



Universidad de Oviedo

Hospital Universitario Central de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**Espectro mutacional del gen *NOTCH3* en
pacientes de CADASIL**

Ángela Fernández Iglesias

10 de julio de 2015

Trabajo Fin de Máster



Eliecer Coto García, Dr. en Biología por la Universidad de Oviedo, jefe de Servicio del Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y profesor asociado al Departamento de Medicina; y Ana Gutiérrez Fernández, Doctora en Biología por la Universidad de Oviedo y perteneciente al grupo de Biología Molecular del Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA).

Certifican:

Que el trabajo fin de Máster presentado por Doña Ángela Fernández Iglesias, titulado: “Espectro Mutacional del gen *NOTCH3* en pacientes con CADASIL”, realizado bajo la dirección del Dr. Eliecer Coto García, y bajo la tutela de la Dr. Ana Gutiérrez dentro del Máster de Biomedicina y Oncología Molecular de la Universidad de Oviedo, reúne a nuestro juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster en la Universidad de Oviedo.

Y para que así conste dónde convenga, firman la presente certificación en Oviedo a 10 de Julio de 2015.

Vº Bº

Vº Bº

Fdo: Ana Gutiérrez Fernández

Fdo: Eliecer Coto García

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
1.1. ANTECEDENTES	7
1.2. CADASIL	8
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA	9
1.2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	9
1.2.3. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN	11
1.2.4. PATOLOGÍA.....	13
1.2.5. PATOGÉNESIS: <i>Significado patogénico de las alteraciones morfológicas</i> ...	14
1.2.6. GENÉTICA MOLECULAR	15
1.2.7. FUNCIONES Y SEÑALIZACIÓN DE LA PROTEINA NOTCH3	16
1.3. CARASIL	20
1.4. NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)	22
1.4.1. ION TORRENT PGM	22
II. OBJETIVOS	24
III. PACIENTES Y MÉTODOS	25
3.1. PACIENTES	25
3.2. MÉTODOS	26
3.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA	26
3.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	26
3.2.3. SECUENCIACIÓN SANGER.....	27
3.2.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE NGS Y VALIDACIÓN DE LAS MUTACIONES	28
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES.....	37
VII. REFERENCIAS	38

ABREVIATURAS

ANKR	Repeticiones anquirina (<i>"Ankyrin repeats"</i>)
CADASIL	Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (<i>"Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy"</i>)
CARASIL	Arteriopatía cerebral autosómica recesiva con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (<i>"Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy"</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>"Extracellular matrix"</i>)
EGFR	Repetición tipo factor de crecimiento epidérmico (<i>"Epidermal growth factor-like repeat"</i>)
FLAIR	Recuperación invertida de flujo atenuado (<i>"Fluid-attenuated inversion recovery"</i>)
HD	Dominio de heterodimerización (<i>"Heterodimerisation domain"</i>)
LTBP1	Proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformante beta latente (<i>"Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1"</i>)
MELAS	Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular (<i>"Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes"</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>"Next generation sequencing"</i>)
<i>NOTCH3</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 3
PDZ domain	Dominio de proteína postsináptica (PSD95), supresor tumoral de disco largo de <i>Drosophila</i> (<i>Dlg1</i>) y proteína zónula ocludens 1 (<i>"Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)"</i>)
PEST sequence	Secuencia rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) (<i>"Sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)"</i>)
PGM	Máquina genómica personal (<i>"Personal Genome Machine"</i>)
SNV	Variante nucleotídica (<i>"Single nucleotide variant"</i>)

SMCs	Células del músculo liso (" <i>Smooth-muscle cells</i> ")
TM	Dominio transmembrana (" <i>Transmembrane domain</i> ")
VC	Buscador de variantes (" <i>Variant caller</i> ")
VSMCs	Células del músculo liso vascular (" <i>Vascular smooth muscle cells</i> ")
WM	Materia blanca (" <i>White matter</i> ")
WT	Tipo natural o Silvestre (" <i>Wildtype</i> ")

RESUMEN

El objetivo del presente Trabajo Fin de Máster era desarrollar un procedimiento de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS) para buscar mutaciones en los genes *NOTCH3* y *HTRA1* en pacientes con características clínicas de CADASIL. Un total de 80 pacientes fueron secuenciados mediante chips semiconductores en un aparato Ion Torrent Personal Genome Machine. Las posibles mutaciones encontradas fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger en los pacientes correspondientes. Seis pacientes presentaban una mutación de cambio de cisteína, una alteración muy común en pacientes de CADASIL. Sin embargo, se encontraron dos variantes no descritas en el gen *NOTCH3* (p.Cys1250Trp y p.Pro2178Ser) y dos variantes en el gen *HTRA1* (p.Ser139Ala y p.Arg670Gln), de las cuáles únicamente la variante de exón 23 del gen *NOTCH3* (p.Cys1250Trp) parece tener carácter patogénico.

El procedimiento de NGS aquí descrito podría facilitar un screening más rápido y a menor coste de largas cohortes de pacientes de CADASIL.

ABSTRACT

The aim of this Master's degree project was to develop a Next Generation Sequencing procedure to search for *NOTCH3* and *HTRA1* mutations in patients with CADASIL features. A total of 80 patients were sequenced with semiconductor chips in an Ion Torrent Personal Genome Machine. The putative mutations were confirmed through Sanger sequencing of the corresponding patient. Six patients had a typical cysteine-involving *NOTCH3* mutation. Four non-reported variants were found in *NOTCH3* (p.Cys1250Trp y p.Pro2178S) and *HTRA1* (p.Ser139Ala y p.Arg670Gln) genes. However, only one of the patients had a *NOCTH3* variant with likely pathogenic effect (p.Cys1250Trp).

The NGS procedure here described would facilitate the rapid and cost effective screening of large cohorts of CADASIL patients making it highly applicable in a clinical molecular diagnostics laboratory.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El término *Small Vessel disease (SVD)*, *Cerebral Small Vessel disease* o *Enfermedad de los Vasos Pequeños del Cerebro* engloba a un grupo de procesos patológicos con varias etiologías que afecta a las pequeñas arterias, arteriolas, vénulas y capilares del cerebro. Las consecuencias de este tipo de patologías en el parénquima cerebral son principalmente lesiones localizadas en las estructuras subcorticales, como serían lesiones lacunares, lesiones en la material blanca, grandes hemorragias o microsangrados.

Hay diferentes tipos de enfermedades de vasos pequeños y diversas clasificaciones que las agrupan, pero en este caso se tendrá en cuenta la clasificación descrita por Pantoni (2010), que divide a las patologías de vasos pequeños en función de su etiología (Tabla 1) (Pantoni, 2010). Entre todos los tipos y aunque su frecuencia es muy variable, se podría decir que la tipo I y la II son las formas más prevalentes. Sin embargo, en los últimos años el grupo de enfermedades cerebrales hereditarias de vasos pequeños (tipo III) ha ido incrementando su número (Hara et al., 2009a) y entre ellas, CADASIL y la enfermedad de Fabry serían las más comunes (Ballabio et al., 2007; Razvi and Bone, 2006). Además, su importancia ha ido aumentando, puesto que la comprensión de su patogénesis podría servir de modelo para entender las enfermedades de vasos pequeños de tipo esporádico (Pantoni, 2010).

Tabla 1: Clasificación etiológica de las enfermedades cerebrales de vasos pequeños.

Modificado de(Pantoni, 2010).

Tipo I: Arterioesclerosis (o enfermedad de vasos pequeños relacionada con la edad o la hipertensión) – Necrosis fibrinoide, lipohialinosis, microateroma, microaneurisma, y desorganización segmental arterial.

Tipo II: Angiopatía cerebral amiloide esporádica o hereditaria

Tipo III: Enfermedades genéticas o heredables de los vasos pequeños distintas de la angiopatía cerebral amiloide – Por ejemplo, CADASIL, CARASIL, MELAS, enfermedad de Fabry, vasculopatía hereditaria cerebroretinal, endotelopatía hereditaria con retinopatía, nefropatía e ictus o enfermedad de vasos pequeños causada por mutaciones en *COL4A1*.

Tipo IV: Enfermedades de vasos pequeños mediadas inflamatoria e inmunológicamente – Por ejemplo, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, poliangitis microscópica, síndrome de Sneddon's, vasculitis reumatoide, escleroderma y dermatomiositis.

Tipo V: Colangelosis venosa.

Tipo 6: Otras enfermedades de vasos pequeños – Por ejemplo angiopatía post-radiación y la degeneración no-amiloide de los vasos pequeños en Alzheimer.

1.2. CADASIL

La **Arteriopatía Cerebral Autosómica Dominante con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía** o **CADASIL** es la forma más común de angiopatía cerebral hereditaria e implica un desorden progresivo de los vasos pequeños del cerebro. Normalmente se manifiesta con síntomas como migraña, ictus y daños en la materia blanca, causando un trastorno cognitivo en algunos pacientes (Boussier and Tournier-Lasserre, 1994; Tournier-Lasserre et al., 1993). La primera familia con CADASIL fue descrita por von Bogaert como "*Enfermedad de Binswanger*" en 1955 (Van Bogaert, 1955). Posteriormente, otras seis familias con los mismos patrones de presentación fueron identificadas bajo diferentes nombres (ej. Chronic familiar vascular encephalopathy, Familiare zerebrale Arteriosklerose, Familial disorder with subcortical ischemic strokes, etc). Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando se

mapeó el factor causal de la enfermedad en el cromosoma 19 (Tournier-Lasserre et al., 1993) y hasta 1996 cuando se identificó el gen mutado como *NOTCH3* (*Notch homolog 3*).

