

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 322**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2000 E 00948072 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1196638**

54 Título: **Utilización del gen KRIT1 en el campo de la angiogénesis**

30 Prioridad:

01.07.1999 FR 9908504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.04.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**TOURNIER-LASSERVE ELISABETH;
LABERGE-LE-COUTEULX, SOPHIE y
LABAUGE, PIERRE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 456 322 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización del gen *KRIT1* en el campo de la angiogénesis.

- 5 La presente invención tiene por objeto un método de diagnóstico de los angiomas cavernosos o cavernomas para la detección de mutaciones en el gen *Krit1*. En particular, esta detección se lleva a cabo por medio de secuencias nucleotídicas tales como las definidas en la reivindicación 8.

10 Los cavernomas son unas malformaciones vasculares localizados frecuentemente en el sistema nervioso central, pero también en la retina, el hígado, los riñones, etc. y están caracterizados porque presentan unas cavidades capilares anormalmente agrandadas sin intervención de parénquima cerebral (Russell *et al.*). Los síntomas clínicos incluyen cefaleas, hemorragias, crisis de epilepsia y deficiencias neurológicas focales. La prevalencia de los angiomas cavernosos es casi del 0,5% en la población general (Otten *et al.*). Estos angiomas pueden ser transmitidos de manera hereditaria en una forma autosómica dominante en cerca del 50% de los casos (Rigamonti *et al.*). Se han identificado 3 localizaciones (o loci) de malformaciones cavernosas cerebrales (CCM) sobre el brazo largo del cromosoma 7, el brazo corto del cromosoma 7 y el brazo largo del cromosoma 3 (7q, 7p y 3q respectivamente). Se observó un importante efecto fundador en la población hispano-americana, en la que todas las familias estaban unidas al locus *CCM1* localizado en 7q (Rigamonti *et al.*; Dubovsky *et al.*; Günel *et al.*; y Craig *et al.*).

20 Laberge *et al.*, 1998, (Eur. J. Hum. Gen., vol. 6/supl. 1, p. 146, P4.167) muestra que el locus *CCM1*, que comprende los genes *CDK1*, *PAS1*, *HUMLD14* y *KRIT1*, está asociado a la presencia de cavernomas.

25 Los inventores han establecido recientemente las características genéticas y clínicas de los cavernomas, así como las características hereditarias en una serie de 57 familias francesas (Labauge *et al.*). Unas investigaciones de formación de neuroimágenes han confirmado la gran frecuencia de lesiones múltiples en los cavernomas hereditarios. Asimismo, se puso en evidencia una correlación altamente significativa entre el número de lesiones y la edad del paciente, lo cual sugiere en gran medida la naturaleza dinámica de estas malformaciones vasculares denominadas también hamartomas. El análisis de unión llevado a cabo en 36 de estas familias ha mostrado que el 65% de ellas estaba relacionado al locus *CCM1* sin ningún efecto fundador (Laberge *et al.*).

35 El tamaño del intervalo genético que contiene el locus *CCM1* se redujo en 1995 a 4 centimorgans, estando el locus *CCM1* encuadrado por *D7S2410* y *D7S689* (Johnson *et al.*). Mediante un enfoque *in silico* esencialmente, los inventores han establecido un mapa físico y transcripcional del intervalo de *CCM1*. Entre las 53 unidades transcripcionales cartografiadas en el interior de la región crítica, una de ellas correspondía a *Krit1*, un gen cuyo producto interactúa con *Rap1A* (también denominado *Krev1*), un miembro de la familia de los genes *Ras* implicados en la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis (Bos *et al.*). Utilizando en combinación la técnica SSCP y la secuenciación, los inventores han identificado en 8 familias *CCM1* no emparentadas unas mutaciones que conducen muy probablemente a una proteína *Krit1* truncada. La cosegregación de estas mutaciones con el fenotipo afectado sugiere en gran medida que *Krit1* es la proteína mutada en las familias que padecen cavernomas relacionados con el locus *CCM1* y sugiere la implicación de la vía de transducción de la señal de *Rap1A* en la vasculogénesis y/o la angiogénesis.

45 Utilizando un contig de YAG previamente publicado, y las bases de datos de secuencias públicas (The Washington University Chromosome 7 Project), los inventores han construido unos contigs de BAC/PAC que cubren el 90% del intervalo *CCM1*, estimado en 1600 kb (figura 1). Se han utilizado 20 familias que comprenden 179 meiosis potencialmente informativas y de las que se había mostrado anteriormente que tenían una probabilidad *a posteriori* de estar relacionadas con el locus *CCM1* superior al 90% para cartografiar finalmente este locus con unos marcadores polimorfos identificados por medio de las secuencias BAC/PAC (figura 1). Un acontecimiento de recombinación observado en un individuo afectado (familia 27 en Labauge *et al.*) ha permitido a los inventores reducir ligeramente este intervalo, que está ahora encuadrado por *M2456* (límite centromérico) y *D7S689* (límite telomérico). El cribado de bancos de datos públicos, tales como Gene Map del Human Genome, Unigene y dBEST ha permitido a los inventores cartografiar en el interior de este intervalo 574 *Expressed Sequence Tags* (EST) que después se agruparon en 53 unidades transcripcionales putativas que comprenden 6 genes ya conocidos: *CDK6*, *HUMI.D14*, *KRIT1*, *PEX-1*, *mMTERF* y *Yotiao*.

60 *Krit1* se identificó durante un cribado destinado a identificar las proteínas que interactúan con *Rap1A/Krev1*, un miembro de la familia de los genes *Ras* (Serebriiski *et al.*). Codifica para una proteína de 529 aminoácidos que comprende 4 dominios anquirinas e interactúa con *Rap1A/Krev1* mediante su región carboxiterminal. Ya se ha indicado que el ARN mensajero de *Krit1* estaba expresado a niveles bajos en numerosos tejidos, incluyendo el cerebro. Aunque la función exacta de *Krit1* sea todavía desconocida, los inventores han considerado que era un buen gen candidato para *CCM1*, y esto por varias razones. *Rap1A/Krev1A* se ha identificado en base a su homología con *Dras3*, un homólogo de *Ras* en la drosófila, así como en base a su actividad anti-mitógena en unos fibroblastos transformados por *K-ras* (Pizon *et al.*, 1988/Kitayama *et al.*, 1989). Aunque la pertinencia fisiológica de este efecto anti-mitógeno observado *in vitro* no se haya establecido aún *in vivo*, esto ha llevado a considerar que esta proteína era un antagonista de *Ras*. Una función de la vía de señalización de *Ras* en la vasculogénesis y la

angiogénesis ha sido sugerida en gran medida por las anomalías vasculares observadas en los modelos murinos invalidados para las proteínas implicadas en esta vía, por ejemplo las proteínas raf o GAP120 (Henkemeyer *et al.*, 1995; Wojnowski *et al.*, 1997). Además de este papel putativo como antagonista de Ras, Rap1A/Krev1 se implicó en la diferenciación celular y la morfogénesis (Asha *et al.*, 1999; Quarck *et al.*, 1996; Pizon *et al.*, 1988).

