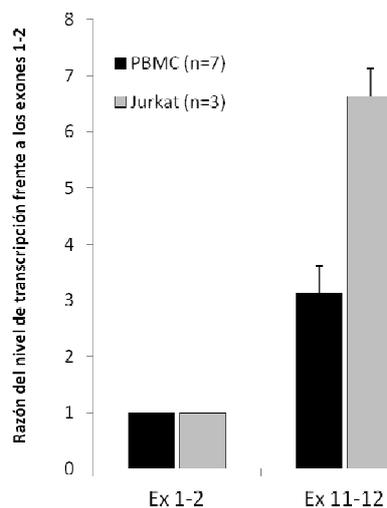


Figura 55. Razón del nivel de transcripción de la región codificante interna (exones 11-12) relativo a la los primeros exones codificantes de *CCM1* (exones 1-2).

Con el análisis 5'RACE no sólo detectamos sitios de inicio de transcripción alternativos, sino también nuevos exones. Estos nuevos exones se localizaron en los intrones 2 y 7, denominados como exon 2a (110 nucleótidos; posición en el cromosoma 7: 91870172-91870063) y exón 7a (101 nucleótidos; posición en el cromosoma 7: 91862256-91862356). Además, detectamos un alargamiento del exón 13 debido a la elección de un sitio 3' de splicing diferente. A este exón alargado lo hemos denominado como exón 13L y expande en 102 bases el exón 13 (figura 56). Para comprobar la veracidad de estos nuevos exones analizamos las regiones de splicing mediante las herramientas HSF y MaxEnt (tabla 16), observando sitios de splicing consenso AG/GT.

Exón 2a

TAAAAATATACACATATTTAAACCAATTTCTTTTATGTTTCCTTTACATTTAACAACTTG
 CAAAAAACTCAAG**TGTTTTTTAAGGTACACCCAAGCCCCTTCAAGATGTAACCTTGACAA**
ATTTTTTAAAAGTTGAGAAGTATTTAAAGAATTCACAATGTTGATGTGAAGTGTAGTTCC
CTAGGTAAGTATCTTTTAACTACTATTTCCTATTTCTTTACTTAAATGACAGAGGAACTAT

Exón 7a

ATGCTCTTATATTTCTTATTACATGGAATTTTTGTATTAAGAGTTACTCTAATTGTCTTT
 AACTGAGTTAATAGTTGTTTCTTTAG**ATTACCAGAAAATACTGGCGGCAAAAACAATACT**
AAAAGAAATCACATGCAGCCGGGTGCAGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA
GGCCAAGGTGGCGGATCACGAGGTCAGGAGGTTGAGACCATCCTGGCTAACACCATGAA

Exón 13L/13

TTAGAGTTCTCTGATATTTTACAGCAAAAATATTTTTCAG**GTTAAAAATTACGTTACTGAA**
AGCCATTTGTAACAGAATGATTACTATACTTTAGCTACTAAAGATGATTTATTTAAAGGA
TGTTGGCATGTGTGCTTACAGTGAAGAAAATCTAAAATCCATCGTACCTGTTACCAAAC**T**
GAAAAGTAAGGCACCTCACTGGACAAAATCGCATACTTCATGAATACAAGGTAAGCTGTTT

Figura 56. Nuevos exones localizados en. En negrita y resaltado en amarillo se representan las secuencias de los nuevos exones 2a y 7a. En el caso del exón 13L, en amarillo se representa la secuencia alargada y, sin resalte y negrita, la secuencia correspondiente al exón 13.

Exón	Sitio 3' de splicing			Sitio 5' de splicing		
	Secuencia	HSF	MaxEnt	Secuencia	HSF	MaxEnt
2a	aaaaaactcaagTG	66.86	2,37	TAGgtaagt	98.02	9,66
7a	ttgttctttagAT	84.42	3,93	AAGgtgggc	87.37	7,93
13L	aatattttcagGT	87.17	5,34	AAGgtaagc	96.87	10,22
13	gtgtgcttacagTG	85,12	5,05	AAGgtaagc	96.87	10,22

Tabla 16. Análisis de los sitios de splicing de los nuevos exones.

La amplificación mediante PCR convencional, utilizando cebadores específicos localizados en los nuevos exones, resultó positiva en controles y en pacientes (figura 47). Debido a que se observó una intensidad de señal variable, se decidió analizar el nivel de transcripción mediante RT-qPCR. Una vez más, comparamos dicho nivel con el de los exones 1-2 (figura 58). Con esta técnica pudimos determinar que en controles sanos y en células Jurkat el nivel de transcripción fue de: 0,1% y 0,3%; 0,6% y 1,2%; 20,0% y 35,4%, para los exones 2a, 7a y 13L, respectivamente. Por otro lado, el análisis genómico comparativo de los exones 2a y 7a mostró una conservación selectiva en primates (figura 59).

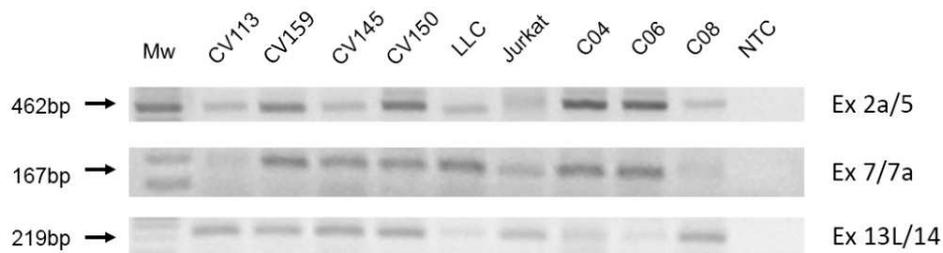


Figura 57. Amplificación mediante PCR convencional de los exones 2a, 7a y 13L en pacientes y controles. NTC: No template control

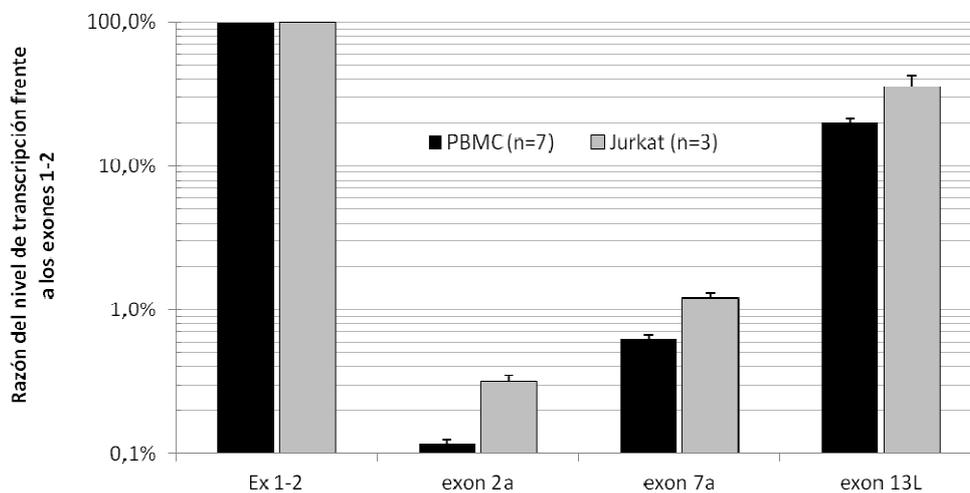


Figura 58. Razón del nivel de transcripción (en porcentajes) de los nuevos exones 2a, 7a y 13L relativo a los exones 1-2 de *CCM1*.

RESULTADOS



Figura 59. Estado de conservación de los nuevos exones 2a, 7a y 13L. Imagen tomada del explorador genómico UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). Las secuencias fueron alineadas mediante BLAT y comparadas con varias especies vertebrados (Vertebrate Multiz Alignment & Conservation; 100 Species). Por orden (hacia abajo, especies más separadas a nivel evolutivo) se muestra el alineamiento con las secuencias de chimpancé (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla gorilla*), orangután (*Pongo pygmaeus abelii*), Rhesus (*Macaca mulatta*), ratón, rata, conejo, cerdo (*Sus scrofa*), perro (*Canis lupus familiaris*), elefante (*Loxodonta africana*), pollo (*Gallus gallus*), rana (*X. tropicalis*), pez cebra (*Danio rerio*) y lamprea (*Petromyzon marinus*). En el exón 13L podemos apreciar que la región más conservada corresponde al exón 13 (en naranja).

La amplificación realizada en PBMC de controles sanos de distintos exones hacia el exón 13L, mostró una mayor intensidad de banda en gel de agarosa desde el exón 5 que desde el exón 1 (figura 60). Dicha intensidad parece mantenerse en el exón 7 y 11.

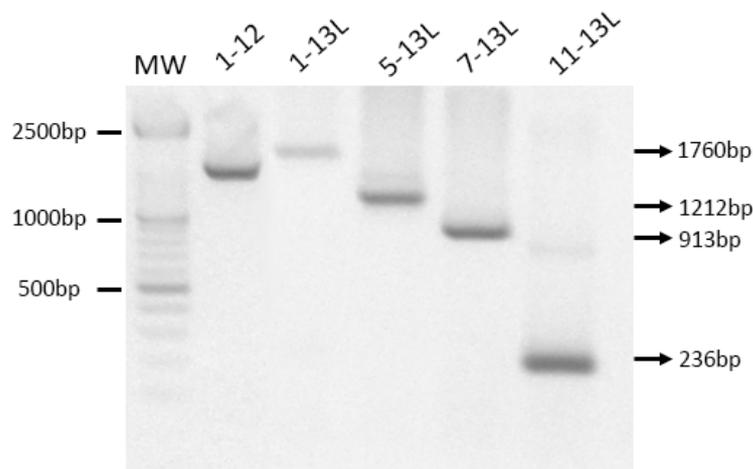


Figura 60. Amplificación del exón 13 hacia distintas regiones 5' de *CCMI*. MW: Marcador de peso molecular de 100pb. Podemos observar de manera semi-cuantitativa una menor concentración del fragmento correspondiente al exón 1-13L. El fragmento exón 1-12 es utilizado para valorar la eficiencia de la amplificación en cuanto al tamaño amplificado.

3. Efecto del fenilbutirato en la transcripción de *CCMI*

El objetivo de este apartado fue valorar la regulación de la transcripción de *CCMI* por inhibidores de la histona deacetilasa (iHDAC). Para ello, cultivamos células Jurkat T con ácido valproico (VPA) o 4-fenilbutirato de sodio (4-PB). El análisis mediante RT-qPCR mostró un aumento de casi el 60% en el nivel de transcripción de *CCMI* en presencia de 4-PB, tanto en la región codificante inicial (exones 1-2) como en la región más interna (exones 11-12). En presencia de VPA se observó un discreto aumento del 10%. En cuanto a los nuevos exones, el exón 2a mostró el mismo patrón de expresión, con un aumento del 29% y 83% para VPA y 4-PB. Sin embargo, el exón 7a y 13L mostraron un descenso en torno al 25% en presencia de ambos inhibidores (figura 61).

Enfocamos nuestro estudio en la región 5' no codificante, donde las variantes estudiadas (Spl1-Spl8) se diferencian en la forma en que se empalman y los TSS están concentrados en la misma región. De igual manera, valoramos la regulación por VPA y 4-PB mediante RT-qPCR para las 8 variantes de splicing. Sorprendentemente, encontramos una regulación diferencial de las distintas variantes. Por un lado, la estimulación con VPA no ejerció ningún efecto en la mayoría de las variantes, excepto en Spl5, Spl6 y Spl7, donde se observó una

disminución en los niveles de transcripción. Sin embargo, en presencia de 4-PB, los niveles de transcripción aumentaron un 79%, 43% y 113% para las variantes Spl1, Spl3 y Spl8. Otras variantes como Spl2 y Spl4 permanecieron sin cambios y las restantes mostraron una disminución transcripcional (figura 62).

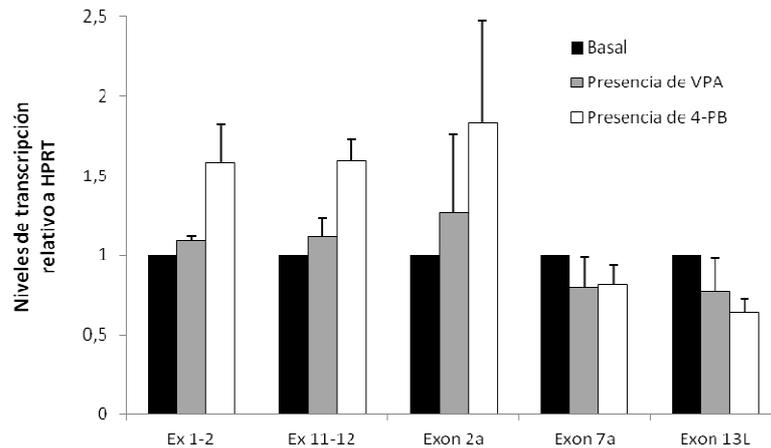


Figura 61. Regulación diferencial de los niveles de transcripción en presencia de 4-PB en distintas regiones de *CCMI* en células Jurkat T (n=3). Diagrama de barras donde se representa la media (\pm error estándar de la media).

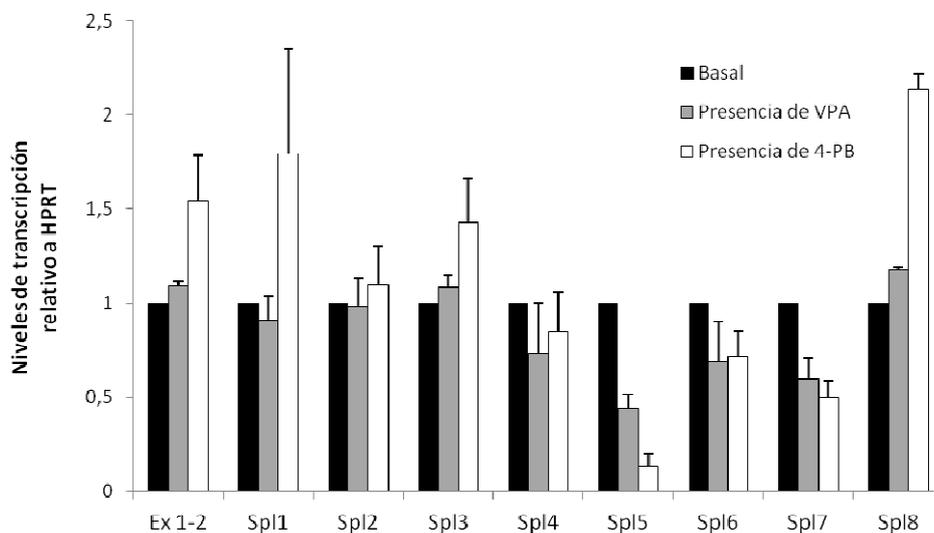


Figura 62. Regulación diferencial en presencia de 4-PB de los niveles de transcripción en distintas regiones de *CCMI*, en células Jurkat T (n=3). Diagrama de barras donde se representa la media \pm error estándar de la media.