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

Desde el momento de la descripción de su factor causal, CADASIL ha sido diagnosticado en familias de todo el mundo y en todos los grupos étnicos. A pesar de que se desconoce la prevalencia exacta, el mayor número de familias afectadas se encuentra entre los caucásicos europeos, mientras que en Estados Unidos y Canadá el número de casos reportados es menor (<1/10.000) (Tikka et al., 2014). Algunas aproximaciones proporcionan frecuencias del 11% para pacientes por debajo de 50 años, y 2% para pacientes mayores de 65 años.

1.2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Aunque la presentación clínica de CADASIL varía sustancialmente dentro y entre familias, esta enfermedad se caracteriza por cinco síntomas principales – migraña con aura, eventos isquémicos subcorticales, alteraciones del humor, apatía y desordenes cognitivos-. Aun así, estos síntomas varían en frecuencia en función de la edad y duración de la enfermedad (Chabriat et al., 1995; Desmond, 2004; Dichgans et al., 1998; Reyes et al., 2009).

Migraña con aura

Entre el 20 y 40% de los pacientes con CADASIL tienen migraña con aura y, cuando está presente, normalmente es el primer síntoma en aparecer en pacientes con una edad media de 30 años (Chabriat et al., 1995; Vahedi et al., 2004). La mayor parte de los ataques son típicamente de aura visual o sensorial, duran entre 20-30 minutos y van seguidos de dolor de cabeza con unas horas de duración.

Los ataques isquémicos transitorios y los ictus isquémicos son las manifestaciones más comunes en CADASIL, ya que ocurren en un 60-85% de los pacientes con una media de edad de 49 años y con una incidencia de 10,4 por cada 100 pacientes por año (Ballabio et al., 2007; Bousser and Tournier-Lasserre, 1994, 2001; Chabriat et al., 1995; Chabriat et al., 1997; Desmond, 2004; Dichgans et al., 1998; Peters et al., 2004a). La mayoría de los pacientes tienen de dos a cinco ictus recurrentes a lo largo de varios años, lo cual conlleva dificultades en la

marcha, micción imperiosa y parálisis pseudolobular (Chabriat et al., 1995; Dichgans et al., 1998; Opherck et al., 2004).

Alteración del humor y apatía

Se observan alteraciones en el humor en el 20% de los pacientes con CADASIL y generalmente están presentes como episodios depresivos severos, alternados con episodios maníacos (Baudrimont et al., 1993; Chabriat et al., 1995; Desmond, 2004; Kumar and Mahr, 1997). De otra manera, la apatía, caracterizada por la ausencia de motivación como consecuencia de la disminución del comportamiento voluntario está presente en un 40% de los pacientes (Reyes et al., 2009).

Disfunción cognitiva y demencia

La disfunción cognitiva es la segunda manifestación clínica más frecuente en CADASIL. El signo más temprano en muchos casos es un déficit en la función ejecutora y en la velocidad de procesamiento, lo cual está comúnmente asociado con alteraciones en la atención y la memoria (Buffon et al., 2006; Peters et al., 2004a). Por otro lado, el déficit en la función cognitiva comienza a ser mayor con la edad y se manifiesta con la progresiva aparición de alteraciones en las actividades instrumentales, verbales o en la memoria visual, lenguaje, razonamiento y habilidades espaciales (Buffon et al., 2006).

Otras manifestaciones clínicas

Otras manifestaciones clínicas son menos comunes en CADASIL e incluyen convulsiones (Baudrimont et al., 1993; Chabriat et al., 1995; Desmond, 2004; Dichgans et al., 1998), hemorragias intracerebrales en algunos casos (Baudrimont et al., 1993; Choi et al., 2006) e infartos territoriales (Choi et al., 2006), ceguera (Tournier-Lasserre et al., 1991) y parkinsonismo (Van Gerpen et al., 2003), aunque estos son menos comunes.

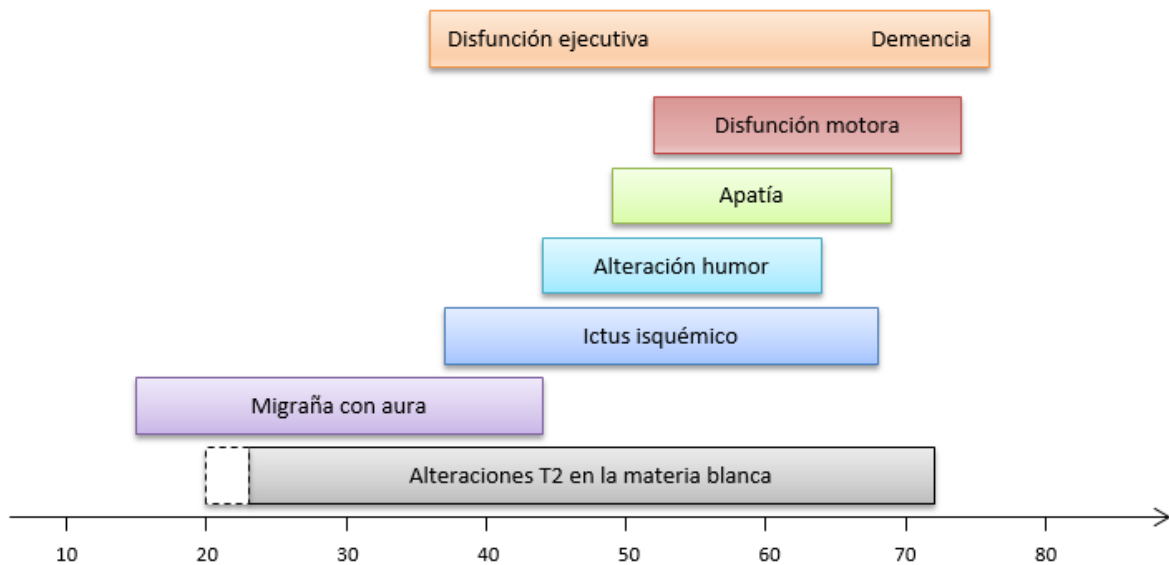


Figura 1. Historia natural de las principales manifestaciones clínicas de CADASIL. La edad exacta de comienzo o de aparición de primeras alteraciones en MRI es desconocida (línea discontinua). La frecuencia de las alteraciones en la materia blanca se incrementa progresivamente y comienzan a ser constantes alrededor de los 35 años en todos los pacientes. Adaptada de (Chabriat et al., 2009a).

El perfil temporal de las manifestaciones clínicas se observa en la Figura 1. Aunque cada una de las cinco manifestaciones puede aparecer individualmente, la mayor parte ocurre en sucesión. La migraña con aura normalmente empieza alrededor de los 30 años, los eventos isquémicos y las alteraciones del humor entre los 40 y 60, y la demencia entre los 50 y 60 años (Bousser and Tournier-Lasserre, 2001; Chabriat et al., 1995; Dichgans et al., 1998; Peters et al., 2004a). Los pacientes tienen dificultades para caminar sobre los 60 años, por lo que se encuentran postrados en cama sobre los 65 años y tienen una esperanza de vida de 65 años en hombres y 71 años en mujeres (Opherck et al., 2004).

1.2.3. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN

La neuroimagen ha jugado un papel muy importante en el estudio de CADASIL casi desde la identificación de su factor causal, de tal manera que su presencia es crucial para el diagnóstico de la enfermedad (Chabriat et al., 1995).

Imagen por Resonancia Magnética (MRI)

Los cambios en el MRI preceden a la aparición de otros síntomas en aproximadamente 10-15 años, normalmente alrededor de los 30 años, aunque se incrementan con la edad y acaban por estar presentes en todos los individuos con mutación en *NOTCH3* después de la edad de

35 años (Bousser and Tournier-Lasserre, 1994; Tournier-Lasserre et al., 1993). Las primeras y más frecuentes anomalías son áreas con una señal incrementada en una resonancia magnética ponderada en T2 o en una imagen FLAIR y que en un primer momento aparecen como formas puntiformes o nodulares, predominantemente en las áreas periventricular y en el semióvalo central. Posteriormente se vuelven más difusas, prácticamente simétricas y en su mayoría se encuentran localizadas en la cápsula externa y en la parte anterior de los lóbulos temporales (Auer et al., 2001; Markus et al., 2002; O'sullivan et al., 2001).