En otras palabras, en la medida en que la proteína Krit1 truncada da lugar a una anomalía de la angiogénesis que se acompaña de una proliferación de las células endoteliales, es razonable deducir que el gen *Krit1* podría tener un papel de control de la angiogénesis.

Así, en el marco de la presente invención, los inventores han demostrado que unas mutaciones en el gen *Krit1*, susceptibles de dar lugar a una proteína Krit1 truncada son responsables de la aparición de anomalías vasculares. Estas anomalías vasculares pueden afectar a diferentes territorios, que incluyen el cerebro y la piel, y adoptar diferentes formas (carvenomas, agiomas capilar-venosos). El tipo de lesiones observadas (desarrollo de enfermedades vasculares anormales combinado con la naturaleza de las mutaciones observadas (mutaciones que conllevan un truncado de la proteína) sugieren en gran medida que esta proteína ejerce un control de la angiogénesis que podría ser susceptible de aplicaciones terapéuticas en el campo de la antiangiogénesis, en particular en el campo tumoral.

La alineación del ADNc de *Krit1* con el BAC AC000020, uno de los BAC localizado en el intervalo, ha permitido a los inventores determinar la estructura genómica de *Krit1*. Este gen está codificado por 12 exones que están todos comprendidos en el BAC AC000020. Los inventores han diseñado los cebadores oligonucleotídicos intrónicos destinados a amplificar los exones (tabla nº 1) así como las secuencias de unión (tabla nº 2). Estos cebadores han sido particularmente delicados de elaborar debido a la riqueza en bases A y T de *Krit1* y porque son muy específicos de *Krit1*. Así, se describen en la presente memoria los cebadores de secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27, SEC ID nº 28.

Mediante estos cebadores, los inventores han podido amplificar todos los exones. Un conjunto de 20 pacientes CCM no emparentados, que pertenecen a unas familias en las que el análisis HOMOG ha mostrado una probabilidad *a posteriori* para estar relacionadas con el locus *CCM1* superior al 90%, ha permitido proceder a unos cribados de mutaciones por un análisis que combina un enfoque de tipo Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), en 4 condiciones distintas, y un enfoque de secuenciación.

Los productos amplificados de 8 de estos pacientes han mostrado unas variantes de conformación anormales que no se han observado en ninguno de los 50 sujetos control. El análisis de la secuencia de estos amplímeros reveló unas mutaciones heterocigóticas en estos 8 pacientes (Tabla 3 y Figura 3). Estas mutaciones cosegregaban con el fenotipo enfermo en las 8 familias de estos pacientes.

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de por lo menos una secuencia nucleotídica tal como se ha definido anteriormente para la detección, a partir de una extracción biológica, de la presencia de una mutación en el gen *Krit1* susceptible de conducir a una proteína Krit1 truncada, preferentemente una mutación relacionada con la aparición de anomalías vasculares tales como las definidas anteriormente. De manera preferida, la extracción biológica es sangre.

Más particularmente, la genealogía 6 presenta una delección de una A en el nucleótido 1342, en el exón 10. Esta delección conduce a un cambio del marco de lectura y así a un codón stop prematuro. En la genealogía 10, una sustitución de C por T en el nucleótido 1283 en el exón 10 lleva a la sustitución de una glutamina por un codón stop. La genealogía 58 muestra en su caso la inserción de una C después del nucleótido 1271, también en el exón 10, lo cual conlleva un cambio del marco de lectura y un codón stop prematuro. La genealogía 41 muestra una sustitución de G por A en el nucleótido 615, lo que lleva a la sustitución de un triptófano por un codón stop prematuro en el exón 5. La genealogía 42 presenta una delección de 4 pb (nucleótidos 681-684) en el exón 6 dando lugar a un codón stop prematuro. La genealogía 35 presenta una delección de 26 pb (nucleótidos 1012-1037) en el interior del exón 8; causando esta delección un cambio del marco de lectura y un codón stop prematuro en el codón 332. La genealogía 18 presenta una inserción de una C en el interior del exón 2 después del nucleótido 247; esta inserción lleva a un cambio del marco de lectura y a un codón stop prematuro. La genealogía 19 muestra una sustitución de una G por una A en el nucleótido 261; esta conlleva un cambio del marco de lectura así como un codón stop prematuro en el codón 79.

Los análisis SSCP de los miembros afectados y no afectados han mostrado la cosegregación perfecta de las mutaciones con el fenotipo afectado en cada una de estas 8 genealogías (figura 3).

Así, las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la presente invención se utilizan para proceder a la detección de una mutación en por lo menos un exón del gen *Krit1* susceptible de conducir a una proteína Krit1 truncada, más particularmente, estas secuencias nucleotídicas pueden ser utilizadas por par, teniendo en cuenta su especificidad

de un exón según la distribución siguiente:

- SEC ID nº 1/SEC ID nº 2 para el exón 1,
- SEC ID nº 3/SEC ID nº 4 para el exón 2,
- 5 - SEC ID nº 5/SEC ID nº 6 para el exón 3,
- SEC ID nº 7/SEC ID nº 8 para el exón 4,
- SEC ID nº 9/SEC ID nº 10 para el exón 5,
- SEC ID nº 11/SEC ID nº 12 para el exón 6,
- 10 - SEC ID nº 13/SEC ID nº 14 para el exón 7,
- SEC ID nº 15/SEC ID nº 16 para el exón 8,
- SEC ID nº 17/SEC ID nº 18 para el exón 9,
- SEC ID nº 19/SEC ID nº 20 para el exón 10,
- SEC ID nº 21/SEC ID nº 22 para el exón 10,
- SEC ID nº 23/SEC ID nº 24 para el exón 11,
- 15 - SEC ID nº 25/SEC ID nº 26 para el exón 12,
- SEC ID nº 27/SEC ID nº 28 para el exón 12.

Ventajosamente, la detección de una mutación en *Krit1* está precedida por la amplificación del exón en el que se busca la mutación, y esta amplificación puede ser realizada por PCR o PCR-like.

La naturaleza truncante de estas mutaciones, su ausencia en los controles sanos y su cosegregación con el fenotipo afectado sugieren en gran medida que se trata de mutaciones deletéreas en estas familias.

Los inventores no han detectado variantes de conformación anormales de SSCP en 12 de las 20 familias ensayadas. Para explicar esto, pueden ser emitidas varias hipótesis. La sensibilidad de SSCP no es del 100%, incluso cuando se utilizan varios tipos de condiciones como ha sido el caso en la presente memoria. De manera interesante, no se observó ninguna de estas variantes de conformación anormales en el primer cribado, que se realizó a 20°C sin glicerol. Además, las delecciones que llevarían las regiones que contienen las secuencias que se hibridan con los cebadores no podrían haber sido detectadas por este enfoque. Por último, algunas de estas familias, aunque muestran una fuerte probabilidad de estar relacionadas con el locus *CCM1*, podrían en realidad estar relacionadas con uno de los otros loci *CCM*.