3.4. Influencia de la región 5' no codificante en la transcripción de *CCM1*

Para dar una mayor evidencia a la presencia de diferentes sitios de inicio de transcripción realizamos un experimento con PBMC de dos pacientes CV171 y CV172, portadores de una delección de la región 5'UTR de *CCM1* (apartado 2.1.1 de Resultados). Previamente, pudimos observar como el nivel de transcripción relativo a los exones 1-2 estaba disminuido en 75% y 48% para CV171 y CV172 (figura 26). Extendimos el estudio a los exones 11-12 y a los nuevos exones. Se observó una disminución similar en los exones 11-12 y exón 7a. Sin embargo, el nivel de transcripción permaneció sin alterarse en el exón 2a y aumentó en hasta un 85% para el exón 13L (figura 63).

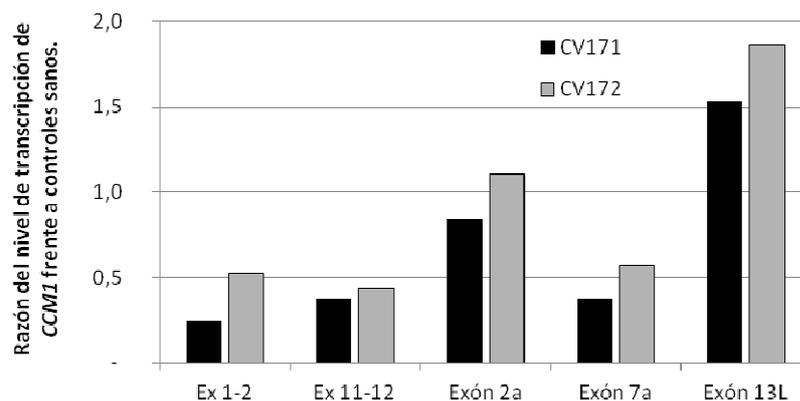


Figura 63. Efecto del nivel de transcripción de los pacientes portadores de la delección 5'UTR de *CCM1* frente a controles sanos (n=7).

3.5. Posibles nuevas isoformas de la proteína *Krit1*

Con objeto de estudiar las consecuencias traslacionales de los splicing y nuevos exones detectado, se realizó un análisis mediante *Western blot*. Previamente había sido descrita la presencia de una banda principal en 58kDa mediante *Western blot* usando un anticuerpo dirigido frente a la región C-terminal de *Krit1*. Sin embargo, nosotros pudimos observar que tanto las células Jurkat T como PBMC expresan una banda intensa a 27 kDa

(figura 64a) que no había sido descrita previamente. Otras bandas de menor intensidad fueron la banda de 85 kDa, correspondiente al polipéptido completo de 736 aminoácidos y las bandas correspondientes a 36 y 64 kDa, que podrían relacionarse con el producto de los transcritos que incluyen el exón 7a y los que eliminan los exones 12 a 14. El resto de bandas observadas no pudo relacionarse con otros transcritos.

El estudio densitométrico en Jurkat reveló que la banda de 36 kDa parece tener un nivel de expresión del 1,1% relativo a la banda de 27 kDa (figura 64b). Previamente hemos mostrado que el exón 7a tiene un nivel de transcripción del 1,2%.

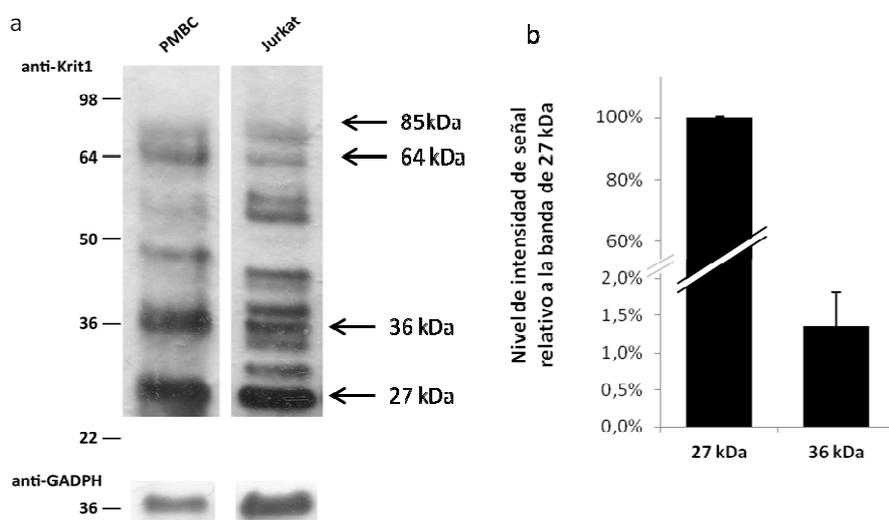


Figura 64. Expresión de la proteína Krit1 en PBMC y células Jurkat T. Análisis mediante *Western blot* con un anticuerpo dirigido frente a la región N-terminal de Krit1. a) Tanto PBMC como las células Jurkat T muestran una banda principal de 27 kDa. Otras bandas son visualizadas con una menor intensidad. b) Cuantificación relativa de la banda de 36 kDa respecto de la de 27 kDa.

Con la finalidad de valorar si la banda de 27kDa corresponde a la proteína Krit1, se decidió evaluar la regulación de la expresión por 4-PB. Previamente hemos mostrado que el nivel de transcripción de *CCMI* aumenta casi un 60%, relativo a los exones 1-2. Como se observa en la figura 65, la estimulación de células Jurkat T en presencia de 4-PB evidenció un aumento de un 50% de la expresión de la banda de 27 kDa tras el estudio densitométrico.

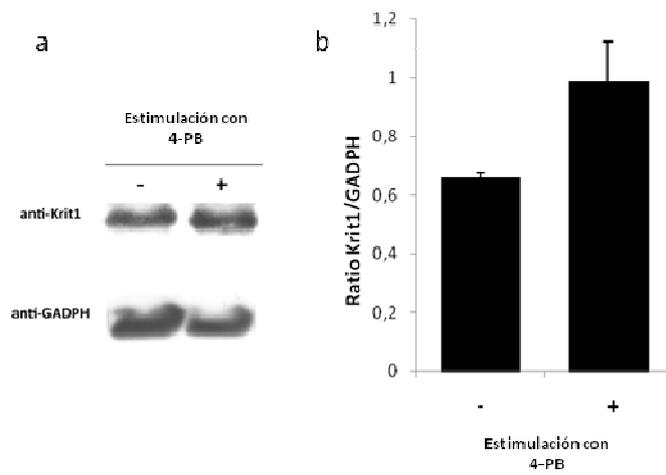


Figura 65. Regulación positiva de Krit1 por 4-PB en células Jurkat T (n=3). a) Análisis de *Western blot* mostrando la banda de 27kDa correspondiente a Krit1 y, tras la realización de un streaping, 40kDa correspondiente a GAPDH. b) Cuantificación relativa frente a la proteína GAPDH, en la que se observa un aumento de un 50% en la expresión de Krit1.

Discusión

Esta tesis viene a recoger por un lado los resultados del diagnóstico genético de Cavernomatosis Cerebral durante más de 15 años del Servicio de Biología Molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena. Durante estos años, se han descubierto tres genes relacionados con la Cavernomatosis (*CCM1*, *CCM2* y *CCM3*) (Dubovsky *et al.* 1995; Gunel *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1995), incluyendo nuevos exones en *CCM1* no detectados en un primer momento (Eerola *et al.* 2001; Sahoo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000). Pronto se habló de un cuarto gen CCM (Liquori *et al.* 2006; Craig *et al.* 1998) debido a que no se detectaban mutaciones en muchos pacientes, aunque hasta la fecha no ha sido desvelado. La introducción de técnicas como el MLPA ha permitido diagnosticar a pacientes portadores de deleciones, que no eran detectadas mediante secuenciación. Además, hay que destacar el gran avance que ha supuesto la mejora de la secuenciación tipo Sanger y su análisis mediante instrumentos de electroforesis capilar.

Por otro lado y como segundo objeto de esta Tesis, hemos intentado abarcar el estudio del cDNA, no sólo centrándonos en el estudio funcional de mutaciones de significado incierto sino a un nivel más básico. El hecho de encontrar splicing aberrantes en *CCM1* (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2002) en sujetos sanos no asociados a mutaciones, tanto en linfocitos como en fibroblastos, es algo que nos ha llamado mucho la atención por no tener una justificación clara. En este camino, hemos encontrado una población bastante diversa de transcritos de *CCM1*, con una gran variabilidad de splicings alternativos en la región 5' no codificante y con numerosos sitios de inicio de transcripción a lo largo de todo el gen. Además de esto, hemos localizado nuevos exones. Finalmente, hemos enfocado las posibles consecuencias de los splicings y nuevos exones observados hacia el estudio proteómico de Krit1. En este último punto hemos encontrado una isoforma no esperada producto principalmente de la proteólisis del polipéptido de longitud completa.

1. Prevalencia de mutaciones en los genes CCM

El estudio de la prevalencia ha sido realizado continuando los trabajos recogidos en anteriores tesis cometidas en el Servicio de Biología Molecular (Costa AF, 2003; Ortiz L,

2006). En esta Tesis describimos la prevalencia de mutaciones en población española realizada en 97 casos familiares y 45 casos esporádicos, que comprenden un total de 264 sujetos. Hemos identificado 32 mutaciones patogénicas en los genes CCM, siendo 13 de ellas no descritas en la literatura previamente. En cuanto al tipo de mutaciones localizadas se incluyen las de tipo nonsense, frameshift, mutaciones que afectan a la región de splicing, missense y deleciones superiores a un exón. De forma interesante, el estudio en cDNA de una de las mutaciones missense ha revelado el uso de un sitio crítico de splicing provocando una modificación del marco de lectura.

En este estudio hemos encontrado una prevalencia de mutaciones del 38% en formas familiares y del 9% en casos esporádicos. Estos datos son menores comparados con otras poblaciones estudiadas. En 2006, el grupo francés informó de una prevalencia del 78% en población francesa (Denier *et al.* 2006), detectando en un 94% de los casos índices con algún familiar afecto frente a un 57% sin familiar afecto y múltiples lesiones. Sin embargo, el siguiente estudio realizado entre los años 2006 y 2010 detectaron sólo un 44% (Riant *et al.* 2013b), cifra más cercana a nuestra cohorte. Este cambio puede deberse a la inclusión de pacientes con historia de hemorragia cerebral de etiología desconocida. Por otro lado, en cuanto a la distribución de mutaciones en los genes CCM encontramos resultados similares. En nuestro caso las mutaciones en los genes *CCM1*, *CCM2* y *CCM3* representan el 59%, 31% y 10%, respectivamente, de las mutaciones encontradas en los casos índices (n=39). Como hemos comentado anteriormente, de las 32 mutaciones encontradas en población española, 13 de ellas han sido nuevas. Es importante resaltar que cerca de 200 mutaciones diferentes han sido descritas en pacientes CCM con un bajo grado de recurrencia. No obstante, dos excepciones son la transición c.1363C>T en el gen *CCM1*, altamente prevalente en población Hispano-Americana (Sahoo *et al.* 1999) pero no española (Lucas *et al.* 2000), y la deleción de 14pb en *CCM2*, prevalente en población de ascendencia ibérica (Ortiz *et al.* 2007).

La introducción de la técnica MLPA ha permitido la detección de casos en los que hay deleciones superiores a un exón. Hasta ahora se han detectado cerca de 40 deleciones en los genes CCM (Bergametti *et al.* 2005; Denier *et al.* 2004; Gaetzner *et al.* 2007; Liquori *et al.* 2007; Riant *et al.* 2013b; Stahl *et al.* 2008). En este estudio hemos detectado cuatro deleciones, dos en *CCM1* y dos en *CCM2*. Éstas fueron definidas relativas a las posiciones

de las sondas de ADN-MLPA. La delección de los exones 5' no codificantes de *CCMI* (pacientes CV171, 172, 175 y 178, pertenecientes a la misma familia) implica la pérdida de los sitios de inicio de transcripción en esta región, por lo que se esperaría la ausencia del transcrito de longitud completa. Así ha quedado demostrado con la cuantificación relativa del nivel de transcripción de los exones 1-2 y exones 11-12 de *CCMI*, observándose una disminución 48-75% en los pacientes CV171 y CV172 frente a controles sanos. Sin embargo, la paciente CV178 no ha desarrollado lesiones hasta la fecha, poniendo de manifiesto una penetrancia incompleta. La delección de los exones 12-16 de *CCM1* deberíamos esperar la ausencia de transcrito completo, de igual manera que observan Riant et al (Riant *et al.* 2013b) con la delección de los exones 15-16, aunque no se ha podido realizar un estudio confirmatorio en cDNA. En cuanto al gen *CCM2*, se detectó una delección completa del gen uno de los pacientes y una delección del exón 1 y región 5'UTR en otro paciente. Este último caso implica la pérdida tanto del inicio de transcripción como del codón de inicio de la traducción, presente en el primer exón de *CCM2*, por lo que se esperaría la ausencia del transcrito completo. Sin embargo, hay descrito un primer exón alternativo en *CCM2* (NM_001029835.2), no incluido dentro del kit de sondas de MLPA, que incluye un codón de inicio alternativo produciendo una proteína más larga (465 aa). La familia CV128 (figura 66), portadora de esta delección, parece tener una penetrancia clínica y radiológica incompleta. Por ello, pensamos que este primer exón alternativo puede no estar deleccionado. Este exón es transcrito tanto en linfocitos como en células Jurkat T (datos no mostrados), pero no hay estudios sobre células endoteliales ni a nivel transcripómico ni proteómico.