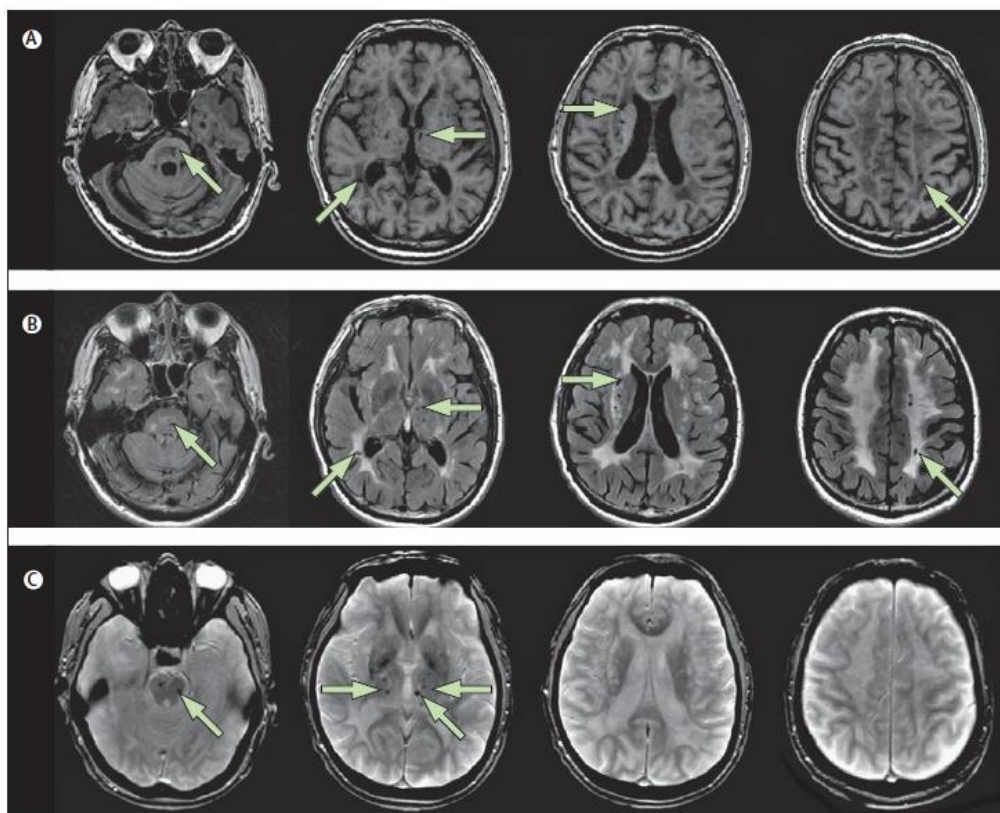


Figura 2. Principales cambios en el MRI de un paciente con CADASIL. (A) Infartos lacunares mostrados en una imagen ponderada T1, localizados principalmente en la base del cráneo, en el tálamo y en el núcleo lentiforme de una mujer de 61 años con historia de ictus, dificultades en la marcha y disfunción ejecutiva con déficit de memoria. (B) Imágenes de recuperación atenuada invertida de pequeños infartos profundos en asociación con hipersensibilidades difusas y confluentes de la materia blanca, lo que involucra a la parte anterior de los lóbulos temporales. (C) Los microinfartos son visibles en una T2* o en imágenes de gradiente como pequeños focos hipointensos en el tálamo y el tronco del encéfalo. Tomada de (Chabriat et al., 2009a).

Los infartos lacunares son variables en forma, tamaño y número y aparecen en una imagen T1 ponderada como áreas puntiformes o amplias con una señal disminuida (Figura 2A). Estos infartos normalmente ocurren en las mismas áreas que los cambios en T2, pero aparecen más tarde en la vida (Figura 2C) (Bousser and Tournier-Lasserre, 1994; Tournier-Lasserre et al., 1993). Otros hallazgos por resonancia magnética incluyen la dilatación de los espacios perivasculares, en ocasiones con un estado criboso predominante en el ganglio basal (Peters

et al., 2006) o la detección de microsangrados por secuencias de ecogradiante (T2*) en un 25-69% de los pacientes.

1.2.4. PATOLOGÍA

Una examinación macroscópica del cerebro muestra cambios típicos de enfermedades crónicas de pequeños vasos del cerebro: palidez difusa de la mielina y rarefacción de la materia blanca hemisférica predominantemente en las áreas periventriculares y en el semióvalo central; infartos lacunares localizados en la materia blanca y en el ganglio basal; y dilatación del espacio de Virchow-Robin. En el córtex, se puede observar apoptosis neuronal (particularmente de las capas tres a cinco) que es más extensiva en presencia de una lesión isquémica de gran tamaño (Viswanathan et al., 2006) (Figura 3).

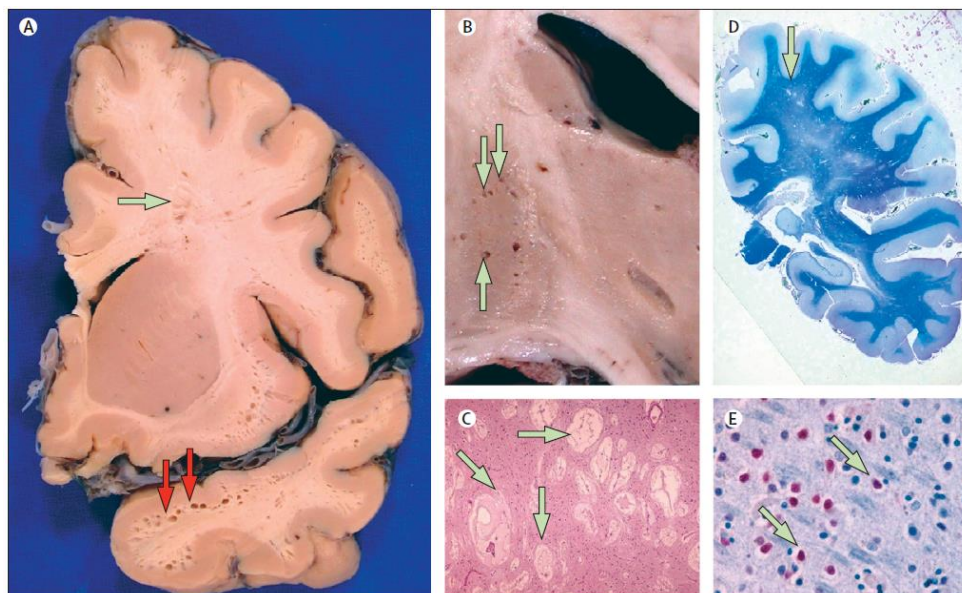


Figura 3. Características patológicas de las lesiones cerebrales en CADASIL. (A) Sección coronal del hemisferio derecho a nivel del núcleo caudal. En la unión cortico-subcortical del lóbulo temporal e insular se pueden observar múltiples infartos lacunares que corresponden a los espacios perivascular dilataados (flechas rojas). Otros microinfartos están presentes en el semióvalo central (flecha verde). (B) Sección macroscópica del estriado y del tálamo que muestra un estado criboso (flechas), con (C) microscopía (hematoxilina y eosina 40x) que confirma la acumulación en los espacios perivascular (flechas). (D) Sección coronal del hemisferio derecho a nivel del núcleo pulvinar. La tinción Kluver-Barrera (violeta cresil luxol) muestra la pérdida de mielina en el semióvalo central y la presencia de pequeños microinfartos lacunares en la materia blanca (flecha). (E) Apoptosis neuronal en la capa 3 de la corteza occipital (técnica TUNNEL). Algunas neuronas están marcadas positivamente, las cuales tienen un núcleo en picnosis (x400; flechas). Tomada de (Chabriat et al., 2009a).

Las investigaciones microscópicas y ultraestructurales (Figura 4) muestran una arteriopatía específica que afecta principalmente a las pequeñas arterias que penetran el cerebro y a las leptomeníngeas. Esta arteriopatía está caracterizada por un engrosamiento de la pared arterial, que produce estenosis del lumen (Haritoglou et al., 2004), ensanchamiento endotelial, la presencia de material granular osmiofílico no-amiloide y la aparición de

alteraciones morfológicas muy evidentes en las células de músculo liso (SMCs) (Baudrimont et al., 1993; Miao et al., 2004; Okeda et al., 2002; Viswanathan et al., 2006).

El material granular osmiofílico, una característica ultraestructural de CADASIL, es extracelular, localizado cerca de la superficie celular de las células de músculo liso, pero ocasionalmente también se puede encontrar en los capilares (Figura 4).