La presente invención tiene asimismo por objeto un método de diagnóstico genotípico de cavernomas en un individuo, caracterizado porque se extrae una muestra biológica de dicho individuo, se detecta la presencia de una mutación en el en *Krit1* que lleva a la expresión de una proteína *Krit1* truncada por análisis de la secuencia nucleica presente en dicha muestra, estando dicha mutación relacionada con la aparición de cavernomas.

La secuencia de ácidos nucleicos analizada puede ser indistintamente de ADN genómico, ADNc o ARNm. El análisis puede ser realizado por hibridación, secuenciación o migración electroforética, en particular por SSCP o DGGE (electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante). La detección de estas mutaciones se podría realizar asimismo con la ayuda de una metodología que permite detectar directamente la presencia de la proteína truncada, por ejemplo los métodos denominados de Protein Truncation Test (traducción *in vitro* de transcritos inversos de ADNc seguida de una revelación de la proteína por anticuerpos o después del marcado de la proteína con la ayuda de un aminoácido marcado). Por último, la búsqueda de mutaciones se puede realizar por análisis directo del transcrito inverso de ADNc preparado a partir de los ARN totales (en particular que proceden de células transformadas por el virus EBV, células en las que los autores han demostrado la expresión del transcrito de *Krit1*).

Ventajosamente, la totalidad o parte de la secuencia de ácidos nucleicos que corresponden al gen *Krit1* está amplificada previamente para la detección de la presencia de una mutación, pudiendo esta amplificación ser realizada por PCR o PCR-like. De manera muy preferida, esta amplificación puede ser realizada por medio de cebadores seleccionados de entre las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo utilizadas según la distribución mencionada anteriormente.

La cuestión principal es por lo tanto entender cómo estas mutaciones han podido conducir a los cavernomas. En realidad, se conocen pocas cosas sobre la naturaleza de estas lesiones, que son consideradas como malformaciones vasculares o hamartomas. Parece ser que el periodo de aparición de estas malformaciones durante la vida embrionaria no está del todo claro. Además, en algunos casos, particularmente en casos familiares, se ha descrito la extensión evolutiva de estos hamartomas: se sugirió que estas lesiones pueden expresar unos factores y/o unos receptores implicados en la angiogénesis (Rothbart *et al.*, 1996; Notelet *et al.*, 1997).

Conviene indicar que los inventores han observado en cuatro familias (Labauge *et al.*, 1999) que unas malformaciones cutáneas (también denominadas angiomas) podían segregarse con los cavernomas cerebrales.

Todas las mutaciones citadas en la presente memoria conducirían, si fuesen traducidas, a unas proteínas *Krit1* truncadas que serían eliminadas de la región que interactúa con Rap1A/Krev1.

Las funciones exactas de Rap1A/Krev1 no están del todo dilucidadas. Este miembro de la familia Ras GTPasa está expresado de manera ubicua particularmente en los neutrófilos, las plaquetas y el cerebro; está localizado en los compartimentos endocíticos/lisosomiales. Rap1A se ha descrito como que interactúa con B-Raf, lo cual es muy interesante a la vista de la apoptosis masiva endotelial observada en los ratones deficientes para B-Raf (Wojnowski *et al.*, 1997). *In vivo*, unos estudios sobre los eucariotas inferiores, tales como las levaduras y la drosophila, han dado recientemente algunas indicaciones sobre las funciones de Rap1A en la diferenciación y la morfogénesis (Asha *et al.*).

La interacción de Krit1 y de Rap1A sugiere que Krit1 podría regular Rap1A o bien ser un efector de Rap1A (Bos *et al.*). Las mutaciones citadas en la presente memoria podrían resultar o bien de un efecto dominante negativo, o bien de una pérdida de función. La observación de las familias que presentan unas deleciones completas de Krit1 sería un fuerte argumento en favor de esta hipótesis. Por otro lado, el hecho de que las formas esporádicas de cavernomas se manifiesten principalmente por una lesión única y de que las formas familiares se manifiesten por unas lesiones múltiples sugiere en gran medida que estas lesiones siguen la regla del "doble impacto de Knudson" (Knudson 1971) y que podría ser necesaria una pérdida completa de la función de Krit1 para la aparición de los cavernomas.

En otras palabras, en las formas dominantes de la enfermedad, estaría presente una primera mutación, presente en todas las células del organismo en el estado heterocigoto. La aparición de las lesiones cavernomatosas estaría condicionada por la aparición de una segunda mutación que afecta al otro alelo de este gen, mutación que aparecería de manera somática. En las formas esporádicas más estudiadas hoy día, el individuo no presenta ninguna mutación germinal y la lesión única resultaría de dos mutaciones aparecidas en la misma célula.

Sin embargo, existirían unas formas esporádicas de cavernomas diferentes de las descritas anteriormente. Los inventores han demostrado en efecto una forma esporádica que se manifiesta por unas lesiones múltiples y que resulta de una mutación *de novo* en el gen *Krit1*, probablemente en una célula germinal de uno de los dos parientes del paciente afectado (datos no mostrados).

En resumen, los datos citados en la presente memoria sugieren en gran medida que las mutaciones truncantes de Krit1 son responsables de la aparición de los cavernomas cerebrales observados en las familias *CCM1*, pero también en algunas formas esporádicas, destacando el papel putativo de la vía de señalización de Rap1A en estos mecanismos.

Entre las aplicaciones terapéuticas descritas en la presente memoria, podrían estar involucrados diferentes tipos de malformaciones vasculares, displasias vasculares, angiomas y/o cualquier situación en la que exista una angiogénesis anormal.

Así, se describe en la presente memoria la utilización del gen *Krit1* o de una secuencia derivada de este gen para la preparación de un medicamento o su utilización en un enfoque de tipo terapia génica destinado a controlar o inhibir la angiogénesis, en particular por sobreexpresión *in situ* del gen *Krit1* o de una secuencia derivada de este gen.

Por "secuencia derivada de este gen" se entiende cualquier secuencia o parte de secuencia normal o mutada del gen *Krit1* y que presenta una actividad similar y comparable a la secuencia total funcional de referencia.

Se describe en la presente memoria un vector de expresión en una célula hospedante apropiada que comprende la secuencia del gen *Krit1* o una secuencia derivada de este gen (la secuencia derivada está definida anteriormente). En el caso en el que se deseara reprimir una angiogénesis anormal, podría ser interesante sobreexpresar la secuencia en cuestión, y esta es la razón por la cual el vector comprende, ventajosamente, los elementos necesarios para esta sobreexpresión.

En particular, el vector puede estar destinado a la terapia génica y, en el caso en el que se deseara limitar su sitio de acción, este vector puede comprender una secuencia que asegura la escisión y/o la expresión tejido específica de las secuencias que comprende.

Por último, se describe una composición terapéutica que comprende, a título de principio activo, la totalidad o parte de la proteína Krit1 normal o modificada, con el fin de ser sustituida, por ejemplo, por una proteína truncada y paliar la deficiencia. El principio activo también puede ser un vector, tal como se ha descrito anteriormente.

La figura 1 representa el mapa genético, físico y transcripcional del locus *CCM1*.