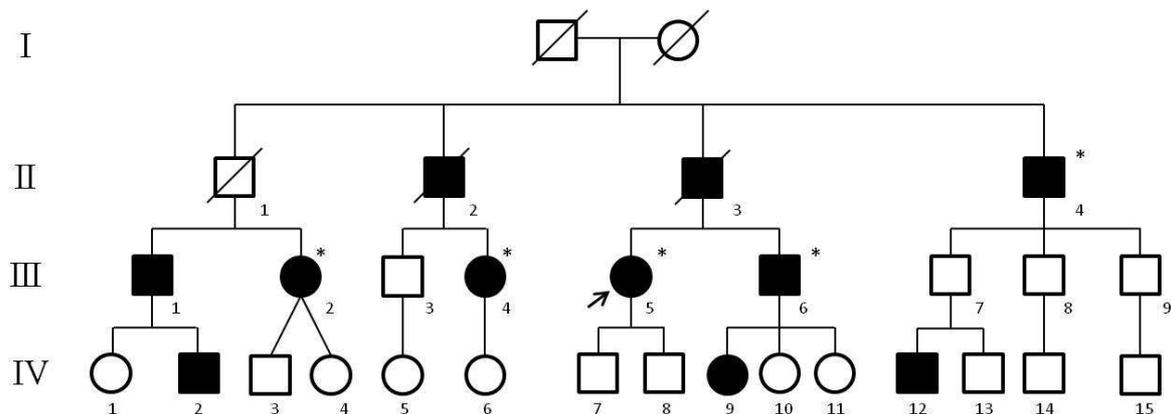


Figura 66. Pedigrí de la familia CV128, portadora de la mutación 5'UTR-exon1delCCM2. La flecha indica el caso índice. Los asteriscos indican los sujetos en los que fueron positivos para la delección.

Por lo general, las mutaciones en *CCM1* parecen conducir a la producción de proteínas truncadas a través de distintos mecanismos, incluyendo mutaciones missense que activan sitios crípticos de splicing (Cave-Riant *et al.* 2002; D'Angelo *et al.* 2012; Verlaan *et al.* 2002). En este sentido, hemos podido analizar a nivel de cDNA muestras de dos pacientes portadores en *CCM1* de las mutaciones missense p.D281G y p.S592T. La mutación p.D281G genera un nuevo sitio donador de splicing que produce un splicing críptico. Es interesante denotar como el cromosoma afecto elige un sitio de splicing no convencional (GC en lugar de GT). El análisis bioinformático indica, de hecho, un aumento en la puntuación HSF del sitio críptico (72,21 vs 66,21 WT). El resultado de esta elección es la modificación del marco de lectura, provocando la producción de una proteína truncada (p.Asp281GlyfsX5). Por otro lado, la mutación p.S592T ha mostrado ambos alelos en el análisis de cDNA y no observándose splicing críptico. A nivel de proteína, la serina 592 se localiza en el dominio F2 FERM de Krit1 y está conservada entre diferentes especies. El análisis bioinformático predice que esta mutación podría ser posiblemente dañina según Polyphen-2 (puntuación: 0,709) pero tolerada por SIFT (puntuación: 0,08). Es por ello que no podemos asegurar ni descartar su patogenicidad, siendo necesarios estudios adicionales.

El análisis de *CCM2* en nuestra cohorte ha revelado sólo dos nuevas mutaciones. El estudio en cDNA del paciente índice CV145, portador de la transición silente c.222G>A, ha mostrado tanto el alelo mutante como el salvaje y no observándose splicing críptico alguno asociado a la mutación. Por ello, esta transición debería considerarse en principio como una

variante sin significado patogénico. En la mutación c.713C>A (p.S238Y) no pudo llevarse a cabo un estudio en cDNA. No obstante el análisis bioinformático parece indicar que esta mutación podría ser patogénica, ya que puntuaciones Polyphen-2 y SIFT fueron 0,993 y 0,03. Además, la serina 238 parece ser fosforilada (Kim *et al.* 2011), por lo que la mutación podría afectar a alguna función de CCM2 no desvelada hasta ahora. Por otro lado, la mutación c.30+1G>A, aunque previamente fue descrita (Verlaan *et al.* 2004) no se realizó estudio en cDNA. Las mutaciones en regiones invariantes de splicing son patogénicas prácticamente siempre, provocando la delección del exón afecto. En este caso, al estar afectado el primer exón de CCM2, lo esperable es la delección de este exón con la ausencia del transcrito completo. Al igual que en el caso de la familia CV128, se observa una penetrancia clínica y radiológica variable. Esto da fuerza a pensar que el otro primer exón alternativo puede ser transcrito. Por ello, debería considerarse el estudio de este exón, tanto mediante MLPA como por secuenciación.

El análisis de CCM3 ha mostrado un bajo número de mutaciones detectadas, sólo cuatro, siendo tres de ellas no descritas previamente en la literatura. Cabe resaltar que la mutación c.474+5G>A ha sido detectada *de novo* en el paciente CV164, al igual que describe Liquori *et al.* (Liquori *et al.* 2006). Hasta la fecha se han descrito 8 mutaciones *de novo* en los genes CCM, 2 en CCM1 (25%) (Lucas *et al.* 2001; Stahl *et al.* 2008) y 6 en CCM3 (75%) (Bergametti *et al.* 2005; Liquori *et al.* 2006; Riant *et al.* 2013a). Ninguna de ellas ha sido recurrente, por lo que podríamos pensar en un punto caliente del genoma más que en una simple casualidad.

En cuanto a los polimorfismos encontrados en el gen CCM1, la transición silente c.1980A>G (rs11542682) fue detectada en estado heterocigoto en un 12% en nuestra cohorte, ligeramente inferior a lo informado previamente (Cave-Riant *et al.* 2002). Sin embargo, en población europea hay descrito un 13,5% (<http://browser.1000genomes.org/index.html>; acceso 24 abril 2014). La frecuencia del polimorfismo intrónico c.989+63C>G (rs2027950) fue similar a otras poblaciones. En el gen CCM2, la frecuencia de los polimorfismos c.157G>A (rs2107732), c.205-36A>G (rs2304689), c.358G>A (rs11552377), c.915G>A (rs2289367) y c.1054+12C>T (rs190686229) fue similar a otras poblaciones y a la recogida en la base de datos del proyecto de los 1000 genomas (<http://browser.1000genomes.org/index.html>; acceso 24 abril

2014). Algunos de estos polimorfismos se han asociado con un aumento en el riesgo de sufrir CCM y una predisposición a una mayor ocurrencia de una sintomatología “potencialmente discapacitante” más que a un “posible riesgo para la salud” (D'Angelo *et al.* 2012).

Respecto a los síntomas clínicos en nuestra cohorte de pacientes, además de las características clásicas de la enfermedad, los principales hallazgos fueron la coincidencia de cavernomas con síndromes de Chiari y Noonan y con una menarquia tardía. Es importante puntualizar que estos hallazgos son casuales y no implican una asociación patogénica entre los cavernomas y los síndromes anteriormente citados. Por otro lado, hemos estudiado cuatro familias no relacionadas con imágenes radiológicas de anomalías del desarrollo venoso (ADVs) y CCMs. La coincidencia de CCMs y ADVs no es rara, de hecho se han observado en torno a un 25% de los casos (Zhang *et al.* 2013). Aunque sigue existiendo controversia, varios estudios soportan la hipótesis que las ADVs pueden ser consideradas como un factor fisiopatológico inicial en el desarrollo de cavernomas (Wurm *et al.* 2005; Ciricillo *et al.* 1994; Awad *et al.* 1993; Rigamonti *et al.* 1990). Igual de controvertido es la sugerencia que la presencia de CCM y ADV tiene un curso más agresivo que la presencia única de CCM (Zhang *et al.* 2013; Ciricillo *et al.* 1994; Awad *et al.* 1993). En ninguno de nuestros casos hemos detectado mutación patogénica en los genes CCM. De forma interesante, el sujeto CV146 II2 tenía una imagen radiológica de ADV pero no era portador de la delección genómica en *CCMI* (ex12-16del*CCMI*), presente en el padre y hermana. Y de forma inversa, estos dos pacientes no tenían imagen de ADV en MRI. Es por ello que nuestros hallazgos soportan un mecanismo patogénico separado para ADV y CCM.

Dada la falta de datos clínicos no ha sido posible realizar una correlación genotipo-fenotipo. Hasta la fecha, sólo se ha realizado una correlación genotipo-fenotipo (Denier *et al.* 2006). Es interesante resaltar que una misma mutación puede influir de forma distinta en el desarrollo de lesiones, véase que en los pacientes no relacionados CV133 y CV163, portadores de la mutación en *CCMI* p.S301X, han desarrollado 2 y >50 lesiones, respectivamente. De igual manera observamos que dentro de una misma familia la presentación de la enfermedad es distinta. Por ejemplo, en la familia CV146, la hija (probando II-1) presenta 4 lesiones en MRI, crisis epilépticas y dolores de cabeza mientras

que el padre (probando I-1) presenta 2 lesiones y únicamente dolores de cabeza (tabla 7; sección 1 Resultados).

Tras el análisis de los tres genes CCM, la mutación responsable de la enfermedad sigue sin ser detectada en el 62% de las formas familiares. Varias explicaciones han sido propuestas para este aparente bajo nivel de detección: i) la existencia de mosaicismo o deleciones genómicas no detectadas mediante los métodos usados (Bergametti *et al.* 2005); ii) la existencia de un posible cuarto locus CCM cerca de *CCM3* (Liquori *et al.* 2006); y iii) mutaciones intrónicas profundas que puedan activar sitios críticos de splicing (Pagani & Baralle 2004). Esto último ha sido recientemente descrito por Riant *et al.* (Riant *et al.* 2013c) en el gen *CCM1*.

Eventos de splicing aberrantes han sido descritos en sujetos sanos en el gen *CCM1* (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2002), tanto en linfocitos como en fibroblastos. También en otros genes se ha observado la producción de splicings aberrantes, como en el gen *NF1* relacionado con la Neurofibromatosis tipo 1 (Wimmer *et al.* 2000) y el gen *ATM* relacionado con la Ataxia-Telangiectasia (Teraoka *et al.* 1999). En nuestro caso, el estudio del cDNA de *CCM1* mostró splicings aberrantes, tanto en pacientes como en controles. En este gen dos polimorfismos fueron detectados, rs2027950 localizado en el intrón 7 y rs11542682 situado en el exón 14. En un primer momento nos planteamos si estas variantes podrían tener alguna influencia sobre la producción de splicing aberrantes. Elegimos para ello pacientes y controles con los tres genotipos posibles. No obstante, pudimos observar dichos splicings en todos los casos. La claridad con la que se observan estos resultados nos sugieren la posibilidad de que estos splicing deriven de transcritos truncados, no funcionales o en proceso de degradación. La valoración de la degradación de transcritos puede realizarse mediante estudios funcionales añadiendo inhibidores de la síntesis proteica tales como la cicloheximida o puomicina (Vreeswijk & van der Klift 2012). Dado que los splicing fueron observados en cultivos sin la presencia de estos inhibidores, nos quedamos con la posibilidad de producción de transcritos truncados. Por ello, planteamos amplificaciones en ambos sentidos para los splicing 132bp Δ 5 y Δ 6,7. La amplificación tanto de los exones 5 a 8 como de los exones 5 a 12 evidenció ambos splicing, no siendo así en la amplificación de los exones 1 a 8. Este último hecho nos sugirió la posibilidad de posibles sitios de inicio de transcripción alternativos.

Finalmente, es importante discernir qué mutaciones producen la elección de sitios de splicing críticos. Un ejemplo lo tenemos en el splicing estudiado en 132bp Δ 5*CCMI*. Dos mutaciones missense han sido descritas por producir dicho splicing, c.601C>G (p.Q201E) (Verlaan *et al.* 2002) y c.413C>T (p.I138T) (D'Angelo *et al.* 2011). En el primer caso, el análisis bioinformático muestra un aumento en la puntuación del sitio donador de splicing de HSF (96,51; +4,17%) y MaxEnt (9,22; +22,43%) y una modificación de los motivos ESE. Sin embargo, el análisis de la mutación c.413C>T no predice el uso de un sitio crítico de splicing ni modificación de los motivos reguladores. Además, el hecho de la mutación c.413C>T esté localizada en el exón 4 nos hace pensar que esta mutación no tiene influencia en la formación de los splicing descritos.

2. Diversidad transcripcional del gen *CCMI*

A lo largo del genoma humano se ha estimado que existe aproximadamente unos 20.000 a 25.000 genes que codifican para proteínas. Sin embargo, el transcriptoma es más complejo y alberga tanto transcritos que codifican para proteínas como transcritos no codificantes. Dentro de este grupo de transcritos no codificantes se encuentran los ARN largos no codificantes y microARNs, entre otros. Además de esto, el mecanismo de splicing alternativo aumenta de la diversidad de transcritos producidos dentro de un mismo gen, lo que puede generar isoformas proteicas con distintas funciones. Centrandonos en el gen *CCMI*, encontramos publicadas cinco secuencias de referencia (RefSeq) y otras 14 variantes basadas en evidencia EST (Expressed Sequence Tags) cuyas diferencias están localizadas en la región 5' no codificante y en el salto del exón 7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/889>) (figura 67).