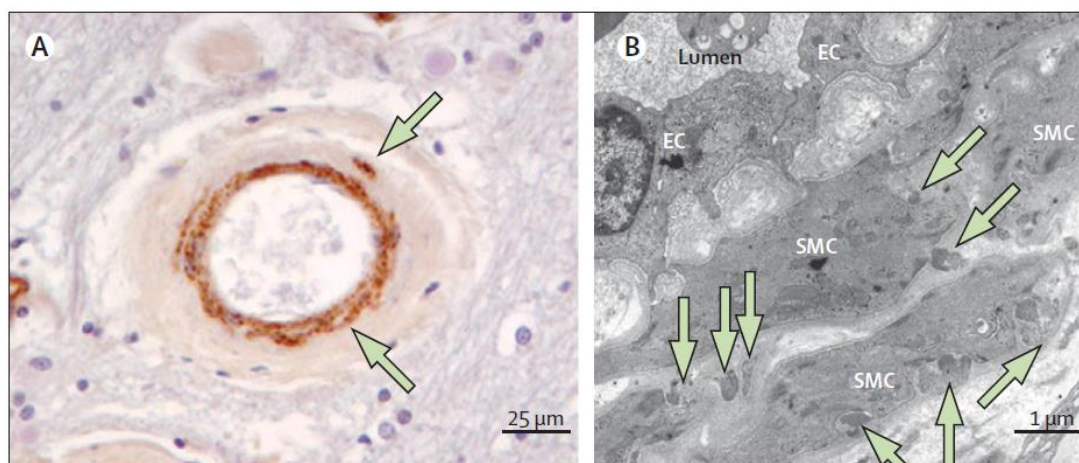


Figura 4. Lesiones arteriales características en CADASIL. (A) Sección de una pequeña arteria del cerebro de la materia blanca inmunomarcada con el anticuerpo 1E4 contra el dominio extracelular de *NOTCH3*. Nótese el engrosamiento de la pared del vaso, la degeneración de las SMCs y la presencia de agregados de *NOTCH3* alrededor de las SMCs residuales (flechas). (B) Micrografía electrónica de una arteria dermal que muestra SMCs irregulares y depósitos de material granular osmiofílico (flechas) localizados en la membrana basal de las SMCs. [EC: célula endotelial, SMC: célula de músculo liso] Tomada de (Chabriat et al., 2009a).

1.2.5. PATOGÉNESIS: *Significado patogénico de las alteraciones morfológicas*

Alteraciones vasculares

Se ha demostrado la presencia de estenosis en las arterias afectadas, pero la patología decisiva – oclusión o trombosis – de las arterias aferentes en las que se produce el infarto lacunar todavía no se ha identificado. En la materia blanca, la estenosis arteriolar es inequívoca y se observa una pérdida de su elasticidad y autorregulación. Por consiguiente, los infartos lacunares podrían también estar causados por alteraciones hemodinámicas a las cuales las arteriolas rígidas no son capaces de responder por dilatación (Miao et al., 2006; Stenborg et al., 2007). Por otro lado, estudios experimentales en ratones transgénicos expresando el mutante de Notch3 p.Glu169Cys (modelo murino preclínico de CADASIL) muestran una disfunción cerebrovascular con disminución en el acoplamiento neurovascular y con una autorregulación del flujo cerebral previa a la aparición de la fibrosis (y estenosis

(Joutel et al., 2010)). De este modo, el problema podría ser también funcional y no solo mecánico.

Alteraciones tisulares

La interpretación de los hallazgos tempranos por MRI de difusión está de acuerdo con el análisis de los cambios microestructurales en ratones transgénicos mutantes para Notch3 (p.Arg169Cys) frente a ratones WT (Cognat et al., 2014a; Joutel et al., 2010). Se ha demostrado que en la materia blanca cerebral, el daño de la mielina precede a la pérdida de oligodendrocitos o al daño de los axones. Estos hallazgos están de acuerdo con la ausencia de un fenotipo visible en estos ratones así como a la presencia de cambios en el MRI vistos en la materia blanca de los pacientes asintomáticos de CADASIL.

1.2.6. GENÉTICA MOLECULAR

CADASIL es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *NOCTH3* (*Notch homolog protein 3*). Este gen codifica un receptor transmembrana (N3) de 2321 aminoácidos. De manera similar al resto de receptores *NOTCH*, Notch3 es sintetizado como proteína completa, la cual sufre una ruptura proteolítica (ruptura S1) por furina, dando lugar a dos dominios. El dominio N-terminal extracelular (N3ECD, 210 kDa) que contiene 34 repeticiones de factor de crecimiento epitelial (EGFR) incluyendo seis residuos de cisteína seguidos de tres repeticiones Notch/Ln12. En los dominios de heterodimerización (HD-N y HD-C), N3ECD está unido no covalentemente con la región C-terminal de 97kDa, que está constituido por un único dominio transmembrana (N3TMD) y un dominio intracelular (N3ICD), que contiene siete repeticiones anquirina (Tikka et al., 2014) (Figura 5).

Se han descrito alrededor de 230 mutaciones en al menos 500 pedigríes. Aunque *NOTCH3* tiene 33 exones, prácticamente todas las mutaciones ocurren en los exones 2 a 24, que codifican las repeticiones EGFR, con una elevada acumulación en los exones 3 y 4, correspondientes a las repeticiones 2-5 de EGFR (>40% de las mutaciones en >70% de las familias ocurren en estos exones). Más del 95% de las mutaciones son mutaciones missense, aunque también existen pequeños indels (inserciones o deleciones) o mutaciones que afectan a un sitio de splicing (Dichgans et al., 2001; Dichgans et al., 2000; Dotti et al., 2004; Joutel et al., 2000; Peters et al., 2005). Sin embargo, lo que todas ellas comparten es que son

mutaciones, casi siempre en heterocigosis que conllevan un número impar de residuos de cisteína en uno de los dominios EGFR (Dichgans et al., 2001; Dichgans et al., 2000; Joutel et al., 1997; Federico et al., 2005; Joutel et al., 2000; Joutel et al., 1997; Peters et al., 2005). Aun así, también se han descrito pacientes (al menos 11 casos) con características clínicas compatibles con CADASIL pero sin mutaciones de cambio de cisteína (Cognat et al., 2014a). Hasta la fecha solo se han encontrado dos pacientes homocigotos para una mutación causante de CADASIL (Liem et al., 2008; Tuominen et al., 2001).

Gen *NOTCH3*

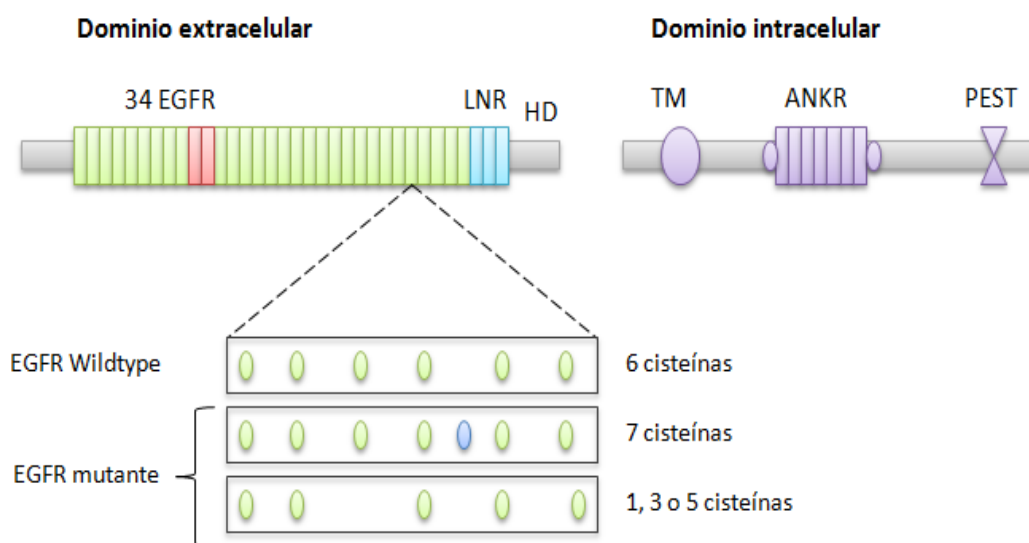


Figura 5. Representación gráfica del receptor *NOTCH3* y de las mutaciones características de CADASIL. (A) Representación de los diferentes dominios de *NOTCH3*. La proteína madura es un heterodímero constituido por un dominio extracelular compuesto por 34 dominios EGFR, tres LNR y un dominio HD, así como una parte transmembrana intracelular que contiene un dominio corto TM, siete dominios ANKR y un dominio PEST. Los dominios EGFR 10 y 11, requeridos para la unión al ligando se muestran en rojo. (B) EGFR normal con sus seis residuos de cisteína (arriba) y EGFR mutado (abajo). Un residuo adicional de cisteína está representado en azul. Las mutaciones causantes de CADASIL en el receptor *NOTCH3* conllevan a un número impar de residuos de cisteína en el EGFR. ANKR=ankyrin repeats. EGFR=epidermal growth factor-like repeat. HD=heterodimerisation domain. LNR=Lin12 repeats. NOTCH3=Notch homolog 3. PEST=sequence that is rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T). TM=transmembrane domain. Adaptada de (Chabriat et al., 2009b).

1.2.7. FUNCIONES Y SEÑALIZACIÓN DE LA PROTEINA *NOTCH3*

La proteína Notch3 pertenece a la familia *NOTCH* (cuatro miembros en mamíferos), cuyas rutas de señalización son indispensables durante el desarrollo de la mayor parte de los órganos. Su importancia está reflejada por la presencia de genes ortólogos con un alto grado de homología desde los nematodos a los humanos. La funcionalidad de Notch durante la organogénesis, incluyendo la vasculogénesis, cubre por ejemplo la renovación de las células madre, la proliferación celular, la determinación del destino celular y la diferenciación y

apoptosis. La función exacta de Notch3 en el adulto todavía no se conoce, pero lo que se sabe es que principalmente se expresa en las células del músculo liso de los vasos (VSMCs) (Joutel et al., 2000; Prakash et al., 2002), cuyo fenotipo molecular y características metabólicas parecen ser diferentes en los diferentes nichos vasculares.