La figura 1a representa el mapa genético del locus *CCM1*. Este locus estaba anteriormente definido por el intervalo D7S2410-D7S689. Los intervalos genéticos reducidos MS2456-D7S689 están indicados por unos corchetes horizontales. Los microsatélites ya publicados están encuadrados. Los nuevos microsatélites están identificados por unos caracteres en negrita. Asimismo, se muestran algunos de los STS. El STS sWSS 1703 corresponde a los nucleótidos 393-658 de *Krit1*. Los marcadores entre los corchetes verticales están espaciados en menos de 1 kb.

La figura 1b representa el mapa físico y transcripcional del locus *CCM1*. Unos contigs de BAC están distribuidos en el intervalo *CCM1*. El BAC AC000120 está representado por la línea más gruesa. Los solapamientos con los STS, o bien con los marcadores microsatélites están indicados por unas pequeñas barras verticales. La flecha negra corresponde a *Krit1*, las flechas blancas corresponden a unos genes humanos bien caracterizados, y las flechas vacías corresponden a unos genes que presentan fuertes homologías con unos genes de otras especies (no caracterizados en los humanos).

La figura 2 representa la cosegregación de las variantes de conformación con el fenotipo enfermo dentro de 8 genealogías (SSCP).

Los símbolos vacíos designan los sujetos cuyo examen del cerebro por IRM es normal, los símbolos negros llenos por la mitad corresponden a unos pacientes asintomáticos que presentan unos cavernomas en el examen por IRM, los símbolos negros llenos corresponden a unos pacientes sintomáticos y que presentan unos cavernomas en el IRM; el signo "?" corresponde a los sujetos que tienen un estado desconocido y el signo "\" corresponde a unos pacientes fallecidos. Los pacientes fallecidos o con un estado desconocido no se ensayaron para la mutación, pero están representados para una mejor comprensión de las estructuras familiares. Las bandas anormales están indicadas por una flecha.

La figura 3 ilustra las mutaciones de *Krit1*.

La figura 3a representa la estructura del gen *Krit1* y de la proteína putativa correspondiente. "ns" significa anti-sentido, "del" significa delección e "ins" significa inserción. Para las inserciones, el número de nucleótido corresponde al nucleótido que precede a la inserción. La expresión "Krev Interacting Region" corresponde a la región (aminoácidos 483-529) cuya delección deroga la interacción con Krev durante el ensayo en doble híbrido en la levadura.

La figura 3b representa las mutaciones de *Krit1*, identificadas en las 8 genealogías mencionadas anteriormente. Las flechas indican los sitios de mutación. WT significa secuencia de tipo salvaje y MT significa secuencia mutante. En la genealogía 42, el cromatograma y la secuencia presentados corresponden a la hebra negativa; la hebra positiva ha mostrado una superposición completa de las secuencias normales y anormales y no permite tener una buena visualización del sitio del principio de la delección.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Veinte pacientes no emparentados que pertenecen a unas familias de las cuales se sabía que presentaban de manera hereditaria unos cavernomas han formado parte del estudio con su libre consentimiento (Labauge *et al.*).

El análisis de este grupo de familias con el ensayo HOMOG ha mostrado que estas familias tenían una probabilidad *a posteriori* de estar relacionadas con el locus *CCM1* superior al 90% (Laberge *et al.*).

Un enfoque que combina biología molecular y bio-informática se utilizó para establecer el mapa físico y transcripcional del locus *CCM1*. Después de la validación de un contig de YAC previamente publicado por Johnson *et al.* (1995), los autores han posicionado en el intervalo por PCR y por un enfoque *in silico* 574 EST (Expressed Sequence Tags), que han agrupado en 53 grupos.

Reducción del intervalo genético

Se han seleccionado 12 marcadores microsatélites polimorfos que recubren el intervalo D7S2410-D7S689 para los análisis de unión. Siete de ellos eran previamente conocidos: D7S2410, D7S2409, D7S1813, D7S1789, D7S646, D7S689 y D7S558, y han sido utilizados por varios equipos (Günel *et al.* en Neurosurgery, Craig *et al.*, Labauge *et al.*, Laberge *et al.*). Los últimos MS65, MS2453A, MS2456A, MS119 y MS120 han sido identificados por los inventores en base a los datos de secuencia de los BAC cartografiados en el intervalo.

Detección de las mutaciones e identificación

En base a la comparación de las secuencias del ADNc de *Krit1* y de BAC AC 0000120, los inventores han determinado 14 pares de cebadores para amplificar los 12 exones y los sitios de unión exón/intrón de *Krit1* a partir del ADN genómico. Se realizaron unas reacciones de PCR de la siguiente manera: después de una primera etapa inicial de desnaturalización a 94°C (4 min.), 30 ciclos de amplificación que consisten en unas etapas a 94°C (15 s), una temperatura de hibridación optimizada comprendida entre 45°C y 55°C (15 s) y 72°C (15 s) seguida de una etapa de extensión final a 72°C (10 min.). Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en 4 tipos de condiciones (acrilamida al 10% con o sin glicerol a 4°C y 20°C) en un aparato Mighty Small II (Pharmacia-Biogen)

utilizado en la condición habitual constante de 35 mA. Se revelaron con plata unas variantes de conformación (Silver Stain Plus Kit, Biorad). Se secuenciaron unos amplímeros que muestran un patrón de bandas SSCP atípico (AB1377, Perkin Elmer). Todas las mutaciones descubiertas durante la secuenciación se ensayaron para su cosegregación con el fenotipo enfermo mediante un enfoque SSCP.

5

TABLA 1: CEBADORES

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR INVERSO	TAMAÑO DEL AMPLÍMERO
1	GAGCGGATAAAAACTAAT (SEC ID nº 1)	GAGCTAAAATTCATTCAA (SEC ID nº 2)	205
2	GCTCTTAATGGGTTTTTG (SEC ID nº 3)	AGCAATGTGGAGTAAAC (SEC ID nº 4)	183
3	TTTGAATGAGAACAGTC (SEC ID nº 5)	GTCCTGTTGTATTTTTCA (SEC ID nº 6)	265
4	GTTGTTGTTTTTGTGTTG (SEC ID nº 7)	ACCTGGAAAATAACTTAC (SEC ID nº 8)	208
5	ATGTAATGCCTTTTTTCC (SEC ID nº 9)	ATGCCTGGCTCTAACTAT (SEC ID nº 10)	181
6	TTGTTAGATTGTGATGTA (SEC ID nº 11)	AACATAATAAAAACTTTC (SEC ID nº 12)	257
7	TTTATAAAAAGGAATGATG (SEC ID nº 13)	TCAACTCAAACCATATCA (SEC ID nº 14)	335
8	TGTAGCCTAATAACCAA (SEC ID nº 15)	AGCATAGCACAAGACCAT (SEC ID nº 16)	243
9	GGTGAAGTTTTTAATATG (SEC ID nº 17)	CAATAGTTTATGAAGTCC (SEC ID nº 18)	213
10	ATATTTACAAAGGCAAGC (SEC ID nº 19) TGGTACATTTTCCTTTCA (SEC ID nº 21)	TGACATGATTGGTAAAAA (SEC ID nº 20) CTTTATGATTGCTGGGGC (SEC ID nº 22)	180 201
11	GGTGAAGTTTTTAATATG (SEC ID nº 23)	CAATAGTTTATGAAGTCC (SEC ID nº 24)	205
12	AATAGATAGGGAAGTCC (SEC ID nº 25) TAATGCCCACTGAAAGAA (SEC ID nº 27)	GTGGCTTGAGTAACAGTT (SEC ID nº 26) GGCTGGTCTTGAAGTCTG (SEC ID nº 28)	234 199