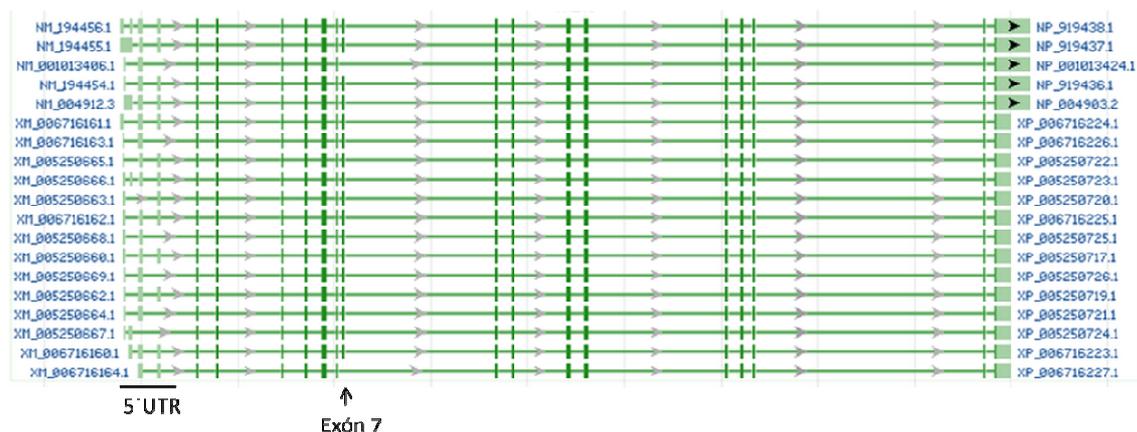


Figura 67. Transcritos del gen CCM1 publicados en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/889>). Se puede observar distintos splicing alternativos en la región 5' UTR y otro que comprende la eliminación del exón 7.

2.1. *CCMI* tiene múltiples sitios de inicio de transcripción

Se han descrito splicing aberrantes o crípticos presentes en sujetos sanos tanto en el gen *CCMI* como en otros genes. Como comentamos en el apartado anterior, nosotros hemos detectado también este tipo de splicing, pero con la sugerencia de que se produzcan con otros sitios de inicio de transcripción. Para abordar la determinación de los TSS hemos utilizado la técnica 5' RACE, la cual ha sido ampliamente usada no sólo para detectar nuevos exones en regiones 5' sino también para estudiar regiones regulatorias. Mediante este procedimiento se detectaron ocho nuevos exones en *CCMI* a principios de la década pasada (Sahoo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000).

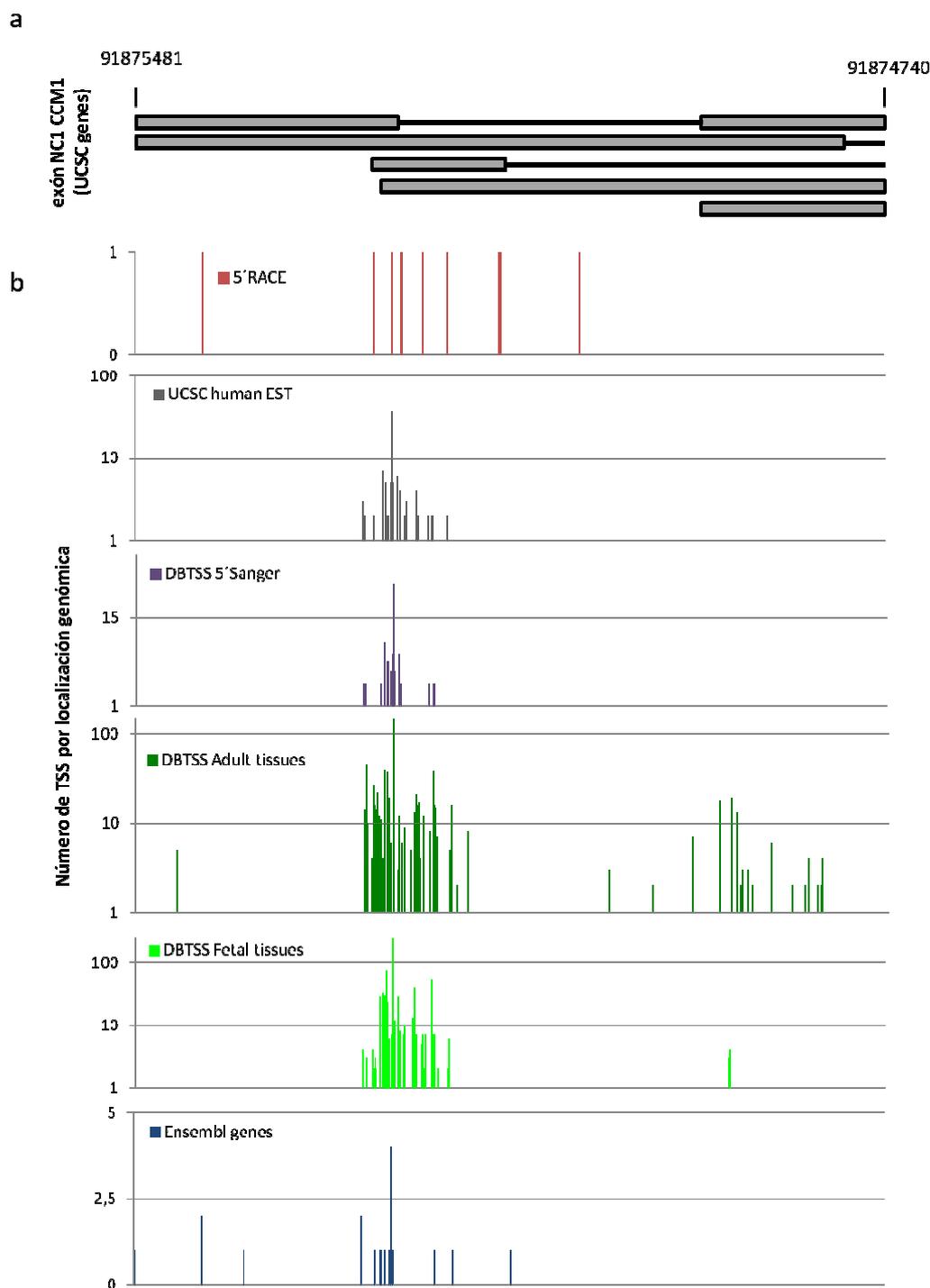


Figura 68. Posición (en abscisas) y número de TSS (en ordenadas) detectados en el exón 1 no codificante de CCM1 (741pb). Cada barra representa el número de TSS anotados por base. a) Representación del exón 1 no codificante, obtenido del explorador genómico UCSC (Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly). b) Anotaciones de TSS de nuestros resultados obtenidos mediante 5'RACE y bases de datos (EST, DBTSS y Ensembl). UCSC human EST: clones EST alineados en UCSC Genome Browser; DBTSS 5'Sanger: datos obtenidos con secuenciación tipo Sanger de varios tejidos mediante la técnica "oligo-capping"(Suzuki *et al.* 1997); DBTSS Adult tissues: datos obtenidos a partir de un panel de RNA total de 19 tejidos de Ambiom y Clontech (Yamashita *et al.* 2011); DBTSS Fetal tissues: datos obtenidos a partir de un panel de RNA total de 5

tejidos fetales de Clontech (Yamashita *et al.* 2011); Ensembl genes: datos obtenidos de los transcritos publicados en Ensembl.

Nosotros hemos replicado estos hallazgos mediante secuenciación directa (figura 22; sección 5.2, Material y métodos) en cuatro muestras diferentes (dos líneas linfoblastoides y en PBMC de dos sujetos sanos). En este estudio hemos localizado TSSs, especialmente en el exón 1 no codificante, detectado una gran variabilidad en cuanto a la localización exacta de los mismos. Al comparar nuestros resultados, relativos al exón 1 no codificante, con distintas bases de datos observamos el mismo efecto (figura 68). Los datos representados en estas bases de datos provienen tanto de secuenciación tipo Sanger (UCSC human EST y DBTSS 5´Sanger) como de secuenciación masiva (DBTSS Adult tissues y DBTSS Fetal tissues), donde podemos observar una concentración de TSSs en una región de 90pb. Esta variabilidad en la localización de los TSSs es un hallazgo que se extiende a la mayoría de genes (Suzuki *et al.* 2001). Además se ha observado que existe en torno a 80 TSS por gen de media (Kimura *et al.* 2006).

El estudio de la región codificante ha revelado resultados similares (figura 69). Dos nuevos exones y un exón alargado han sido también hallados. Respecto a los sitios de inicio de transcripción intragénicos detectados mediante 5´RACE, la duda que nos puede surgir es si son verdaderos TSSs o transcritos incompletos producto de errores en la retrotranscripción. Esta duda va a venir siempre acompañada de la realización de técnicas que realizan en un primer momento una retrotranscripción, ya sea mediante el uso de un cebador específico (5´RACE) o un oligodT (fragmentos EST, análisis de RNA con secuenciadores de una sola molécula (Sharon *et al.* 2013)). Una mayor fiabilidad en la detección de TSS parece tener las técnicas que usan el denominado método del “oligo-capping” (Suzuki *et al.* 1997), usado en 5´end-SAGE (Serial Analysis of Gene Expression (Hashimoto *et al.* 2004)) y CAGE (Cap Analysis of Gene Expression (de & Hayashizaki 2008)). Esta técnica se basaba en un primer momento en la escisión de la caperuza del mRNA e inserción de un adaptador, con posterior retrotranscripción e introducción en un vector. Con ello se conseguía una librería enriquecida de cDNAs completos, si se usaba un oligo-dT para la retrotranscripción, o una librería enriquecida de TSS, usando cebadores aleatorios. Esta técnica se ha ido mejorando y adaptando a metodologías de secuenciación masiva. De esta manera se han conseguido analizar y alinear los TSSs a lo largo de todo el

genoma, incluyendo todos estos datos en la base DBTSS (<http://dbtss.hgc.jp>). Por ello, hemos comparado nuestros resultados con DBTSS, que incluye las anotaciones realizadas tanto con secuenciación tipo Sanger (DBTSS 5'Sanger) como con CAGE (DBTSS Adult Tissues y DBTSS Fetal Tissues). En estas dos últimas (figura 69) podemos observar la existencia un gran número de TSSs anotados a lo largo de todo el gen *CCMI*. Hay que resaltar que “DBTSS Adult Tissues” y “DBTSS Fetal Tissues” incluyen las anotaciones de 19 y 5 tipos de tejidos, respectivamente, No diferenciando por tejidos.

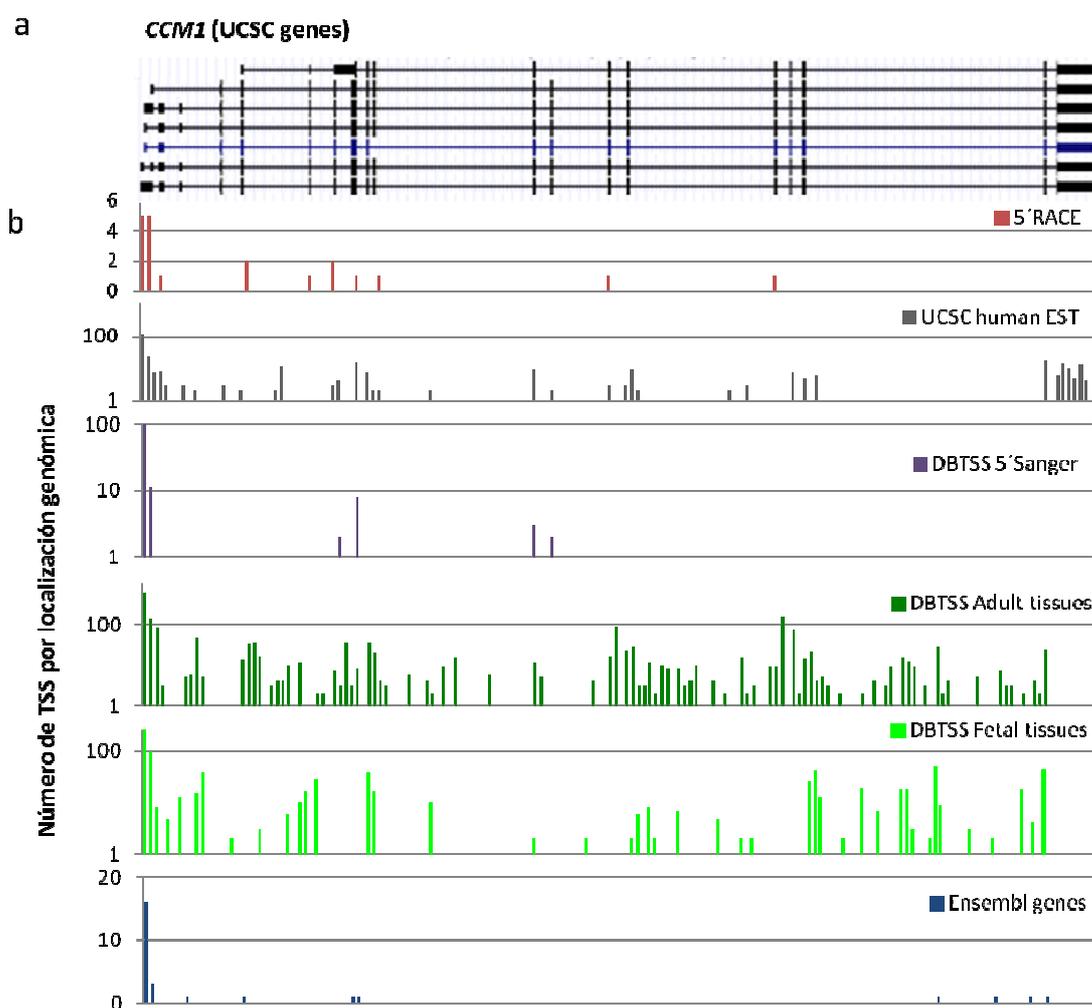


Figura 69. Posición (en abscisas) y número de TSS (en ordenadas) detectados en el gen *CCMI* (47,1 Kb). Cada barra representa el número de TSS anotados por cada 283 bases. a) Representación de *CCMI*, obtenido del explorador genómico UCSC (Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly). b) Anotaciones de TSS de nuestros resultados obtenidos mediante 5'RACE y bases de datos (EST, DBTSS y Ensembl). UCSC human EST: clones EST alineados en UCSC Genome Browser; DBTSS 5'Sanger: datos obtenidos con secuenciación tipo Sanger de varios tejidos mediante la técnica “oligo-capping”(Suzuki *et al.* 1997); DBTSS Adult tissues: datos obtenidos a partir de un panel de RNA total de 19 tejidos de Ambiom y Clontech (Yamashita *et al.* 2011); DBTSS Fetal tissues: datos obtenidos a partir de un panel de RNA total de 5 tejidos fetales de Clontech (Yamashita *et al.* 2011); Ensembl genes: datos obtenidos de los transcritos publicados en Ensembl.