Con respecto al mecanismo de acción de la proteína Notch3, se sabe que una vez sintetizada, sufre constitutivamente una ruptura (rotura S1) en el aparato de Golgi por furina y va hacia la superficie celular para formar el receptor de membrana heterodimérico (N3ECD + N3TMIC).

Los ligandos de los receptores Notch3 son las proteínas Delta/Serrate/Lag2 (DSL), las cuales pertenecen a la familia Delta (DLL1, 3 y 4) y a la familia Jagged (Jag 1 y 29) y tienen una estructura similar a los receptores Notch, puesto que son proteínas transmembrana con un dominio extracelular que contiene varios dominios EGFR. Aunque ambos, ligando y receptor, están presentes en la superficie de las VSMCs, los ligandos transactivan al receptor Notch3 únicamente en las células vecinas (activación en trans), siendo inhibidos en las mismas células (inhibición en cis) (Fleming et al., 2013).

Como consecuencia de la unión con su ligando, N3ECD es disociado no enzimáticamente del heterodímero de Notch3. Entonces, el ligando y N3ECD son transendocitados al interior de la célula que expresa el ligando. De este modo, la región C-terminal de Notch3 (compuesta por N3TMD y N3ICD) pasa a ser expuesta para ruptura proteolítica por ADAM10 o ADAM17 (también conocida como enzima convertora de TNF- α) en la membrana plasmática (ruptura S2), teniendo lugar posteriormente la ruptura final (S3) por la γ -secretasa, lo cual puede ocurrir en la membrana para separar a N3ICD de N3TMD (Bozkulak and Weinmaster, 2009; Nichols et al., 2007). El dominio N3ECD no mutado es degradado por el mecanismo de presentación de ligandos de la célula. En cambio, N3ICD entra en el núcleo de la célula que presenta receptor e interacciona con RBP-JK y otros coactivadores para activar la transcripción de sus genes diana (Fouillade et al., 2013; Fouillade et al., 2012).

Procesado y tráfico de la proteína Notch3 mutante

Se ha sugerido que un procesado y tráfico anormal de la proteína Notch3 mutada podría ser la causa de CADASIL. Como la mayoría de las mutaciones patogénicas llevan a un número impar de residuos de cisteína en un EGFR mutante, la formación de los puentes disulfuro

podría no producirse de manera correcta, produciéndose entonces un plegamiento erróneo de Notch3. Sin embargo, las proteínas mal plegadas parecen escapar al control celular normal, así como a la ubiquitinación y degradación por el proteasoma, y son procesadas correctamente y transportadas a la superficie celular en su estado parcialmente mal plegado. Se ha descrito por ejemplo, que en SMCs cultivadas *in vitro*, la ruptura S1 ocurre de forma normal sin la formación de los agregados, lo que podría sugerir que cuando el receptor todavía se encuentra localizado intracelularmente, las condiciones del Golgi y el retículo endoplasmático son capaces de evitar la multimerización de receptor y la formación de los agregados. Así, una agregación tardía una vez que el receptor se localiza en la superficie de las SMCs podría ser más probable (Dueling et al., 2011; Monet-Lepretre et al., 2013).

Alteraciones en la señalización de Notch3

Aunque muchos estudios previos han mostrado que la proteína Notch3 mutada retiene su señalización canónica, se ha descartado la idea de la pérdida de función como un posible mecanismo patogénico. Esto es debido a que en algunos pacientes, CADASIL es causado por mutaciones en el sitio de unión al ligando, lo que evita la unión del ligando a Notch3. Aun así, el cuadro clínico de estos pacientes, y de aquéllos con mutaciones fuera del sitio de unión, es muy similar. Por ello, es difícil pensar que la pérdida de función pudiera ser la única causa de CADASIL. Esta visión se encuentra respaldada, por ejemplo, por los experimentos de Joutel *et al* (2004) y Peters *et al* (2004), que demostraron *in vitro* que únicamente una mutación específica localizada en el sitio de unión de las repeticiones EGFR de Notch3 (p.Cys428Ser y p.Cys455Arg) exhibía una reducción en la vía de señalización RBP-Lk, mientras que los receptores Notch3 con mutaciones localizadas fuera del sitio de unión presentaban una tasa de señalización cercana a la normalidad. De igual manera, la similitud del fenotipo entre los pacientes homocigotos y heterocigotos para CADASIL (Tuominen et al., 2004), así como la ausencia de mutaciones truncantes en CADASIL (Peters et al., 2004b) parecen afianzar la existencia de otro mecanismo que no sea la pérdida de la función canónica de Notch3.

Ganancia de función tóxica y neomórfica

La mayoría de los estudios de CADASIL parecen favorecer un mecanismo patogénico de tipo neomórfico (ganancia de función) en vez de una pérdida de la función canónica de Notch3. La alteración que es común a todas las mutaciones de CADASIL es la acumulación de

N3ECD en la superficie de las SMCs; ya que un número impar de residuos de cisteína con el consecuente mal plegamiento parcial y/o la glicosilación anormal de Notch3 parecen causar una dimerización aberrante y una elevada tasa de multimerización debido a la formación de puentes disulfuro aberrantes, que resulta en la agregación y depósito de N3ECD en la superficie de las SMCs (Arboleda-Velasquez et al., 2005; Duering et al., 2011; Monet-Lepretre et al., 2013). Este fenómeno de agregación también está demostrado en ratones transgénicos expresando el gen *NOTCH3* humano mutado (p.Arg90Cys o p.Cys438Ser), en ratones expresando el gen homólogo de rata mutado (p.Arg166Cys) y en un modelo murino knock-in expresando la mutación correspondiente en ratón (p.Arg169Cys), la cual permite la acumulación de N2ECD en los SMCs como en los pacientes con CADASIL (Cognat et al., 2014a; Cognat et al., 2014b; Moccia et al., 2015; Monet et al., 2007; Ruchoux et al., 2003).

Puesto que en condiciones normales, N3ECD es transendocitado en el interior de la célula que expresa el ligando, y degradado por medio de la vía de degradación endocítica-lisosomal, la observación de una acumulación anormal de N3ECD en la pared vascular sin acumulación de N3TMIC ha generado la posibilidad de que, debido a la unión del ligando, Notch3 podría evitar la transendocitosis y la consecuente degradación (Watanabe-Hosomi et al., 2012). Sin embargo, se ha observado que tanto los ratones transgénicos como los pacientes portadores de la mutación p.Cys428Ser, que evitan la unión de los ligandos DSL a Notch3, presentan depósitos vasculares de N3ECD (Joutel et al., 2004; Monet-Lepretre et al., 2009). Cómo N3ECD mutado podría causar la degeneración de SMCs y las otras alteraciones patogénicas consecuentes o subsecuentes sigue siendo un mecanismo desconocido.

La mayor parte de los estudios han mostrado que casi ninguna de las mutaciones en Notch3 ni la acumulación de N3ECD comprometen la señalización del receptor, aunque su acumulación parece ser patogénica. Podría ser que la retención del N3ECD mal plegado con un número impar de cisteínas resultase en nuevas interacciones proteína-proteína que indujesen (inactivar o agravar) todavía desconocidas funciones/disfunciones que sean tóxicas para las células del músculo liso de los vasos. Un estudio reciente ha mostrado que los depósitos del dominio extracelular pueden crear una plataforma o actuar como semillas para promover la interacción con las proteínas de la ECM, como el inhibidor de metaloproteinasas de tejido tipo 3 (TIMP3 o *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*), que es capaz de unir y reclutar más

proteínas como la vitronectina, generando nuevas superficies de interacción y magnificando el potencial tóxico de los agregados (Mykkanen et al., 2009).

1.3. CARASIL

El término “**Arteriopatía Cerebral Autosómica Recesiva con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía o CARASIL**” fue propuesto por *Bowler y Hachinski* (Bowler and Hachinski, 1994) para denominar a una enfermedad de características clínicas prácticamente indistinguibles de CADASIL y que únicamente difiere de ella en el tipo de herencia, que es de carácter recesivo (Tikka et al., 2014). Hasta la actualidad, únicamente se han identificado 54 casos (Fukutake, 2011; Nozaki et al., 2014), 48 de Japón, 3 de China (Chen et al., 2013; Wang et al., 2012) y un caso en España (Mendioroz et al., 2010), Rumania (Bianchi et al., 2014) y Turquía (Mendioroz et al., 2010).

La identificación del gen *HTRA1* (*A human serine peptidase 1*) en el cromosoma 10q25 como factor causal de la enfermedad se produjo en 2009 (Hara et al., 2009b). En humanos el gen está compuesto por nueve exones que codifican una proteína de 480 residuos organizados en cuatro dominios funcionales (Figura 7). Los exones 3 a 6 codifican el dominio principal de una serín proteasa tipo tripsina que reprime la señalización de miembros de la familia del factor de crecimiento β por medio de su transformación.