TABLA 2: SECUENCIAS DE LAS UNIONES INTRÓN-EXÓN

10

EXÓN	POSICIÓN SOBRE EL L'ADNc	TAMAÑO	SECUENCIA	POSICIÓN SOBRE BAC AC000120
1	8-133	126	atcagggtcag ACAGAAA... (SEC ID nº 29)	TACAAATCGG gtaagagt (SEC ID nº 30) 127165-127040
2	134-249	116	ccctttctag GTAGATAAAG... (SEC ID nº 31)	CAGAAGACAA gtactgtttc (SEC ID nº 32) 126561-126445
3	250-393	144	taatgattag GGAACGACAG... (SEC ID nº 33)	ATGCATGCTG gtaaatggaa (SEC ID nº 34) 126228-126086
4	394-550	157	ttttatacag GTATGGAAAA... (SEC ID nº 35)	AACGGATAGA gtaagtatt (SEC ID nº 36) 118319-118163
5	551-657	107	acatttctag CATATAACAG... (SEC ID nº 37)	TACAAAACCA gtaagaatta (SEC ID nº 38) 117464-117357
6	658-815	157	tttctgtag TATGAAAAAG... (SEC ID nº 39)	GAAAACCTCA gtaagaaagt (SEC ID nº 40) 114615-114459
7	816-967	152	tgttttcag GCCTTCAACT... (SEC ID nº 41)	TGAAAAACAG gtttgctgg (SEC ID nº 42) 113690-113539
8	968-1134	168	ttccttaag ATTGAAGACC... (SEC ID nº 43)	GTTTCCTAAA gtaagtatt (SEC ID nº 44) 106414-106248
9	1135-1222	88	gtgcttacag TGAAGAAAAT... (SEC ID nº 45)	TGAATACAAG gtaagctgtt (SEC ID nº 46) 105616-105529
10	1223-1429	207	ttgttttag AATCTCAGTA... (SEC ID nº 47)	GGAAACTAAG gtagatttc (SEC ID nº 48) 105038-104832
11	1430-1546	117	tatgttcag GCTTFACTCA... (SEC ID nº 49)	TACAAAACAG gtaagtatca (SEC ID nº 50) 93060-92942
12	1547-2004*	458*	tactttgtag GCTCTGGTGC...* (SEC ID nº 51)	92441-91984*

* Exón 12 no determinado totalmente ya que contiene unas secuencias *Alu*

TABLA 3: MUTACIONES EN KRIT1

GENEALOGÍA	MUTACIONES EN EL ADN GENÓMICO	MUTACIONES DE LOS AMINOÁCIDOS	
6	Delección (A) nt 1342 Exón 10	Cambios en aminoácidos después de AA 438	Normal (WT): IF (438) TKASPSNHHKVIPVIVG... Mutante (MT): IF (438) TIRTAPAIKSSLM*codón stop
10	Falso-sentido (C → T) nt 1283 Exón 10	Cambios en aminoácidos después de AA 420	WT: FL (420) QN... MT: FL (420) * codón stop
18	Inserción (C) Después de nt 247 Exón 2	Cambios en aminoácidos después de AA 74	WT: ED (74) KERQWDD... MT: ED (74) QGTTVGR*codón stop
19	Falso-sentido (G → A) nt 261 Exón 3	Cambios en aminoácidos después de AA 79	WT: RQ (79) WVDD... MT: RQ (79) * codón stop
35	Delección (26 pb) nt 1012 Exón 8	Cambios en aminoácidos después de AA 328	WT: EA (328) RYNLLKGFYTAPDAKL... MT: EA (328) SSS* codón stop
41	Falso-sentido (G → A) nt 615 Exón 5	Cambios en aminoácidos después de AA 197	WT: NN (197) WEEAA... MT: NN (197) * codón stop
42	Delección (GAAT) nt 681-684 Exón 6	Cambios en aminoácidos después de AA 217	WT: IY (217) RMDGSYRSVELK... MT: IY (217) RMGHIVLLN*codón stop
58	Inserción (C) Después de nt 1271 Exón 10	Cambios en aminoácidos después de AA 415	WT: LQ (415) RMFLQNCQIFTKASPSNHHKV... MT: LQ(415) HVLTQLTDIKGYKPKQS*codón stop

Referencias

5

1. Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. (1997)

10

2. Asha H., de Ruiter N.D., Wang M.G. y Hariharan I.K. The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO*, 18: 605-615 (1999)

3. Bos J.L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO*, 17:6776-6782 (1998)

15

4. Craig H.D., Günel M., Cepada O. *et al.* Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p1(-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet* 7: 1851-1858. (1998)

20

5. Dubovsky J., Zabramsky J.M., Kurth J. *et al.* A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 4: 453-458. (1995)

25

6. Ducros A., Denier C., Joutel A. *et al.* Recurrence of the T666M Calcium Channel CACNA1A Gene Mutation in Familial Hemiplegic Migraine with Progressive Cerebellar Ataxia. *Am J Hum Genet*, 64: 89-98. (1999)

7. Eenson DA, Boguski MS, Lipman DJ *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res* 27:12-7 (1999)

30

8. Günel M., Awad I.A., Finberg K.S. *et al.* A Founder Mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Eng J Med* 334: 946-951. (1996)

9. Günel M, Awad IA, Finberg K *et al.* Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery* 38:1265-1271. (1996)

10. Henkemeyer M., Rossi D.J., Holmyard D.P. *et al.* Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* 377: 695-701. (1995)

35

11. Huang X., Adams M.D., Zhou H. y Kerlavage A.R. A tool for analysing and annotating genomic sequences *Genomics* 46: 37-45 (1997)