2.2. Múltiples variantes de splicing en región 5' no codificante.

En esta región 5' no codificante hemos detectado y cuantificado mediante RT-qPCR ocho variantes de splicing, encontrando numerosos sitios de splicing en el primer exón y dos sitios de splicing en el segundo exón no codificante (figura 70). Además, hay transcritos que eliminan el exón 3 no codificante (figura 67). En esta Tesis hemos observado que el patrón de splicing de la región 5'UTR varía entre células Jurkat T y PBMC. En este sentido, Eerola y colaboradores describen también un patrón de splicing variable entre distintos tejidos humanos (Eerola *et al.* 2001), determinado mediante RT-PCR y comparando la intensidad de bandas observadas en geles de agarosa. Debido a que no se especifican en dicho estudio los sitios de splicing no es posible comparar con nuestros resultados, aunque parece mostrar un patrón diferente al observado en nuestro estudio. La explicación a estas diferencias es compleja ya que hay que tener en cuenta muchos factores que pueden influir en la transcripción (TSS, ocupación de los nucleosomas, presencia de factores de transcripción, sitios de splicing, motivos potenciadores e inhibidores de splicing, factores de splicing, estructura secundaria y estabilidad del mRNA, etc).

El estudio de las ocho variantes 5'UTR de splicing (Spl1 – Spl8) en esta Tesis explica un 55% de la expresión génica del transcrito completo de *CCMI* (relativo a los exones 1-2). El restante 45% podría ser explicado por otras variantes no detectadas con los experimentos realizados en nuestro estudio (figura 70). Las combinaciones de los exones con distintos sitios de splicing más la eliminación de exones completos en la región 5' no codificante puede resultar en más de 30 posibles variantes 5'UTR de splicing (evidencia EST). La región 5' no codificante juega un papel fundamental en el control de la expresión génica en células eucariotas. Estudios del transcriptoma en mamíferos sugieren que la mayoría de los genes expresan múltiples variantes 5'UTR de splicing con un efecto diferencial en la expresión proteica (Hughes 2006; Liu *et al.* 2012). Se ha visto que esta región puede modular la expresión génica a través de mecanismos que tienen influencia en las modificaciones post-transcripcionales del RNA (estructura secundaria y estabilidad del mRNA) y eficiencia traslacional (Regadas *et al.* 2013; Wang *et al.* 2005). En mamíferos además, genes con variantes 5'UTR de splicing tienden a ser expresados en menor medida y

a codificar proteínas con funciones regulatorias que genes con una invariante 5'UTR (Resch *et al.* 2009).

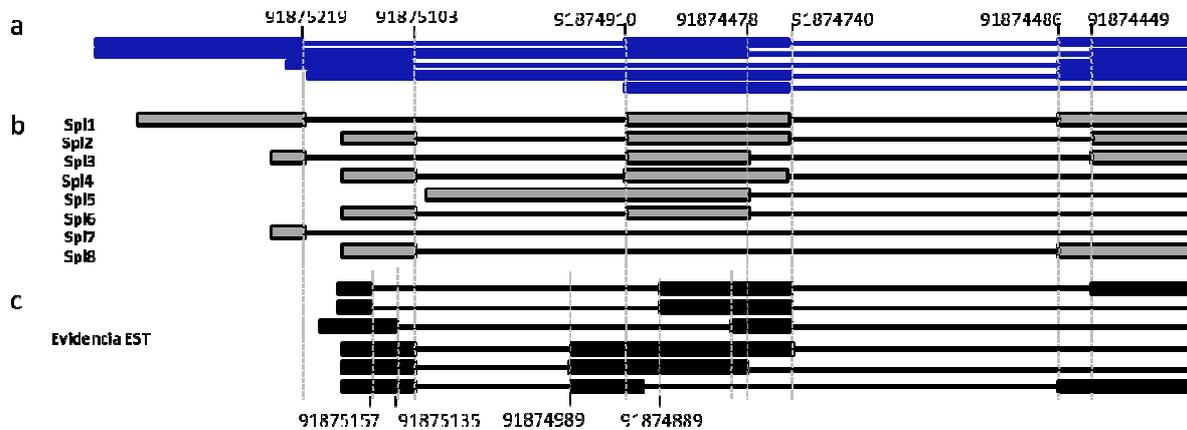


Figura 70. Variantes de splicing de los exones 1 y 2 no codificantes de *CCMI* **a)** Variantes de referencia del explorador genómico UCSC (Human Feb. 2009 Assembly; GRCh37/hg19). **b)** Variantes localizadas en esta Tesis. **c)** Ejemplos de otras variantes de splicing publicadas con evidencia EST en el explorador genómico UCSC.

2.3. Nuevos exones en *CCMI*

Además de los TSSs, el estudio de *CCMI* mediante 5'RACE nos ha desvelado nuevos exones transcritos a bajos niveles. Con estos niveles de transcripción, estos exones pasan desapercibidos en la amplificación mediante PCR de exones colindantes, ya que pueden ser considerados como productos inespecíficos. Puede plantearse que este tipo de exones sean considerados como pseudoexones. Curiosamente, Riant y colaboradores (Riant *et al.* 2013c) así describen al exón 2a. Ellos informan que la delección c.262+132_262+133delAA, localizada en el intrón 2, activa un sitio crítico de splicing, observando la inserción de 99pb en el transcrito salvaje. La naturaleza de esta mutación radica en la delección del sitio aceptor de splicing del exón 2a, en posición -2_-3delAA (figura 56, Sección 3.2 Resultados), provocando la ruptura del sitio de splicing (HSF score: 66,86→37,61; -43,75%) y la potenciación de un nuevo sitio alternativo 11pb en dirección 3' del salvaje (secuencia: ggtgttttaagGT; HSF score: 16,08→82,03; -410,18%). Además se modifican motivos exónicos potenciadores de splicing y se eliminan motivos intrónicos

inhibidores de splicing. Por tanto, estas modificaciones hacen que la maquinaria de splicing incluya este nuevo exón dentro del transcrito completo de *CCMI*, provocando como consecuencia la introducción de un codón de parada prematuro y la producción de una proteína truncada. No obstante, Riant et al informan de una presentación clínica incompleta, encontrando de forma casual una lesión en MRI en dos de los tres casos detectados en la familia (Riant *et al.* 2013c). Otras mutaciones intrónicas profundas han sido descritas por presentar una penetrancia clínica reducida (Svenson *et al.* 2001; Rio *et al.* 2009).

De estos nuevos exones tenemos que destacar su baja conservación en mamíferos, y prácticamente selectiva en primates. La mayoría de los exones están fuertemente conservados en los genomas de ratones y humanos. En base al grado de inclusión de los exones dentro de los transcritos de cada gen, Modrek y colaboradores (Modrek & Lee 2003) clasifican a éstos en constitutivos (presentes en todos los transcritos), mayoritarios (inclusión >50%) y minoritarios (inclusión <50%). A nivel evolutivo, tanto los exones constitutivos como los mayoritarios muestran un grado de conservación entre ratones y humanos del 98%, mientras que los exones minoritarios presentan sólo un 28%. Además, el 28% de los exones minoritarios están regulados positivamente en determinados tejidos de forma específica. Por tanto, definimos a los nuevos exones detectados en *CCMI* como exones minoritarios y no como pseudoexones. Las consecuencias locales de la inclusión de estos exones podrían ser beneficiosas para algunos tejidos, no así para todo el organismo puesto que en los tres casos se producirían proteínas truncadas.

2.4. Efecto del fenilbutirato en la transcripción de *CCMI*

Los genomas en eucariotas se empaquetan en una cromatina altamente compacta debido a las histonas, lo que impone limitaciones a la transcripción de genes. Para hacer frente a este obstáculo, la acetilación de histonas permite abrir la estructura de la cromatina y facilitar el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN en la cromatina. Este es un proceso reversible, donde se modifican determinados residuos específicos en las colas de las histonas y está controlado por histonas acetilasas e histonas deacetilasas, las cuales actúan

como co-activadores y co-represores de la transcripción, respectivamente. Además, se ha visto que bajos niveles de acetilación inducen metilación del ADN y, con ello, silenciamiento génico. De forma inversa, una elevada acetilación protege contra la metilación del ADN (Vaissiere *et al.* 2008).

Los inhibidores de la histona deacetilasa han sido utilizados durante un largo período de tiempo en psiquiatría y neurología por presentar una actividad estabilizadora y anti-epiléptica. El objetivo de nuestro estudio no ha sido evaluar un posible efecto terapéutico sino evaluar a nivel molecular el efecto que tiene sobre la transcripción del gen *CCMI*. La elección de la concentración (2mM) y del tiempo de incubación (2h) fue elegida en base a experimentos realizados en nuestro laboratorio sobre la activación de PBMC (datos no mostrados).

En los experimentos realizados en células Jurkat T hemos podido observar como el efecto del VPA y 4-PB sobre la transcripción de *CCMI* ha sido diferente, observándose una mayor activación por parte del 4-PB. Sorprendentemente, al profundizar en la región 5'UTR observamos que dicha activación es variable. Encontramos que algunas variantes de splicing están positivamente reguladas, otras negativamente y otras permanecen sin cambios. Cabe resaltar que el patrón de splicing observado se modifica con la presencia de 4-PB (figura 71). De forma basal las variantes Spl4 y Spl8 tienen un nivel de transcripción aproximado del 25% cada una. Sin embargo, la estimulación con 4-PB incrementa la transcripción de Spl8 llegando a ser casi el doble de Spl4 (figura 71). La explicación a este efecto es compleja. Los inhibidores de deacetilasa favorecen la transcripción, manteniendo la cromatina en un estado abierto y permitiendo que factores de transcripción actúen sobre la región promotora. Como hemos visto en apartados anteriores, la localización del sitio de inicio de transcripción es variable. Además, transcripción y splicing van intrínsecamente enlazados. Con las técnicas utilizadas no podemos resolver esta cuestión. Mediante RT-qPCR obtenemos información cuantitativa del splicing pero no del TSS. De forma inversa, las técnicas como CAGE o SAGE aportan información acerca de los TSSs pero no de las variantes de splicing.

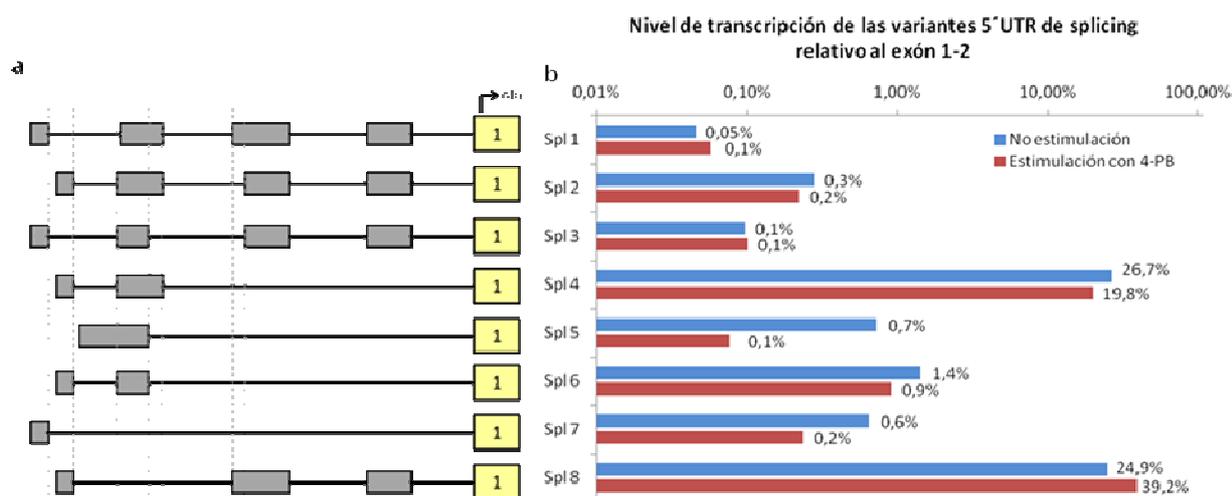


Figura 71. Efecto de la estimulación con 4-PB sobre la región 5' UTR de *CCM1* en células Jurkat T (n=3). a) Representación gráfica de las variantes de splicing (Spl1 a Spl8). b) Análisis de la expresión relativa de cada variante de splicing relativa a los exones 1-2 en ausencia (barras azules) y presencia (barras rojas) de 4-PB.

Una vez analizada la región 5' no codificante enfocamos nuestro estudio hacia los nuevos exones. La regulación positiva se observa cuando analizamos tanto los exones 1-2 como los exones 11-12. Sin embargo, los nuevos exones muestran una regulación desigual. Mientras que el exón 2a incrementa su nivel de transcripción, los exones 7a y 13L disminuyen ligeramente. Esto puede deberse a la presencia de distintas regiones promotoras. El análisis realizado con el software MPrompDB indica la posible presencia de distintos promotores, localizados en el exón 1 e intrón 2 de la región 5' no codificante, e intrones 1, 4 y 15. La observación de distintas intensidades finales en la amplificación realizada entre el exón 13L (cebador específico K13LR) y regiones 5' nos sugiere la presencia de estas regiones promotoras alternativas.