Gen *HTRA1*



Figura 6. Representación gráfica del gen *HTRA1* de humanos. El gen está compuesto por 9 exones, los cuales codifican para 4 dominios funcionales: Dominio de unión a factores de crecimiento tipo insulina (verde), Dominio inhibidor de serín proteasas tipo Kazai (Azul oscuro), Dominio serín proteasa tipo tripsina (Azul claro) y dominio PDZ (Morado).

HTRA1 pertenece a una familia de chaperonas y serín proteasas A que en mamíferos participan en una gran variedad de procesos fisiológicos, como en señalización celular y degradación de proteínas, y en el desarrollo del sistema músculo-esquelético. En condiciones normales, la represión de TGF- β se produce de la siguiente forma: TGF- β 1 es sintetizado como una pre-pro-proteína. En el retículo endoplasmático, proTGF- β 1 se dimeriza y en la red del trans-Golgi (TGN) sufre una rotura proteolítica por una furina convertasa. Los dos productos

proteolizados de proTGF-β1, el péptido asociado a la latencia (LAP) y el péptido TGF-β1 maduro se conectan no covalentemente para generar un pequeño complejo TGF-β1 latente. Este pequeño complejo es unido al factor de crecimiento LTBP1 por LAP formando el gran complejo TGF-β1, que es secretado y secuestrado por la matriz extracelular. Diferentes proteasas/integrinas en la ECM son capaces de proteolizar a LAP para liberar el TGF-β maduro, que entonces podrá unirse a sus receptores (Nozaki et al., 2014; Shiga et al., 2011; Todorovic and Rifkin, 2012) (Figura 7).

HTRA1 reprime la señalización mediada por TGF-β por medio de la proteólisis de proTGF-β1 en el retículo endoplasmático y de la degradación de los productos por el sistema de degradación de proteínas asociado al retículo endoplasmático (ERAD), lo que resulta en una reducción del TGF-β1 maduro (Nozaki et al., 2014; Shiga et al., 2011; Todorovic and Rifkin, 2012) (Figura 7).

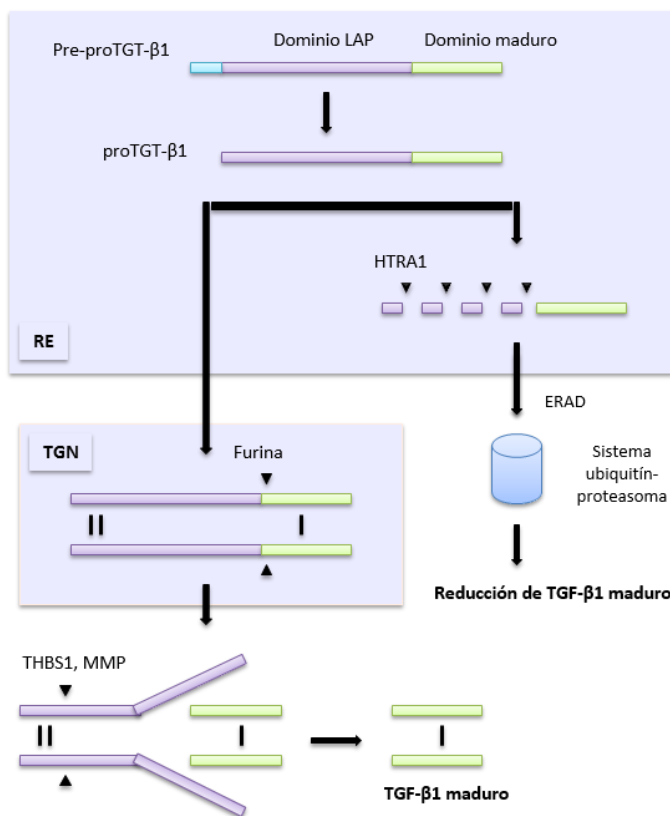


Figura 7. Modelo de regulación de la síntesis de TGF-β por HTRA1. TGF-β es sintetizado como una pre-pro-proteína con un péptido señal (gris), el cual sufre un proceso de proteólisis en el RE. La proteína proTGF-β1 resultante es proteolizada por la furina convertasa (flechas negras) en el interior de la red trans-Golgi (TGN). El producto resultante es un pequeño complejo TGF latente, al cual se encuentran asociados el péptido asociado a la latencia (LAP, naranja) y el péptido maduro (rojo) de manera no covalente. Este complejo es secretado en el espacio extracelular y unido a la matriz extracelular. La trombospondina 1 (THBS1), las metaloproteinasas de matriz (MMP) y las serín proteasas pueden proteolizar a LAP (flechas negras) para liberar el TGF-β1 maduro. Por otro lado, HTRA1 puede proteolizar a pro-TGF-β1 en el retículo endoplasmático, de manera que el producto resultante es degradado por el sistema ubiquitina quinasa, resultando en la reducción del TGF-β1 maduro.

Se ha visto que las mutaciones en *HTRA1* asociadas a CARASIL presentan una actividad proteasa disminuida, siendo incapaces de disminuir la señalización mediada por TGF-β. Además, se observan también acumulaciones de TGF-β1 y de fibronectina ED-A y de versicano, inducidos por un aumento de la señalización de TGF-β en la capa íntima de las pequeñas

arterias cerebrales de los pacientes de CARASIL. En conjunto esto podría indicar que el incremento de la señalización mediada por TGF- β juega un importante papel en la patogénesis de esta enfermedad, aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre esto (Hara et al., 2009a).

La patología cerebrovascular en CARASIL recae, al igual que en CADASIL, en las pequeñas arterias penetrantes, principalmente en la WM del cerebro y en el ganglio basal (Arima et al., 2003; Fukutake, 2011). Histopatológicamente, las arterias muestran arterioesclerosis avanzada, pero sin que se observen microscópicos gránulos basófilos en la túnica media o GOM en los SMCs como en CADASIL. La túnica íntima muestra engrosamiento fibrótico, la lámina interna está fragmentada, y la lámina media revela pérdida de SMCs con una hialinización subsecuente. La patología vascular resulta en infartos isquémicos multifocales al igual que en cambios isquémicos difusos, especialmente en la WM cerebral, con una consecuente atrofia moderada.

1.4. NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Los términos *Next-generation sequencing* (NGS), secuenciación de segunda generación o secuenciación masiva hacen referencia a una serie de plataformas que comparten una característica común, la capacidad para secuenciar paralelamente de manera masiva moléculas de DNA individuales o amplificadas clonalmente que se encuentran separadas espacialmente. En NGS, la secuenciación se lleva a cabo por medio de la repetición de ciclos de adición de nucleótidos a una cadena creciente o por medio de ciclos iterativos de ligación de oligonucleótidos. Como un proceso de secuenciación masiva en paralelo, las tecnologías NGS generan de cientos de megabases a gigabases de datos de secuencias en un único aparato, consiguiendo reducir así el tiempo y coste del proceso de secuenciación.

1.4.1. ION TORRENT PGM

De entre todas las tecnologías de secuenciación de segunda generación desarrolladas hasta el momento, para la realización de este trabajo se ha utilizado el secuenciador Ion Torrent Personal Genome Machine™ (Thermo Fisher). La base química en la que se constituye este secuenciador es la transformación directa de la información codificada químicamente (A, C, G, T) en información digital (0, 1) por medio de un chip semiconductor. Dicha

transformación se basa en la liberación de un protón como resultado de la adición de un nucleótido a la cadena de DNA durante el proceso de replicación. La carga de ese ión produce un cambio en el pH de la solución en la que se está produciendo la reacción, que es detectable por los sensores presentes en el chip (Rothberg et al., 2011) (Figura 8).

Principalmente, el secuenciador Ion Torrent PGM (Thermo Fisher) funciona estableciendo un flujo secuencial de nucleótidos, de tal manera que únicamente el nucleótido correspondiente será capaz de unirse a la cadena, produciéndose la liberación de un protón y el consiguiente cambio de pH. Esto permite detectar el nucleótido que se ha añadido en cada punto de la cadena y determinar la secuencia de la misma (Rothberg et al., 2011).

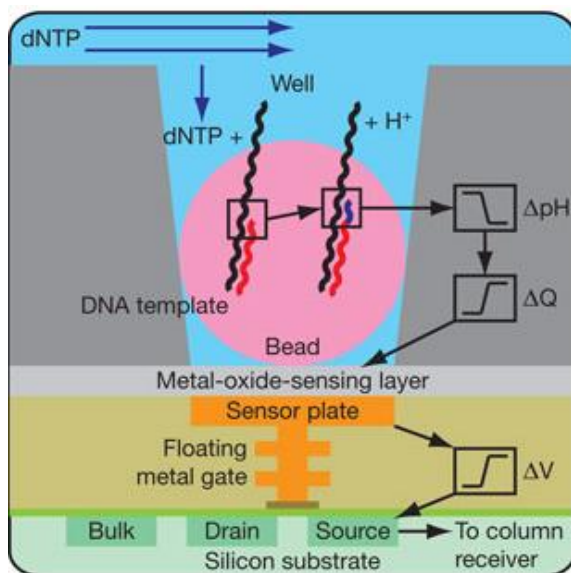


Figura 8. Figura simplificada de un pocillo, una gota conteniendo la muestra de DNA y el sensor. Los protones (H^+) son liberados cuando los nucleótido (dNTPs) se incorporan a la cadena creciente de DNA, cambiando el pH del pocillo (ΔpH). Esto induce un cambio en el potencial de superficie sensora de la capa subyacente y en el potencial del transistor (ΔV). Tomada de (Rothberg et al., 2011).

II. OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Realización de un screening mutacional de los genes *NOTCH3* y *HTRA1* en una población de pacientes con fenotipo sugerente de CADASIL/CARASIL con la finalidad de encontrar nuevas mutaciones causantes de la enfermedad.
- Desarrollo y validación de un procedimiento de secuenciación en pools de pacientes de los genes *NOTCH3* y *HTRA1* asociados al fenotipo CADASIL/CARASIL.

III. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

El estudio incluyó un total de 80 pacientes, todos ellos remitidos al HUCA para identificar mutaciones en el gen *NOTCH3* debido a que presentaban características clínicas de CADASIL (Figura 1) y un estudio de imagen por MRI sugerente de enfermedad de los vasos pequeños (*small vessel disease, SVD*). En estos pacientes, la media de edad de inicio de la enfermedad era de 56 (± 20) años, un 40% eran varones y un 30% de los pacientes tenían historia familiar de CADASIL reconocida.

La población de pacientes seleccionados estaba compuesto por dos subpoblaciones, en función de si presentaban o no mutaciones en los exones más comúnmente mutados:

- **Subpoblación problema** - Pacientes con características clínicas sugerentes de CADASIL y con antecedentes familiares de la enfermedad, pero sin mutaciones en los exones más comúnmente mutados ($n = 68$).
- **Subpoblación control** - Pacientes con características clínicas de CADASIL y con antecedentes familiares de la enfermedad, los cuales presentan una mutación característica de CADASIL en los exones más comúnmente mutados ($n = 12$). Son utilizados como control positivo para determinar la sensibilidad y especificidad del método.

Para llevar a cabo el protocolo de NGS, se dividió a la población en 8 pools de DNA, cada uno conteniendo DNA de 10 pacientes.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA se extrajo de muestras de 10 ml de sangre periférica que fue tomada de pacientes y controles en un tubo de hemograma que contiene anticoagulante EDTA. Se utilizó el método de precipitación salina (Miller et al., 1988).

En primer lugar se produce la lisis de los eritrocitos, la cual se realiza mezclando la sangre con un volumen igual de solución de lisis de eritrocitos (RBC) en un tubo *Falcon* e incubando la mezcla en nevera a 4 °C durante 20 minutos. A continuación se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm, se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende con RBC para realizar una nueva lisis durante 10 minutos a 4 °C. Se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante, quedando un precipitado de leucocitos en el fondo del tubo. Posteriormente se lleva a cabo la lisis de leucocitos. Se resuspende el precipitado de leucocitos con 9 ml de tampón de lisis de leucocitos WCLB 1X (Tris-HCl pH=7.6 10mM; EDTA pH=8 10mM; NaCl 50mM), 1 ml de SDS al 10% y 400 µl de proteinasa C (*Pronasa*, 20 mg/ml) y se incuba a 37°C durante 12 horas. Al día siguiente se procede a eliminar las proteínas y otros restos orgánicos precipitándolos con 2 ml de NaCl 6M, sometiéndolos a agitación enérgica durante 1 minuto aproximadamente y centrifugación a 3500 rpm 15 minutos. Finalmente el sobrenadante donde se encuentra el DNA se transvasa a un tubo de polipropileno estéril de 50 ml y se precipita por adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se realiza un lavado con etanol al 70%, se centrifuga y se extrae el alcohol con ayuda de una pipeta Pasteur. La “medusa” de DNA se recoge con una punta de micropipeta y se deposita en un Eppendorf con agua destilada y azida. Tras eliminar el etanol se resuspende en agua destilada durante 2 días a 4°C.

3.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

A partir del DNA de los pacientes en primer lugar se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de rutina de los exones más comúnmente mutados, como serían los exones 3-6 del gen *NOTCH3*. En resumen, estos exones fueron amplificados por PCR con cebadores que hibridaban en la región intrónica adyacente (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de los exones más comúnmente mutados en CADASIL.

Gen	Exón	Primers		Tª de hibridación (°C)
		Forward	Reverse	
<i>NOCTH3</i>	3 - 6	CCCTGCGTGTTTCTTGCCT	GCCCTCACTAAAAACCATCCATG	58
<i>NOTCH3</i>	10 -11	GGCTGGAGAGGGGTGTACTG	CCCCACTAGATGCACCATTC	58
<i>NOTCH3</i>	18- 19	ACTCAGGAAGGAGGGCAGG	GGCTCACACTAGCAGGAGGTAC	58

3.2.3. SECUENCIACIÓN SANGER

Los fragmentos amplificados fueron purificados por medio de un kit ATP™ PCR Fragment DNA Extraction y secuenciados por la tecnología BigDye en un equipo ABI3130x1 (Applied Biosystems). Una vez obtenidas, las secuencias de los fragmentos de cada paciente fueron comparadas con su referencia en la base de datos *Ensembl* (www.ensembl.org) para identificar las variantes más comúnmente asociadas con CADASIL.

3.2.4. SECUENCIACIÓN ION TORRENT

El DNA de los 80 pacientes se ajustó a una concentración final de 10 ng/μl, lo cual se llevó a cabo utilizando la cuantificación por Taqman Real Time con RNase P Detection Reagents (FAM™) (Life technologies) en un sistema de PCR Real Time 7500 (Applied Biosystems). Una vez ajustados los DNA, se crearon un total de 8 pools de DNA, cada uno compuesto por 10 μl de 10 muestras distintas de DNA. El número de las muestras usadas para crear los pools fue determinada teniendo en cuenta la capacidad de carga de los chips de NGS y la longitud total de los genes a amplificar *NOTCH3 +HTRA1* (aprox. 9 kb), con el objetivo de conseguir una cobertura 50X (número de lecturas por amplicón) que se considera el mínimo valor necesario para identificar un único alelo raro en el interior de un pool (dilución de alelos 1/20).

A continuación, se diseñó online un protocolo de amplificación múltiple (*Ampliseq*), mediante el software *Ion AmpliSeq™ Designer v2.2* (<https://www.ampliseq.com>) para amplificar toda la región codificante más al menos cinco nucleótidos intrónicos flanqueantes de los genes *NOTCH3* y *HTRA1* (Tabla suplementaria 1). Los pares de primers utilizados para amplificar un total de 70 fragmentos fueron proporcionados por el fabricante en dos tubos. Los amplicones cubrían más del 90% de la secuencia diana (Tabla suplementaria 2; Tabla

suplementaria 3). Cada pool de DNA fue amplificado utilizando el kit comercial Ion Ampliseq™ Library Kit 2.0 siguiendo los protocolos Ion Ampliseq™ Custom Primer Pool establecidos por el fabricante (Thermo Fisher), y siguiendo los pasos indicados: PCR en dos tubos, digestión parcial de los primers, ligación de los adaptadores con códigos de barras o “*barcodes*”, purificación y cuantificación de la muestra.

Una vez cuantificados los pools de DNA, todos ellos fueron ajustados a 100 pM, de tal manera que se juntaron volúmenes equivalentes en un tubo y posteriormente se diluyeron a una concentración final de 8 pM. A partir de esto se llevó a cabo una amplificación clonal en la superficie de unas partículas Ion Sphere™ por medio de una PCR en emulsión, utilizando el kit Ion PGM template OT2 200 y el aparato Ion One-Touch 2 (Thermo Fisher). Las esferas positivas enriquecidas en fragmentos amplificados fueron recogidas y cuantificadas usando las bolitas de streptavidina C1 de Dynabeads MyOne y el fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies).

Los productos del enriquecimiento fueron cargados, en este caso, en dos chips Ion Torrent 318 v2 donde tiene lugar el proceso de secuenciación. La NGS fue realizada utilizando el kit PGM 200 sequencing v2 siguiendo el protocolo del Ion Torrent PGM. Además, se utilizó un flujo secuencial de 500 nucleótidos por carrera, lo que permite un tamaño de lectura de aproximadamente 200 nucleótidos.

Una vez que los datos fueron generados por el secuenciador, se transfirieron automáticamente a un servidor Ion Torrent. En el mismo servidor, los datos son procesados para codificar la información química en información digital.

3.2.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE NGS Y VALIDACIÓN DE LAS MUTACIONES

Los datos brutos obtenidos de PGM fueron procesados con el software Torrent Suite v4.2 (Life technologies) para generar lecturas de secuencias filtradas por los controles de calidad del software. Tras el alineamiento de las lecturas mediante el Ion Ampliseq Designer BED file con el genoma de referencia, se llevó a cabo la identificación de las variantes por medio del software Variant Caller 4.2 (VC), utilizando los archivos FastQ que contienen las secuencias de las lecturas. Por otro lado, el Integrative Genome Viewer (IGV, Broad Institute) fue utilizado para el análisis de la cobertura, la calidad de las secuencias y la identificación de variantes.