12. Johnson EW, Iyer LM, Rich SS *et al.* 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 Research*, 5: 368-380. (1995)
- 5 13. Kiayama H., Sugimoto Y., Matsuzaki T., Ikawa Y y Noda M. A ras-Related gene with Transformation Suppressor Activity. *Cell*, 56: 77-84 (1989)
14. Knudson AG Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma; *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 68, 820-823 (1971).
- 10 15. Labauge P., Laberge S., Brunereau L. *et al.* Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French familles. *Lancet* 352: 1892-258. (1998)
16. Laberge S., Labauge P., Maréchal E., Maciazek J, Tournier-Lasserre E. Genetic heterogeneity and absence of founder effect in a series of 36 non Hispano-American cerebral cavernomas families. (*European Journal of Human Genetics*, in press)
- 15 17. Notelet L., Houtteville J.P., Khoury S., Lechevalier B. and Chapon F. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cerebral cavernomas: ans immunocytochemical study of 42 cases. *Surg Neurol* 47: 364-70 (1997)
- 20 18. Oten P, Pizzolata GP, Rilliet B, Berney J. A propos de 131 cas d'angiomes caverneux (cavernomes) du SNC, repérés par l'analyse rétrospective de 24 535 autopsies. *Neurochirurgie* 35 :82-83 (1989)
19. Pizon V., Chardin P., Lerosey I., Olofsson B. y Tavitian A. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* gene *Dras3* encode proteins closely related to ras in the effector region. *Oncogene*, 3: 201-204 (1988)
- 25 20. Pizon V., Cifuentes-Diaz C., Mege RM., Baldacci G. y Rieger F. Expression and localization of Rap1 proteins during myogenic differentiation. *Eur J Cell Biol*, 69: 224-235 (1996)
21. Quarck R., Berrou E., Magnier C., Bobe R., Bredoux R., Tobelem G., Enouf E y Bryckaert M. Differential up-regulation of Rapla and Raplb proteins during smooth muscle cell cycle. *Eur J Cell Biol* 70: 269-277 (1996)
- 30 22. Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP *et al.* Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *N Engl J Med* 319: 343-347. (1988)
- 35 23. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674. (1997)
24. Russell DS, Rubenstein LJ. Pathology of tumours of the nervous system. 5ª ed. Baltimore, Md; Williams and Wilkins: 730-736. (1989)
- 40 25. Rothbart D., Awad I.A., Lee J., Kim J., Harbaugh R., Crisculo G.R. Expression of Angiogenic Factors and Structural Proteins in Central Nervous System Vascular Malformations. *Neurosurgery* 38: 915-925 (1996)
26. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer 3 http://wwwgenome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html (1996, 1997)
- 45 27. Serebriiskii., Estojak J., Sonoda G. *et al.* Association of Krev1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22 Oncongene 15: 1043-1049. (1997)
28. Wojnowski L., Zimmer A.M., Beck T.W. *et al.* Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genet* 16: 293-297. (1997)
- 50 29. Xu HP., Wang Y., Riggs M., Rodgers L. y Wigler M. Biological activity of the mammalian RAP genes in yeast. *Cell Regul* 1:763-9 (1990)

55 **Listado de secuencias**

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM

<120> D18210

60 <130> Utilización del gen *Krit1* en el campo de la angiogénesis

<140>

<141>

65 <160> 51

<170> PatentIn Vers. 2.0

5 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sentido

<400> 1

15 gagcggataa aaactaat 18

<210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 2

25 gagctaaaat tcattcaa 18

<210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador sentido

35 <400> 3

gctctaatg ggttttg 18

40 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 4

50 agcaatgtgg agtaaac 18

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador sentido

60 <400> 5

tttggatga gaacagtc 18

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN

65

ES 2 456 322 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
5	<400> 6	
	gtcctgtgtg attttca	18
10	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador sentido	
	<400> 7	
20	gttggtgtt tttgttg	18
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
30	<400> 8	
	acctggaaaa taactac	18
	<210> 9	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador sentido	
	<400> 9	
	atgtaatgcc tttttcc	18
45	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador inverso	
	<400> 10	
55	atgcctggct ctaactat	18
	<210> 11	
	<211> 18	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido	
65	<400> 11	

	ttgtagatt gtagtgta	18
5	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador inverso <400> 12	
15	aacataataa aaactttc	18
20	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sentido <400> 13	
30	ttataaaag gaatgatg	18
35	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador inverso <400> 14	
45	tcaactcaaa ccatatca	18
50	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sentido <400> 15	
60	tgtagcctaa taaccaa	18
65	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso <400> 16	
	agcatagcac aagacat	18
	<210> 17 <211> 18 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido	
5	<400> 17	
	ggtgaagttt ttaatag	18
10	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso	
	<400> 18	
20	caatagtta tgaagtcc	18
	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido	
30	<400> 19	
	atattacaaggcaagc	18
	<210> 20	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador inverso	
	<400> 20	
	tgacatgatt ggtaaaaa	18
45	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sentido	
	<400> 21	
55	tggtacattt tccttca	18
	<210> 22	
	<211> 18	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
65	<400> 22	

	ctttatgatt gctggggc	18
5	<210> 23 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sentido	
	<400> 23	
15	ggtgaagttt ttaatatg	18
20	<210> 24 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
25	<400> 24	
30	caatagtta tgaagtcc	18
35	<210> 25 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sentido	
	<400> 25	
40	aatagatagg gaactgcc	18
45	<210> 26 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 26	
50	gtggcttgag taacagtt	18
55	<210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sentido	
60	<400> 27	
65	taatgcccac tgaagaa	18
	<210> 28 <211> 18 <212> ADN	

ES 2 456 322 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
5	<400> 28	
	ggctggctct gaactctg	18
10	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 29	
	atcaggtcag acagaaaact	20
20	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 30	
	tacaaatcgg gtaagagttg	20
30	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 31	
	cccttctag gtagataaag	20
40	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 32	
	cagaagacaa gtactgttc	20
50	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 33	
	taatgattag ggaacgacag	20
60	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 34	
	atgcatgctg gtaaatggaa	20
70	<210> 35 <211> 20 <212> ADN	

ES 2 456 322 T3

	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
5	ttttatacag gtatggaaaa	20
	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 36	
15	aacggataga gtaagtatt	20
	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 37	
	acatttctag catataacag	20
25	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 38	
	taacaaacca gtaagaatta	20
35	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 39	
40	tttctttag tatgaaaaag	20
	<210> 40	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 40	
50	gaaacctca gtaagaaagt	20
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 41	
60	tgttttcag gccttcaact	20
	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
65	<400> 42	

ES 2 456 322 T3

	tgaaaaacag gtttgcttg	20
5	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 43	
10	ttccttaag attgaagacc	20
15	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 44	
20	gtttcctaaa gtaagtatt	20
25	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 45	
30	gtgcttacag tgaagaaat	20
35	<210> 46 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 46	
40	tgaatacaag gtaagctgt	20
45	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 47	
50	ttgttttag aatctcagta	20
55	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 48	
60	ggaaactaag gtagatttc	20
65	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens <400> 49	
65	tatgttcag gcttactca	20