2.5. Influencia de la región 5' no codificante en la transcripción de *CCM1*

Esta mutación ha sido previamente descrita por Riant y colaboradores en dos pacientes con lesiones típicas de Cavernomatosis en MRI cerebral (Riant *et al.* 2013b). En

dicho artículo los autores proponen la ausencia del transcrito completo y ausencia de proteína. Por ello, cabría esperar que la delección de la región 5' no codificante provocara una disminución del 50% en el nivel de transcripción del gen *CCMI*. En la comparación de dos pacientes de una misma familia portadores de esta mutación frente a un grupo de siete controles sanos observamos este efecto, tanto para los exones 1-2 como exones 11-12 (figura 63; sección 3.4 Resultados). El análisis en estos pacientes de los nuevos exones detectados arroja resultados variables. Por un lado, el exón 7a parece disminuir un 50%, indicando la inclusión de este exón en transcritos con un inicio de transcripción en la región 5'UTR. El exón 2a permanece inalterado, sugiriendo TSS en región intragénica con posible región promotora en intrón 1. Por otro lado, el nivel de transcripción del exón 13L parece estar incrementado. Este hallazgo, junto con la mayor de amplificación de los exones 5-13L (frente a los exones 1-13L), nos sugiere la posible localización de una región promotora en el intrón 4, pudiendo estar activada en los portadores de la mutación en esta familia.

3. Krit1 no se expresa como proteína completa

Las consecuencias funcionales esperadas de los nuevos exones serían la introducción de un codón de parada prematuro, lo que llevaría a la producción de isoformas truncadas de Krit1. La isoforma completa debería visualizarse como una banda de 85 kDa aproximadamente. Nosotros elegimos el anticuerpo Krit1 (N-term), el cuál reconoce los aminoácidos 5 a 34, por posibilitar el reconocimiento de polipéptidos más cortos de Krit1. Además, hemos comprobados *in silico* que el anticuerpo usado no reconoce otras proteínas humanas. El análisis mediante *Western blot* en PBMC y Jurkat T ha mostrado varias bandas detectadas con el anticuerpo Krit1 (N-term). Sorprendentemente encontramos una banda principal, intensa y bien definida, con un peso aproximado de 27kDa en células Jurkat T y PBMC (figura 64; sección 3.5 Resultados). De forma muy interesante, Guzeloglu-Kayisli et al describen un banda principal de 58kDa mediante *Western blot* usando un anticuerpo dirigido frente a la región C-terminal de Krit1 (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2004). Esto nos puede sugerir que una posible proteólisis de Krit1 podría estar produciéndose. En dicho trabajo tampoco observan banda a 85kDa, o ésta es muy débil, además de un ligero bandeo.

Esta banda de 58kDa es observada en diferentes tejidos de sujetos adultos, incluyendo corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo y cerebro. La banda observada en cerebro es muy débil comparada con el resto de tejidos. Tras una revisión de la literatura no hemos encontrado evidencia de otros trabajos que utilicen tejidos humanos. Glading y colaboradores (Glading & Ginsberg 2010) informa de una banda de 80kDa (anticuerpo dirigido frente al dominio FERM) en líneas celulares previa realización de inmunoprecipitación. El resto de artículos (Gingras *et al.* 2012; Glading *et al.* 2007; Zawistowski *et al.* 2002; Zawistowski *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2001; Beraud-Dufour *et al.* 2007; Glading & Ginsberg 2010) han enfocado su estudio hacia las interacciones de Krit1 con otras proteínas, usando para ello la inserción de plásmidos en distintos tipos celulares.

Centrándonos en la banda de 27kDa detectada, estimamos que podría corresponder con un polipéptido de 235-245 aminoácidos aproximadamente. En base a esto, a nivel estructural, mantendría la secuencia NLS y dos dominios NPXY/F. Varios estudios describen las interacciones del fragmento N-terminal, correspondiente a polipéptidos de los primeros 200-258 residuos. La interacción con la proteína Icap1 α tiene lugar en el primer dominio NPXY, de forma más clara con el fragmento N-terminal que con la proteína de longitud completa (Zawistowski *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2001), aunque una menor producción de Krit1 en *E. coli* podría ser la causa. Liu y colaboradores (Liu *et al.* 2013) informan de un dominio Nudix en esta región N-terminal, presente en un grupo de hidroxilasas. Aunque no encontraron actividad con distintos sustratos, sugieren una potencial actividad enzimática de Krit1 no descrita hasta ahora. La localización celular de este polipéptido debe ser estudiada con profundidad, ya que se ha descrito que Krit1 puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma. Dos secuencias de localización nuclear han sido informadas en Krit1, una en región N-terminal y otra en C-terminal (Zawistowski *et al.* 2005). Los estudios realizados por Francalanci (Francalanci *et al.* 2009) muestran una localización citosólica de la región N-terminal, indicando que la primera secuencia NLS no es totalmente funcional en ausencia de la segunda. Además, se ha descrito dos posibles conformaciones de Krit1, abierta o cerrada, donde interaccionan las regiones C-terminal y N-terminal (Beraud-Dufour *et al.* 2007) a través del primer dominio NPXY. La proteína Icap1 α bloquearía la conformación cerrada por interacción con dicho dominio. Nuestros resultados apoyarían más una interacción directa entre ambas isoformas (Krit1-27kDa y

Krit1-58kDa) más que la adopción de una conformación abierta o cerrada de Krit1. Este modelo de dos isoformas de Krit1 sería compatible con todas las interacciones descritas hasta la fecha (figura 72).

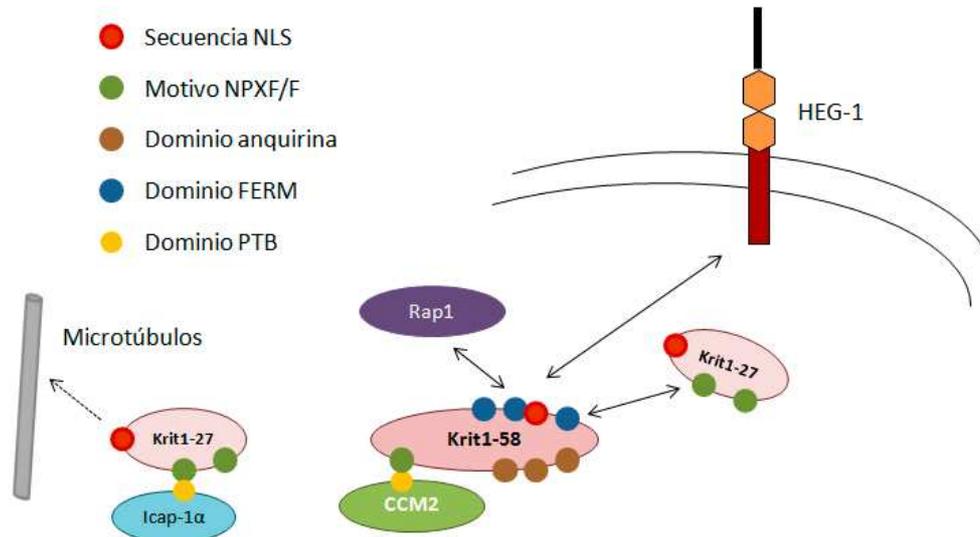


Figura 72. Modelo propuesto de interacciones basado en la evidencia de las dos isoformas (27kDa y 58kDa) producto de la proteólisis de Krit1.

En cuanto a otras bandas visualizadas, la banda de 36kDa podría corresponder al transcrito que incluya al exón 7a. Este exón introduce un codón de parada y produciría una proteína de 329 aminoácidos, manteniendo la secuencia NLS, los tres motivos NPXY/F y un dominio anquirina. La banda de 64kDa podría corresponder a un transcrito que eliminara los exones 12 a 14 ($\Delta 12-14$), el cual produciría un polipéptido de 582 aminoácidos, perdiendo sólo el dominio F2 FERM.

4. Consideraciones finales y perspectivas futuras

El diagnóstico genético de Cavernomatosis Cerebral ha venido realizándose cada vez más rápido conforme se han ido mejorando e implementado en los hospitales públicos nuevas tecnologías. La secuenciación tipo Sanger e instrumentos de electroforesis capilar siguen y seguirán siendo referentes para el análisis de pequeños genes y fragmentos. Como

ya comentamos con anterioridad, el protocolo de trabajo incluye la determinación del número de copias mediante MLPA y la secuenciación de exones codificantes y región intrónica colindante de los tres genes CCM. Sin embargo, mutaciones intrónicas más profundas pueden justificar el diagnóstico genético (Riant *et al.* 2013c). En nuestra cohorte de pacientes, el 62% de las formas familiares permanece aún sin detectar la mutación responsable. Por este motivo se debería de abordar el diagnóstico desde otro punto de vista. La secuenciación de más de 30 exones mediante Sanger deja de ser costo-efectiva comparada con la secuenciación de segunda generación o NGS. Existen soluciones para secuenciar más de un paciente mediante el uso de “*código de barras*” en la misma carrera en secuenciación NGS (como ejemplo el secuenciador Ion Torrent, Applied Biosystem). Otra opción es analizar el cDNA de los tres genes, valorando la activación de pseudoexones, conversión de exones minoritarios en mayoritarios y salto de algún exón.

En esta Tesis hemos mostrado que el gen *CCMI* es transcrito a través de múltiples sitios de inicio de transcripción mediante distintos abordajes: i) los resultados de RT-qPCR muestran un mayor nivel de transcripción de la región interna (exones 11-12) que la región codificante inicial (exones 1-2), tanto en PBMC como en células Jurkat T; ii) los niveles de transcripción del exón 2a y 13L son mayores de lo que cabría esperar de una delección de la región 5'UTR; iii) la concentración final de la amplificación de los exones 5-13L es mayor que en los exones 1-13L; y iv) las posibles regiones promotoras localizadas en los intrones 1 y 4. Aún con los datos presentados resulta bastante complejo entender qué influencia tiene cada TSS sobre el nivel de transcripción observado mediante RT-qPCR. Recientemente, un estudio transcriptómico realizado con un secuenciador de una sola molécula (conocido en inglés como *Single-Molecule Real-Time sequencing*) ha mostrado resultados similares en un gen no relacionado, *AUPI* (Sharon *et al.* 2013). En él describen TSS intragénicos, salto de exones completos, exones alargados y retención de intrones. Lo más interesante de esta tecnología es que se producen lecturas de 1500pb aproximadamente. Es por ello que nuevas metodologías aplicadas a este tipo de secuenciación podrían permitir analizar de forma cuantitativa tanto TSSs como splicings.

Por otro lado, con los resultados observados hipotetizamos que la expresión de *Krit1* puede variar en función del tejido o tipo celular en función de las variantes 5'UTR de splicing, es decir, del patrón de splicing. Tenemos que tener en cuenta que cada variante de

splicing podría tener una eficiencia traslacional distinta, por lo que el nivel de expresión podría no corresponderse al nivel de transcripción. A tenor de la menor expresión de *Krit1* observada en tejido cerebral (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2004), nos puede dar una idea de por qué las lesiones cavernomatosas se producen en territorio cerebral principalmente. Se ha observado que células endoteliales derivadas de pacientes CCM esporádicos (sin detectar mutación en línea germinal) son afectadas en mayor medida por estímulos angiogénicos (hipoxia, tratamiento con VEGF) (Zhu *et al.* 2011). Bajo condiciones de hipoxia, las células endoteliales humanas de cordón umbilical muestran modificaciones en el splicing alternativo además de cambios en la expresión génica (Hang *et al.* 2009; Weigand *et al.* 2012). Nuestro grupo observó que, en PBMC y células Jurkat T, la transcripción de *CCM1* y *CCM2* decrecía en condiciones que mimetizan con hipoxia (presencia de deferoxamina o cloruro de cobalto) (Lucas *et al.*, 2008. XX International Congress of Genetics. Berlin). El análisis de TSSs en DBTSS en otros tipos celulares, en presencia y ausencia de hipoxia, muestra una disminución en el número de TSS en el exón 1 no codificante (tabla 17). Además, el número de TSS se correlaciona con el nivel de transcripción (Tsuchihara *et al.* 2009).

Tipo celular	21% O2	1% O2	Diferencia
MCF7 (Adenocarcinoma de mama)	161	140	-13%
TIG3 (línea celular de fibroblastos de pulmón)	334	242	-28%
DLD1 (línea celular adenocarcinoma colorectal)	239	215	-10%
HEK293 (línea celular embrionaria riñón)	210	219	4%

Tabla 17. Número de TSSs (DBTSS) en el exón 1 no codificante de *CCM1*, en distintas condiciones de oxigenación.

Finalmente, sería muy interesante trasladar nuestro estudio hacia células endoteliales ya que podría desvelar de forma más precisa mecanismos fisiopatogénicos del desarrollo de la Cavernomatosis Cerebral.

Conclusiones

1. El análisis mutacional de los genes CCM ha permitido la identificación del 38% de las formas familiares y el 9% de los casos esporádicos.

2. El análisis del cDNA ha permitido evidenciar la naturaleza de mutaciones de significado incierto.

3. La realización de un análisis familiar cuando se detecta una mutación es importante para dar un consejo genético adecuado.

4. La haploinsuficiencia podría ser la base de la patogénesis de la enfermedad y podría justificar el desarrollo de lesiones cavernosas. Sin embargo, dada la penetrancia incompleta observada en algunas familias otros mecanismos podrían estar implicados.

5. El gen *CCMI* es transcrito a través de múltiples sitios repartidos por todo el gen, con una alta concentración en el exón 1 no codificante.

6. La región 5' no codificante de *CCMI* transcribe múltiples isoformas de splicing, con distinto nivel de transcripción. Además, se observa que el patrón de splicing varía entre Jurkat y PBMC.

7. La existencia de exones minoritarios en *CCMI* podría ayudar a la identificación de nuevas mutaciones patogénicas. Esto puede constituir un nuevo paradigma en la fisiopatogenia de la cavernomatosis.

8. Se ha identificado un polipéptido principal de 27kDa, producto de la posible proteólisis de Krit1.

9. La existencia de dos isoformas proteicas principales de Krit1 (27 y 58kDa) ofrece un modelo de interacciones compatible con lo descrito hasta la fecha.

10. La ausencia de mutaciones en sujetos diagnosticados clínica y radiológicamente de cavernomatosis puede deberse a distintos motivos: mutaciones intrónicas que no son detectadas mediante el protocolo de trabajo seguido en nuestro laboratorio, mutaciones en los exones minoritarios que hagan que se conviertan en mayoritarios, existencia de un cuarto gen implicado en la enfermedad.