ES 2 456 322 T3

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5
<400> 50
tacaaaacag gtaagtatca 20
10 <210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 51
tactttgtag gctctggtcg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico genotípico de cavernomas en un individuo, caracterizado porque se extrae una muestra biológica de dicho individuo, porque se detecta la presencia de una mutación en el gen *Krit1* que conduce a la expresión de una proteína Krit1 truncada por análisis de la secuencia nucleica presente en dicha muestra, estando dicha mutación relacionada con la aparición de cavernomas.
- 10 2. Método de diagnóstico según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de ácido nucleico es ADN genómico, ADNc o ARNm.
- 15 3. Método de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicho análisis se realiza por hibridación.
- 20 4. Método de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho análisis se realiza por secuenciación.
- 25 5. Método de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicho análisis se realiza por migración electroforética, y más particularmente por SSCP o DGGE.
- 30 6. Método de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se amplifica la totalidad o parte de la secuencia de ácido nucleico que corresponde al gen *Krit1* previamente a la detección de la presencia de una mutación.
- 35 7. Método de diagnóstico según la reivindicación 6, caracterizado porque la amplificación se realiza por PCR.
- 40 8. Método de diagnóstico según la reivindicación 7, caracterizado porque los cebadores para realizar la amplificación están entre las secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27, SEC ID nº 28.
- 45 9. Método de diagnóstico según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque los pares de cebadores para realizar la amplificación se seleccionan de entre el grupo que comprende:
- SEC ID nº 1/SEC ID nº 2 para el exón 1,
 - SEC ID nº 3/SEC ID nº 4 para el exón 2,
 - SEC ID nº 5/SEC ID nº 6 para el exón 3,
 - SEC ID nº 7/SEC ID nº 8 para el exón 4,
 - SEC ID nº 9/SEC ID nº 10 para el exón 5,
 - SEC ID nº 11/SEC ID nº 12 para el exón 6,
 - SEC ID nº 13/SEC ID nº 14 para el exón 7,
 - SEC ID nº 15/SEC ID nº 16 para el exón 8,
 - SEC ID nº 17/SEC ID nº 18 para el exón 9,
 - SEC ID nº 19/SEC ID nº 20 para el exón 10,
 - SEC ID nº 21/SEC ID nº 22 para el exón 10,
 - SEC ID nº 23/SEC ID nº 24 para el exón 11,
 - SEC ID nº 25/SEC ID nº 26 para el exón 12,
 - SEC ID nº 27/SEC ID nº 28 para el exón 12.
- 50 10. Utilización de por lo menos un cebador de secuencia nucleotídica para la detección, a partir de una extracción biológica, de la presencia de una mutación en el gen *Krit1* susceptible de conducir a una proteína Krit1 truncada, y siendo dicho cebador seleccionado de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27, SEC ID nº 28.
- 55 11. Utilización según la reivindicación 10, para la detección, a partir de una extracción biológica, de la presencia de una mutación en el gen *Krit1* relacionada con la aparición de cavernomas.
- 60 12. Utilización según una de las reivindicaciones 10 y 11, caracterizada porque la detección de la mutación se efectúa en por lo menos un exón del gen *Krit1*.
- 65 13. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada porque un par de secuencias es específica de un exón según la distribución siguiente:

- SEC ID nº 1/SEC ID nº 2 para el exón 1,
- SEC ID nº 3/SEC ID nº 4 para el exón 2,
- SEC ID nº 5/SEC ID nº 6 para el exón 3,
- 5 - SEC ID nº 7/SEC ID nº 8 para el exón 4,
- SEC ID nº 9/SEC ID nº 10 para el exón 5,
- SEC ID nº 11/SEC ID nº 12 para el exón 6,
- SEC ID nº 13/SEC ID nº 14 para el exón 7,
- SEC ID nº 15/SEC ID nº 16 para el exón 8,
- 10 - SEC ID nº 17/SEC ID nº 18 para el exón 9,
- SEC ID nº 19/SEC ID nº 20 para el exón 10,
- SEC ID nº 21/SEC ID nº 22 para el exón 10,
- SEC ID nº 23/SEC ID nº 24 para el exón 11,
- SEC ID nº 25/SEC ID nº 26 para el exón 12,
- 15 - SEC ID nº 27/SEC ID nº 28 para el exón 12.

14. Utilización según una de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizada porque la detección de una mutación está precedida por la amplificación del exón en el que se busca la mutación.

- 20 15. Utilización según la reivindicación 14, caracterizada porque la amplificación se realiza por PCR.

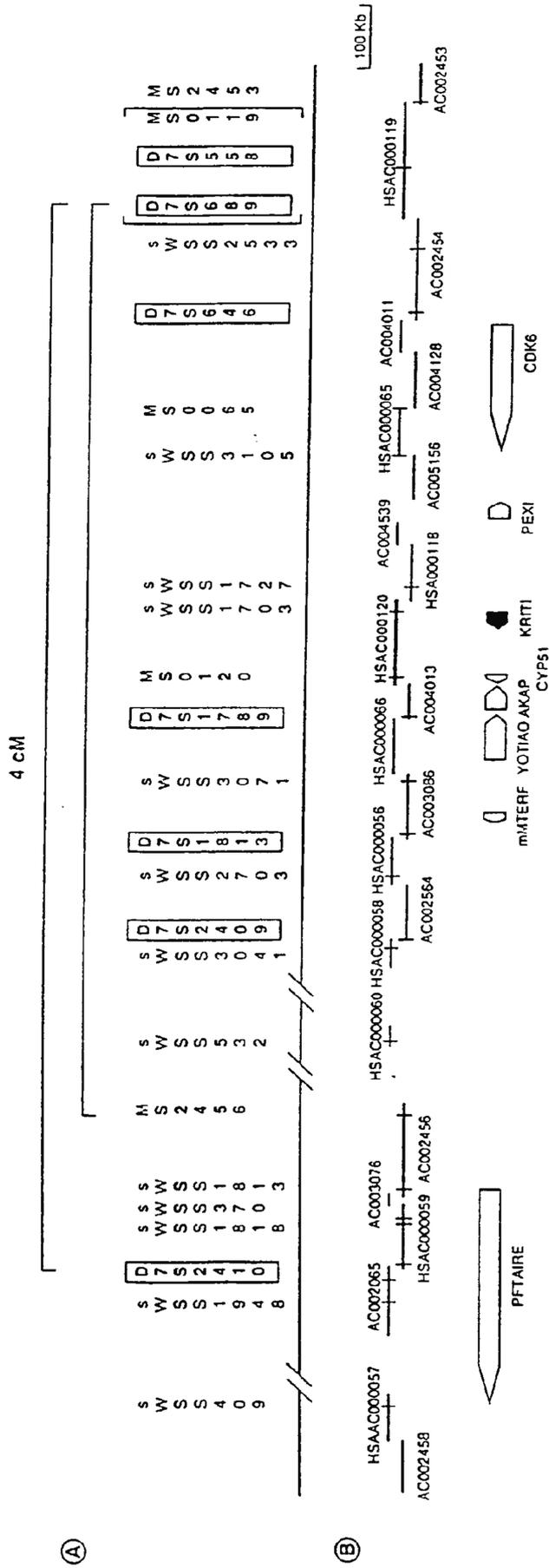


Figura 1

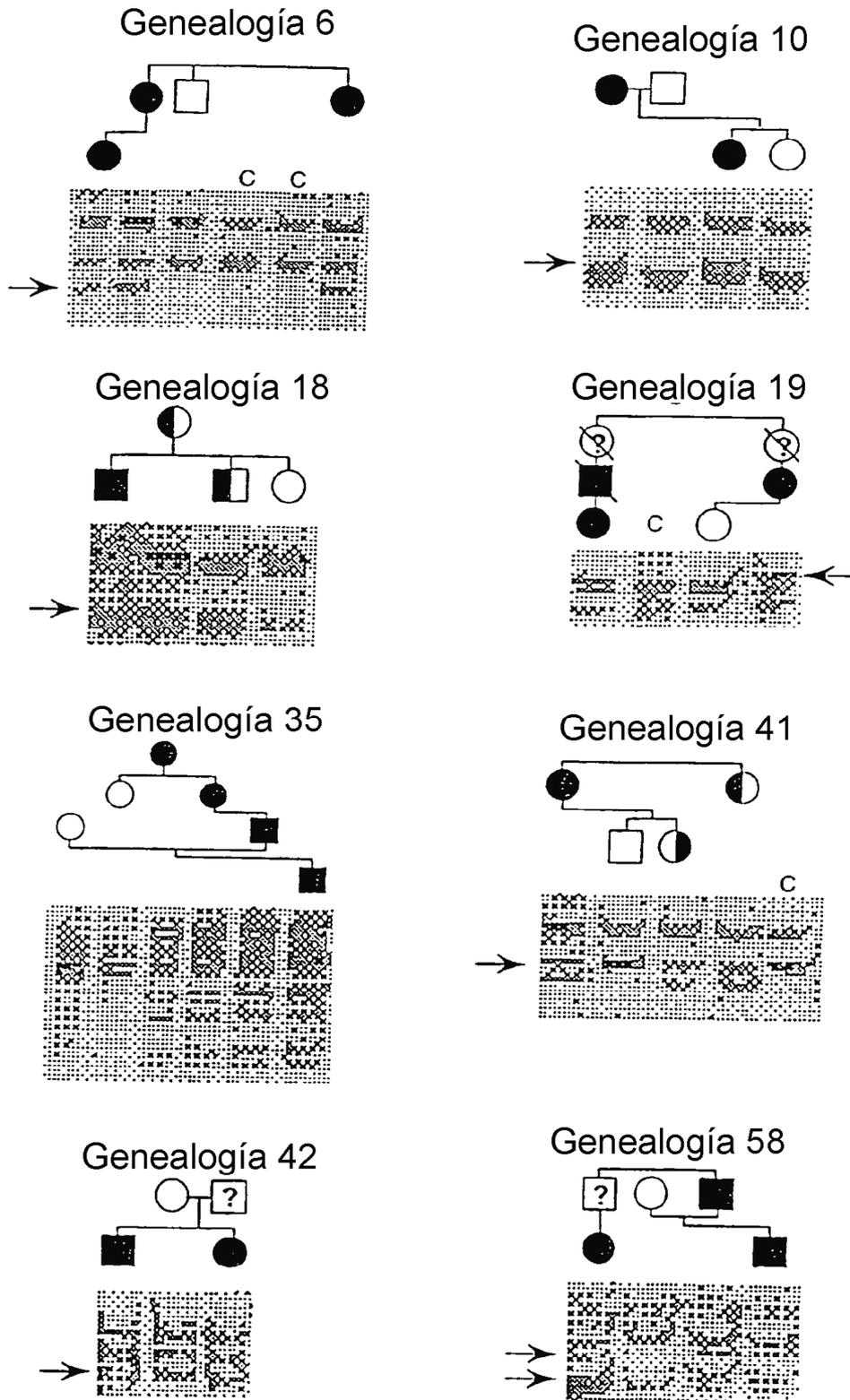


Figura 2

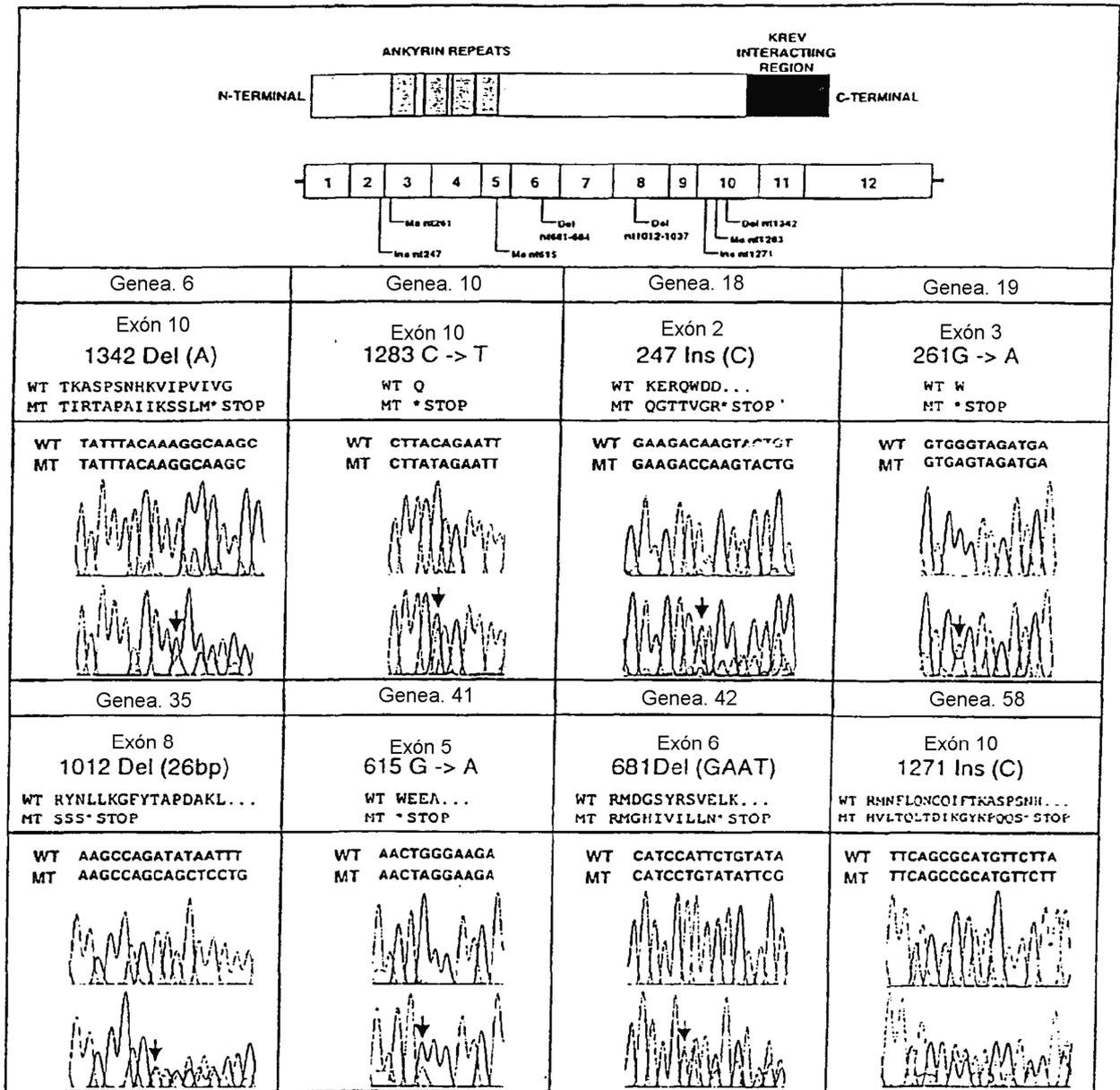


Figura 3