Bibliografía

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S. & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat.Methods*, 7, 248-249.
- Awad, I. A., Robinson, J. R., Jr., Mohanty, S. & Estes, M. L. (1993). Mixed vascular malformations of the brain: clinical and pathogenetic considerations. *Neurosurgery*, 33, 179-188.
- Beraud-Dufour, S., Gautier, R., biges-Rizo, C., Chardin, P. & Faurobert, E. (2007). Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J.*, 274, 5518-5532.
- Bergametti, F., Denier, C., Labauge, P., Arnoult, M., Boetto, S., Clanet, M., Coubes, P., Echenne, B., Ibrahim, R., Irthum, B., Jacquet, G., Lonjon, M., Moreau, J. J., Neau, J. P., Parker, F., Tremoulet, M. & Tournier-Lasserre, E. (2005). Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am.J.Hum.Genet.*, 76, 42-51.
- Blitstein, M. K. & Tung, G. A. (2007). MRI of cerebral microhemorrhages. *AJR Am.J.Roentgenol.*, 189, 720-725.
- Busch, C. R., Heath, D. D. & Hubberstey, A. (2004). Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene*, 329, 1-10.
- Cave-Riant, F., Denier, C., Labauge, P., Cecillon, M., Maciazek, J., Joutel, A., Laberge-le, C. S. & Tournier-Lasserre, E. (2002). Spectrum and expression analysis of KRIT1 mutations in 121 consecutive and unrelated patients with Cerebral Cavernous Malformations. *Eur.J.Hum.Genet.*, 10, 733-740.
- Chang, D. D., Hoang, B. Q., Liu, J. & Springer, T. A. (2002). Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J.Biol.Chem.*, 277, 8140-8145.
- Ciricillo, S. F., Dillon, W. P., Fink, M. E. & Edwards, M. S. (1994). Progression of multiple cryptic vascular malformations associated with anomalous venous drainage. Case report. *J.Neurosurg.*, 81, 477-481.
- Cordonnier, C., Al-Shahi, S. R., Bhattacharya, J. J., Counsell, C. E., Papanastassiou, V., Ritchie, V., Roberts, R. C., Sellar, R. J. & Warlow, C. (2008). Differences between intracranial vascular malformation types in the characteristics of their presenting haemorrhages: prospective, population-based study. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 79, 47-51.
- Cortes Vela, J. J., Concepcion, A. L., Ballenilla, M. F., Gallego Leon, J. I. & Gonzalez-Spinola San, G. J. (2012). Cerebral cavernous malformations: spectrum of neuroradiological findings. *Radiologia.*, 54, 401-409.

- Costa AF. Genética Molecular de la Cavernomatosis Cerebral Familiar. Tesis Doctoral realizada en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, 2003.
- Craig, H. D., Gunel, M., Cepeda, O., Johnson, E. W., Ptacek, L., Steinberg, G. K., Ogilvy, C. S., Berg, M. J., Crawford, S. C., Scott, R. M., Steichen-Gersdorf, E., Sabroe, R., Kennedy, C. T., Mettler, G., Beis, M. J., Fryer, A., Awad, I. A. & Lifton, R. P. (1998). Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum.Mol.Genet.*, 7, 1851-1858.
- D'Angelo, R., Marini, V., Rinaldi, C., Origone, P., Dorcaratto, A., Avolio, M., Goitre, L., Forni, M., Capra, V., Alafaci, C., Mareni, C., Garre, C., Bramanti, P., Sidoti, A., Retta, S. F. & Amato, A. (2011). Mutation analysis of CCM1, CCM2 and CCM3 genes in a cohort of Italian patients with cerebral cavernous malformation. *Brain Pathol.*, 21, 215-224.
- D'Angelo, R., Scimone, C., Rinaldi, C., Trimarchi, G., Italiano, D., Bramanti, P., Amato, A. & Sidoti, A. (2012). CCM2 gene polymorphisms in Italian sporadic patients with cerebral cavernous malformation: a case-control study. *Int.J.Mol.Med.*, 29, 1113-1120.
- de, H. M. & Hayashizaki, Y. (2008). Deep cap analysis gene expression (CAGE): genome-wide identification of promoters, quantification of their expression, and network inference. *Biotechniques*, 44, 627-8, 630, 632.
- Del, C. O., Jr., Kelly, D. L., Jr., Elster, A. D. & Craven, T. E. (1991). An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *J.Neurosurg.*, 75, 702-708.
- Denier, C., Goutagny, S., Labauge, P., Krivosic, V., Arnoult, M., Cousin, A., Benabid, A. L., Comoy, J., Frerebeau, P., Gilbert, B., Houtteville, J. P., Jan, M., Lapierre, F., Loiseau, H., Menei, P., Mercier, P., Moreau, J. J., Nivelon-Chevallier, A., Parker, F., Redondo, A. M., Scarabin, J. M., Tremoulet, M., Zerah, M., Maciazek, J. & Tournier-Lasserre, E. (2004). Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am.J.Hum.Genet.*, 74, 326-337.
- Denier, C., Labauge, P., Bergametti, F., Marchelli, F., Riant, F., Arnoult, M., Maciazek, J., Vicaut, E., Brunereau, L. & Tournier-Lasserre, E. (2006). Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann.Neurol.*, 60, 550-556.
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M. & Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.*, 37, e67.
- Ding, J., Wang, X., Li, D. F., Hu, Y., Zhang, Y. & Wang, D. C. (2010). Crystal structure of human programmed cell death 10 complexed with inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate: a novel adaptor protein involved in human cerebral cavernous malformation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 399, 587-592.

- Dubovsky, J., Zabramski, J. M., Kurth, J., Spetzler, R. F., Rich, S. S., Orr, H. T. & Weber, J. L. (1995). A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum.Mol.Genet.*, 4, 453-458.
- Durrant, I., Benge, L. C., Sturrock, C., Devenish, A. T., Howe, R., Roe, S., Moore, M., Scozzafava, G., Proudfoot, L. M., Richardson, T. C. & . (1990). The application of enhanced chemiluminescence to membrane-based nucleic acid detection. *Biotechniques*, 8, 564-570.
- Eerola, I., McIntyre, B. & Vikkula, M. (2001). Identification of eight novel 5'-exons in cerebral capillary malformation gene-1 (CCM1) encoding KRIT1. *Biochim.Biophys.Acta*, 1517, 464-467.
- Faurobert, E. & biges-Rizo, C. (2010). Recent insights into cerebral cavernous malformations: a complex jigsaw puzzle under construction. *FEBS J.*, 277, 1084-1096.
- Felbor, U., Gaetzner, S., Verlaan, D. J., Vijzelaar, R., Rouleau, G. A. & Siegel, A. M. (2007). Large germline deletions and duplication in isolated cerebral cavernous malformation patients. *Neurogenetics.*, 8, 149-153.
- Francalanci, F., Avolio, M., De, L. E., Longo, D., Menchise, V., Guazzi, P., Sgro, F., Marino, M., Goitre, L., Balzac, F., Trabalzini, L. & Retta, S. F. (2009). Structural and functional differences between KRIT1A and KRIT1B isoforms: a framework for understanding CCM pathogenesis. *Exp.Cell Res.*, 315, 285-303.
- Gaetzner, S., Stahl, S., Surucu, O., Schaafhausen, A., Halliger-Keller, B., Bertalanffy, H., Sure, U. & Felbor, U. (2007). CCM1 gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurg.Rev.*, 30, 155-159.
- Garcia-Morales, I., Gomez-Escalonilla, C., Galan, L., Rodriguez, R., Simon De Las, H. R. & Mateos-Beato, F. (2002). [Cerebral cavernomas in childhood. clinical presentation and diagnosis]. *Rev.Neurol.*, 34, 339-342.
- Gingras, A. R., Liu, J. J. & Ginsberg, M. H. (2012). Structural basis of the junctional anchorage of the cerebral cavernous malformations complex. *J.Cell Biol.*, 199, 39-48.
- Glading, A., Han, J., Stockton, R. A. & Ginsberg, M. H. (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J.Cell Biol.*, 179, 247-254.
- Glading, A. J. & Ginsberg, M. H. (2010). Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling. *Dis.Model.Mech.*, 3, 73-83.
- Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B. & Gingras, A. C. (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol.Cell Proteomics.*, 8, 157-171.

- Guazzi, P., Goitre, L., Ferro, E., Cutano, V., Martino, C., Trabalzini, L. & Retta, S. F. (2012). Identification of the Kelch family protein Nd1-L as a novel molecular interactor of KRIT1. *PLoS.One.*, 7, e44705.
- Gunel, M., Awad, I. A., Finberg, K., Steinberg, G. K., Craig, H. D., Cepeda, O., Nelson-Williams, C. & Lifton, R. P. (1996). Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery*, 38, 1265-1271.
- Gunel, M., Laurans, M. S., Shin, D., DiLuna, M. L., Voorhees, J., Choate, K., Nelson-Williams, C. & Lifton, R. P. (2002). KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 10677-10682.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Amankulor, N. M., Voorhees, J., Luleci, G., Lifton, R. P. & Gunel, M. (2004). KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery*, 54, 943-949.
- Hang, X., Li, P., Li, Z., Qu, W., Yu, Y., Li, H., Shen, Z., Zheng, H., Gao, Y., Wu, Y., Deng, M., Sun, Z. & Zhang, C. (2009). Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. *BMC.Genomics*, 10, 126.
- Harel, L., Costa, B., Tcherpakov, M., Zapatka, M., Oberthuer, A., Hansford, L. M., Vojvodic, M., Levy, Z., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Avigad, S., Yaniv, I., Shi, L., Eils, R., Fischer, M., Brors, B., Kaplan, D. R. & Fainzilber, M. (2009). CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase. *Neuron*, 63, 585-591.
- Hashimoto, S., Suzuki, Y., Kasai, Y., Morohoshi, K., Yamada, T., Sese, J., Morishita, S., Sugano, S. & Matsushima, K. (2004). 5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites. *Nat.Biotechnol.*, 22, 1146-1149.
- Hilder, T. L., Malone, M. H., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, T. A., Johnson, G. L. & Wu, C. C. (2007). Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J.Proteome.Res.*, 6, 4343-4355.
- Hughes, T. A. (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet.*, 22, 119-122.
- Iza-Vallejo, B., Mateo-Sierra, O., Mosqueira-Centurion, B., Ruiz-Juretschke, F. & Carrillo, R. (2005). [Cerebral cavernomas. A review and update of aetiological, clinical and therapeutic features]. *Rev.Neurol.*, 41, 725-732.
- Johnson, E. W., Iyer, L. M., Rich, S. S., Orr, H. T., Gil-Nagel, A., Kurth, J. H., Zabramski, J. M., Marchuk, D. A., Weissenbach, J., Clericuzio, C. L., Davis, L. E., Hart, B. L., Gusella, J. F., Kosofsky, B. E., Louis, D. N., Morrison, L. A., Green, E. D. & Weber, J. L. (1995). Refined localization of the cerebral cavernous malformation gene (CCM1) to a 4-cM interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. *Genome Res.*, 5, 368-380.

- Kehrer-Sawatzki, H., Wilda, M., Braun, V. M., Richter, H. P. & Hameister, H. (2002). Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathol.*, 104, 231-240.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M. & Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. *Gene*, 514, 1-30.
- Kim, J., Sherman, N. E., Fox, J. W. & Ginsberg, M. H. (2011). Phosphorylation sites in the cerebral cavernous malformations complex. *J.Cell Sci.*, 124, 3929-3932.
- Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., Ishii, S., Sugiyama, T., Saito, K., Isono, Y., Irie, R., Kushida, N., Yoneyama, T., Otsuka, R., Kanda, K., Yokoi, T., Kondo, H., Wagatsuma, M., Murakawa, K., Ishida, S., Ishibashi, T., Takahashi-Fujii, A., Tanase, T., Nagai, K., Kikuchi, H., Nakai, K., Isogai, T. & Sugano, S. (2006). Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.*, 16, 55-65.
- Kornblihtt, A. R. (2007). Coupling transcription and alternative splicing. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 623, 175-189.
- Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat.Protoc.*, 4, 1073-1081.
- Labauge, P., Denier, C., Bergametti, F. & Tournier-Lasserre, E. (2007). Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol.*, 6, 237-244.
- Labauge, P., Laberge, S., Brunereau, L., Levy, C. & Tournier-Lasserre, E. (1998). Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Societe Francaise de Neurochirurgie. Lancet*, 352, 1892-1897.
- Laberge-le, C. S., Jung, H. H., Labauge, P., Houtteville, J. P., Lescoat, C., Cecillon, M., Marechal, E., Joutel, A., Bach, J. F. & Tournier-Lasserre, E. (1999). Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat.Genet.*, 23, 189-193.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Li, X., Zhang, R., Zhang, H., He, Y., Ji, W., Min, W. & Boggon, T. J. (2010). Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. *J.Biol.Chem.*, 285, 24099-24107.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Siegel, A. M., Huang, E., Zawistowski, J. S., Stoffer, T., Verlaan, D., Balogun, F., Hughes, L., Leedom, T. P., Plummer, N. W., Cannella, M., Maglione, V., Squitieri, F., Johnson, E. W., Rouleau, G. A., Ptacek, L. & Marchuk, D. A. (2003). Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-

- binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am.J.Hum.Genet.*, 73, 1459-1464.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Squitieri, F., Leedom, T. P., Ptacek, L., Johnson, E. W. & Marchuk, D. A. (2007). Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am.J.Hum.Genet.*, 80, 69-75.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Squitieri, F., Ottenbacher, M., Sorlie, M., Leedom, T. P., Cannella, M., Maglione, V., Ptacek, L., Johnson, E. W. & Marchuk, D. A. (2006). Low frequency of PDCD10 mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum.Mutat.*, 27, 118.
- Liu, W., Draheim, K. M., Zhang, R., Calderwood, D. A. & Boggon, T. J. (2013). Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Mol.Cell*, 49, 719-729.
- Liu, Y., Ren, S., Castellanos-Martin, A., Perez-Losada, J., Kwon, Y. W., Huang, Y., Wang, Z., Abad, M., Cruz-Hernandez, J. J., Rodriguez, C. A., Sun, Y. & Mao, J. H. (2012). Multiple novel alternative splicing forms of FBXW7alpha have a translational modulatory function and show specific alteration in human cancer. *PLoS.One.*, 7, e49453.
- Lobato, R. D., Perez, C., Rivas, J. J. & Cordobes, F. (1988). Clinical, radiological, and pathological spectrum of angiographically occult intracranial vascular malformations. Analysis of 21 cases and review of the literature. *J.Neurosurg.*, 68, 518-531.
- Lucas, M., Costa, A. F., Montori, M., Solano, F., Zayas, M. D. & Izquierdo, G. (2001). Germline mutations in the CCM1 gene, encoding Krit1, cause cerebral cavernous malformations. *Ann.Neurol.*, 49, 529-532.
- Lucas, M., Solano, F., Zayas, M. D., Garcia-Moreno, J. M., Gamero, M. A., Costa, A. F. & Izquierdo, G. (2000). Spanish families with cerebral cavernous angioma do not bear 742C-->T Hispanic American mutation of the KRIT1 gene. *Ann.Neurol.*, 47, 836.
- Maddaluno, L., Rudini, N., Cuttano, R., Bravi, L., Giampietro, C., Corada, M., Ferrarini, L., Orsenigo, F., Papa, E., Boulday, G., Tournier-Lasserre, E., Chapon, F., Richichi, C., Retta, S. F., Lampugnani, M. G. & Dejana, E. (2013). EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature*, 498, 492-496.
- Modrek, B. & Lee, C. J. (2003). Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat.Genet.*, 34, 177-180.
- Nussbaum, E. S. (2013). Vascular malformations of the brain. *Minn.Med.*, 96, 40-43.
- Ortíz L. Estudio molecular de los genes de la Cavernomatosis Cerebral. Tesis Doctoral realizada en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, 2006.

- Ortiz, L., Costa, A. F., Bellido, M. L., Solano, F., Garcia-Moreno, J. M., Gamero, M. A., Izquierdo, G., Chadli, A., Falcao, F., Ferro, J., Salas, J., varez-Cermeno, J. C., Montori, M., Ramos-Arroyo, M. A., Palomino, A., Pintado, E. & Lucas, M. (2007). Study of cerebral cavernous malformation in Spain and Portugal: high prevalence of a 14 bp deletion in exon 5 of MGC4607 (CCM2 gene). *J.Neurol.*, 254, 322-326.
- Pagani, F. & Baralle, F. E. (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat.Rev.Genet.*, 5, 389-396.
- Petit, N., Blecon, A., Denier, C. & Tournier-Lasserre, E. (2006). Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr.Patterns.*, 6, 495-503.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29, e45.
- Regadas, I., Matos, M. R., Monteiro, F. A., Gomez-Skarmeta, J. L., Lima, D., Bessa, J., Casares, F. & Reguenga, C. (2013). Several Cis-regulatory Elements Control mRNA Stability, Translation Efficiency, and Expression Pattern of Prrxl1 (Paired Related Homeobox Protein-like 1). *J.Biol.Chem.*, 288, 36285-36301.
- Resch, A. M., Ogurtsov, A. Y., Rogozin, I. B., Shabalina, S. A. & Koonin, E. V. (2009). Evolution of alternative and constitutive regions of mammalian 5'UTRs. *BMC.Genomics*, 10, 162.
- Retta, S. F., Avolio, M., Francalanci, F., Procida, S., Balzac, F., Degani, S., Tarone, G. & Silengo, L. (2004). Identification of Krit1B: a novel alternative splicing isoform of cerebral cavernous malformation gene-1. *Gene*, 325, 63-78.
- Revenu, N. & Vikkula, M. (2006). Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J.Med.Genet.*, 43, 716-721.
- Riant, F., Bergametti, F., Fournier, H. D., Chapon, F., Michalak-Provost, S., Cecillon, M., Lejeune, P., Hosseini, H., Choe, C., Orth, M., Bernreuther, C., Bouday, G., Denier, C., Labauge, P. & Tournier-Lasserre, E. (2013a). CCM3 Mutations Are Associated with Early-Onset Cerebral Hemorrhage and Multiple Meningiomas. *Mol.Syndromol.*, 4, 165-172.
- Riant, F., Cecillon, M., Saugier-veber, P. & Tournier-Lasserre, E. (2013b). CCM molecular screening in a diagnosis context: novel unclassified variants leading to abnormal splicing and importance of large deletions. *Neurogenetics.*, 14, 133-141.
- Riant, F., Odent, S., Cecillon, M., Pasquier, L., de, B. C., Carney, M. P. & Tournier-Lasserre, E. (2013c). Deep intronic KRIT1 mutation in a family with clinically silent multiple cerebral cavernous malformations. *Clin.Genet.*
- Rigamonti, D., Johnson, P. C., Spetzler, R. F., Hadley, M. N. & Drayer, B. P. (1991). Cavernous malformations and capillary telangiectasia: a spectrum within a single pathological entity. *Neurosurgery*, 28, 60-64.

- Rigamonti, D., Spetzler, R. F., Medina, M., Rigamonti, K., Geckle, D. S. & Pappas, C. (1990). Cerebral venous malformations. *J.Neurosurg.*, 73, 560-564.
- Rio, F. T., McGee, T. L., Wade, N. M., Iseli, C., Beckmann, J. S., Berson, E. L. & Rivolta, C. (2009). A single-base substitution within an intronic repetitive element causes dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance. *Hum.Mutat.*, 30, 1340-1347.
- Robinson, J. R., Awad, I. A. & Little, J. R. (1991). Natural history of the cavernous angioma. *J.Neurosurg.*, 75, 709-714.
- Sahoo, T., Goenaga-Diaz, E., Serebriiskii, I. G., Thomas, J. W., Kotova, E., Cuellar, J. G., Peloquin, J. M., Golemis, E., Beitinjaneh, F., Green, E. D., Johnson, E. W. & Marchuk, D. A. (2001). Computational and experimental analyses reveal previously undetected coding exons of the KRIT1 (CCM1) gene. *Genomics*, 71, 123-126.
- Sahoo, T., Johnson, E. W., Thomas, J. W., Kuehl, P. M., Jones, T. L., Dokken, C. G., Touchman, J. W., Gallione, C. J., Lee-Lin, S. Q., Kosofsky, B., Kurth, J. H., Louis, D. N., Mettler, G., Morrison, L., Gil-Nagel, A., Rich, S. S., Zabramski, J. M., Boguski, M. S., Green, E. D. & Marchuk, D. A. (1999). Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum.Mol.Genet.*, 8, 2325-2333.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 74, 5463-5467.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Sonoda, G., Testa, J. R. & Golemis, E. A. (1997). Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*, 15, 1043-1049.
- Sharon, D., Tilgner, H., Grubert, F. & Snyder, M. (2013). A single-molecule long-read survey of the human transcriptome. *Nat.Biotechnol.*, 31, 1009-1014.
- Sironi, M., Menozzi, G., Riva, L., Cagliani, R., Comi, G. P., Bresolin, N., Giorda, R. & Pozzoli, U. (2004). Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1783-1791.
- Smale, S. T. & Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu.Rev.Biochem.*, 72, 449-479.
- Stahl, S., Gaetzner, S., Voss, K., Brackertz, B., Schleider, E., Surucu, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U., Habek, M., Poljakovic, Z., Elbracht, M., Rudnik-Schoneborn, S., Bertalanffy, H., Sure, U. & Felbor, U. (2008). Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Hum.Mutat.*, 29, 709-717.
- Stockton, R. A., Shenkar, R., Awad, I. A. & Ginsberg, M. H. (2010). Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J.Exp.Med.*, 207, 881-896.

- Suzuki, Y., Taira, H., Tsunoda, T., Mizushima-Sugano, J., Sese, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Morishita, S., Okubo, K., Sakaki, Y., Nakamura, Y., Suyama, A. & Sugano, S. (2001). Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO Rep.*, 2, 388-393.
- Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A. & Sugano, S. (1997). Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene*, 200, 149-156.
- Svenson, I. K., Shley-Koch, A. E., Pericak-Vance, M. A. & Marchuk, D. A. (2001). A second leaky splice-site mutation in the spastin gene. *Am.J.Hum.Genet.*, 69, 1407-1409.
- Teraoka, S. N., Telatar, M., Becker-Catania, S., Liang, T., Onengut, S., Tolun, A., Chessa, L., Sanal, O., Bernatowska, E., Gatti, R. A. & Concannon, P. (1999). Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am.J.Hum.Genet.*, 64, 1617-1631.
- Tonelli, A., Lanfranconi, S., Bersano, A., Corti, S., Bassi, M. T. & Bresolin, N. (2009). Aberrant splicing due to a silent nucleotide change in CCM2 gene in a family with cerebral cavernous malformation. *Clin.Genet.*, 75, 494-497.
- Tsuchihara, K., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Irie, T., Tanimoto, K., Hashimoto, S., Matsushima, K., Mizushima-Sugano, J., Yamashita, R., Nakai, K., Bentley, D., Esumi, H. & Sugano, S. (2009). Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res.*, 37, 2249-2263.
- Uhlik, M. T., Abell, A. N., Johnson, N. L., Sun, W., Cuevas, B. D., Lobel-Rice, K. E., Horne, E. A., Dell'Acqua, M. L. & Johnson, G. L. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat.Cell Biol.*, 5, 1104-1110.
- Vaissiere, T., Sawan, C. & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat.Res.*, 659, 40-48.
- Vaquero, J., Salazar, J., Martinez, R., Martinez, P. & Bravo, G. (1987). Cavernomas of the central nervous system: clinical syndromes, CT scan diagnosis, and prognosis after surgical treatment in 25 cases. *Acta Neurochir.(Wien.)*, 85, 29-33.
- Verlaan, D. J., Laurent, S. B., Rochefort, D. L., Liquori, C. L., Marchuk, D. A., Siegel, A. M. & Rouleau, G. A. (2004). CCM2 mutations account for 13% of cases in a large collection of kindreds with hereditary cavernous malformations. *Ann.Neurol.*, 55, 757-758.
- Verlaan, D. J., Siegel, A. M. & Rouleau, G. A. (2002). Krit1 missense mutations lead to splicing errors in cerebral cavernous malformation. *Am.J.Hum.Genet.*, 70, 1564-1567.
- Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T. D. & Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics.*, 8, 249-256.

- Vreeswijk, M. P. & van der Klift, H. M. (2012). Analysis and interpretation of RNA splicing alterations in genes involved in genetic disorders. *Methods Mol.Biol.*, 867, 49-63.
- Wang, G., Guo, X. & Floros, J. (2005). Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 289, L497-L508.
- Wang, Y., Liu, H., Zhang, Y. & Ma, D. (1999). cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, humanTFAR15 gene. *Sci.China C.Life Sci.*, 42, 323-329.
- Wang, Z., Rolish, M. E., Yeo, G., Tung, V., Mawson, M. & Burge, C. B. (2004). Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell*, 119, 831-845.
- Weigand, J. E., Boeckel, J. N., Gellert, P. & Dimmeler, S. (2012). Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS.One.*, 7, e42697.
- Whitehead, K. J., Chan, A. C., Navankasattusas, S., Koh, W., London, N. R., Ling, J., Mayo, A. H., Drakos, S. G., Jones, C. A., Zhu, W., Marchuk, D. A., Davis, G. E. & Li, D. Y. (2009). The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat.Med.*, 15, 177-184.
- Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. & Thorpe, G. H. (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin.Chem.*, 25, 1531-1546.
- Wimmer, K., Eckart, M., Rehder, H. & Fonatsch, C. (2000). Illegitimate splicing of the NF1 gene in healthy individuals mimics mutation-induced splicing alterations in NF1 patients. *Hum.Genet.*, 106, 311-313.
- Wurm, G., Schnizer, M. & Fellner, F. A. (2005). Cerebral cavernous malformations associated with venous anomalies: surgical considerations. *Neurosurgery*, 57, 42-58.
- Yamashita, R., Sathira, N. P., Kanai, A., Tanimoto, K., Arauchi, T., Tanaka, Y., Hashimoto, S., Sugano, S., Nakai, K. & Suzuki, Y. (2011). Genome-wide characterization of transcriptional start sites in humans by integrative transcriptome analysis. *Genome Res.*, 21, 775-789.
- Yeo, G. & Burge, C. B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J.Comput.Biol.*, 11, 377-394.
- Zabramski, J. M., Henn, J. S. & Coons, S. (1999). Pathology of cerebral vascular malformations. *Neurosurg.Clin.N.Am.*, 10, 395-410.
- Zabramski, J. M., Wascher, T. M., Spetzler, R. F., Johnson, B., Golfinos, J., Drayer, B. P., Brown, B., Rigamonti, D. & Brown, G. (1994). The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. *J.Neurosurg.*, 80, 422-432.
- Zawistowski, J. S., Serebriiskii, I. G., Lee, M. F., Golemis, E. A. & Marchuk, D. A. (2002). KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the

- elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum.Mol.Genet.*, 11, 389-396.
- Zawistowski, J. S., Stalheim, L., Uhlik, M. T., Abell, A. N., Ancrile, B. B., Johnson, G. L. & Marchuk, D. A. (2005). CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum.Mol.Genet.*, 14, 2521-2531.
- Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D. & Dietz, H. C. (2001). Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum.Mol.Genet.*, 10, 2953-2960.
- Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D. & Dietz, H. C. (2000). Cloning of the murine Krit1 cDNA reveals novel mammalian 5' coding exons. *Genomics*, 70, 392-395.
- Zhang, P., Liu, L., Cao, Y., Wang, S. & Zhao, J. (2013). Cerebellar cavernous malformations with and without associated developmental venous anomalies. *BMC.Neurol.*, 13, 134.
- Zhang, X. H. & Chasin, L. A. (2004). Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev.*, 18, 1241-1250.
- Zhu, Y., Wu, Q., Fass, M., Xu, J. F., You, C., Muller, O., Sandalcioglu, I. E., Zhang, J. M. & Sure, U. (2011). In vitro characterization of the angiogenic phenotype and genotype of the endothelia derived from sporadic cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery*, 69, 722-731.