Las variantes nucleotídicas (SNV) fueron identificadas mediante el algoritmo VC para muestras somáticas e inspeccionadas manualmente a partir de los archivos BAM de los amplicones que contenían las variantes reconocidas. Para cada mutación en los pools, se amplificaron todos los pacientes del pool individualmente con primers que flanquean los intrones de los genes *NOTCH3* y *HTRA1* (Tabla 3) y los amplicones fueron secuenciados por medio de la tecnología química BigDye en un secuenciador ABI3130 (Life Technologies) para identificar al portador de la mutación.

Tabla 3. Secuencia de los primers utilizados para la identificación de los portadores de las mutaciones determinadas por NGS.

Gen	Exón	Primers		Tª de hibridación (°C)
		Forward	Reverse	
<i>HTRA1</i>	1	ACGCGTGCGGCTGCTGGCGA	GTTGCCCTGGCCACCCAC	60
<i>HTRA1</i>	6	CTCCTTGCATCTCCCCACTTCGA	CATTCCCCTTCACTTCTGGATCAGA	58
<i>NOTCH3</i>	3 - 6	CCCTGCGTGTTCCTTGCT	GCCCTCACTAAAAACCATCCATG	58
<i>NOTCH3</i>	9	ATTAAGGTTGGGCTGGGAGTGTAGA	CATATGGTTTCTATTGTAAGTTATCCGCTAAC	58
<i>NOTCH3</i>	16	ACCTCATAGTAGGTATTTGCCACCTAC	CCTCGGGCCTCAGTTTCCATATAAATA	58
<i>NOTCH3</i>	10 -11	GGCTGGAGAGGGGTGACTG	CCCCACTAGATGCACCATTC	58
<i>NOTCH3</i>	18- 19	ACTCAGGAAGGAGGGCAGG	GGCTCACACTAGCAGGAGGTAC	58
<i>NOTCH3</i>	23	AGACATCAATGAGTGTCGCTCAGG	GCATTTTCCAGAACTCCCTTCCC	57
<i>NOTCH3</i>	33	CCCAGGTCTGTCAAGCTCCAG	CACGCTGCAAGGCAAGGATGC	58

IV. RESULTADOS

Para la realización de este estudio se reclutaron 80 pacientes en total, todos ellos con características clínicas de CADASIL y con un estudio de imagen por MRI sugerente de enfermedad de vasos pequeños. En esta población, la media de edad de inicio de la enfermedad era de 56 (± 20) años, un 40% eran varones y un 30% de los pacientes tenían historia familiar de CADASIL reconocida.

A partir del DNA de los pacientes se crearon 8 pools de DNA, cada uno compuesto por 10 muestras distintas de DNA. A continuación cada pool de DNA fue fragmentado, amplificado y se le ligaron adaptadores con códigos de barras o “*barcodes*”, diferentes para cada uno, permitiendo así identificar el pool del cual provienen todas las lecturas una vez obtenidos los datos de la secuenciación. Después de la purificación y cuantificación de las muestras, se llevó a cabo una amplificación clonal en la superficie de unas esferas por medio de PCR en emulsión. Las esferas positivas enriquecidas en fragmentos amplificados fueron recogidas y cargadas, en este caso, en dos chips Ion Torrent 318 v2 donde tuvo lugar el proceso de secuenciación.

El protocolo de secuenciación incluía una amplificación múltiple, con primers diseñados para amplificar todos los exones de los genes *NOTCH3* (33 exones) y *HTRA1* (9 exones). Como se puede observar en la Figura 9, todos los amplicones de los genes *NOTCH3* y *HTRA1* dieron al menos lecturas en el rango de las 200 nucleótidos (10X por alelo en cada pool de DNA), con un promedio de 483X de cobertura.

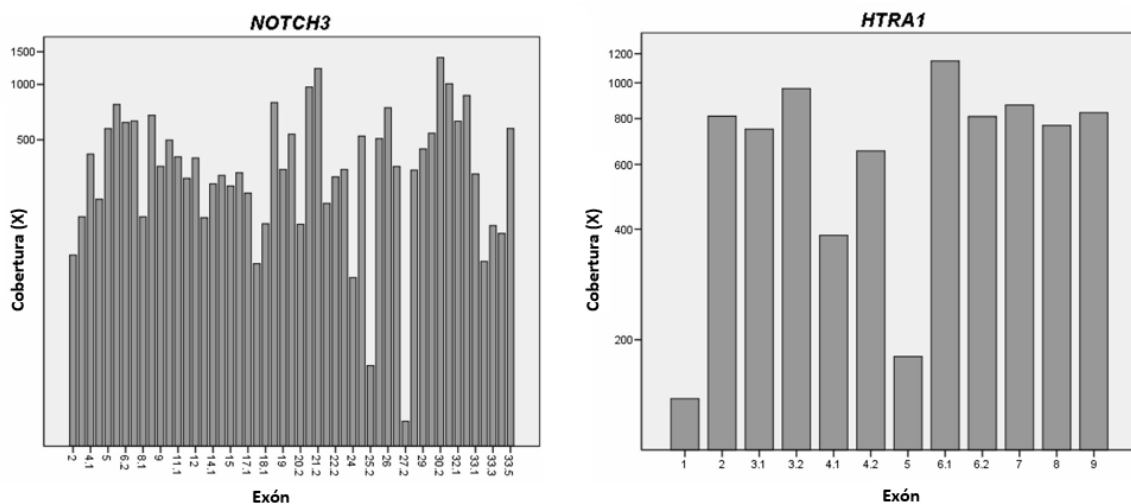


Figura 9. Detalles de cobertura (número de nucleótidos leídos) para los amplicones *NOTCH3* y *HTRA1* en uno de los pools de DNA.

En primer lugar y con lo que respecta al gen *NOTCH3*, de todos los pacientes incluidos en el estudio, el análisis identificó 76 variantes nucleotídicas tipo SNV (Tabla suplementaria 4), entre las cuales se encontraban todas las mutaciones de los pacientes control (Tabla 4), previamente identificadas por secuenciación Sanger.

Además de las variantes control, se determinaron variantes adicionales tipo missense en los exones 9 (p.Ser497Leu), 21 (p.His1133Gln), 22 (p.Val1183Met), 23 (p.Cys1250Trp), 32 (p.Val1952Met) y 33 (p.Ala2223Val y p.Pro2178Ser) (Tabla 4), todas ellas verificadas posteriormente por secuenciación Sanger.

Sin embargo, de todas ellas únicamente las variantes p.Cys1250Trp (exón 23) y p.Pro2178S (exón 33) son variantes no descritas con anterioridad en las bases de datos (Figura 10).

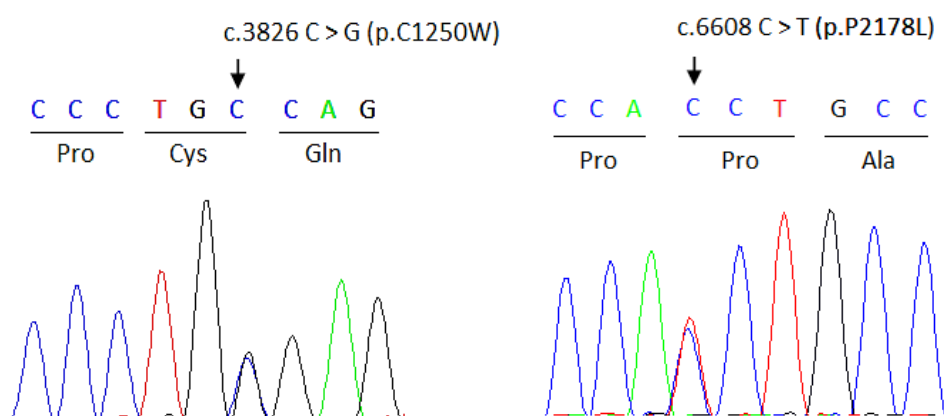


Figura 10. Electroferograma de las variantes no descritas, p.C1250W (exón 23) y p.P2178S (exón 33), encontradas en el gen *NOTCH3*.

Una paciente de 63 años de edad era heterocigota para la variante p.Cys1250Trp localizada en el exón 23 (Figura 10). Este exón forma parte de los exones codificantes de los dominios EGFR (2-24). Hasta la fecha se ha visto que, principalmente, son las mutaciones que ocurren en estos dominios y que están relacionadas con una ganancia o pérdida de un residuo de cisteína las que están implicadas en la patogénesis de la enfermedad de CADASIL. Se piensa que esto podría ser debido a la aparición de puentes disulfuro anormales en la proteína (Dueling et al., 2011), que se cree que causan la multimerización de proteínas anormales que acaban por acumularse en la túnica media de las paredes de los vasos (Dichgans et al., 2000; Joutel et al., 2010).

Los hechos expuestos, añadidos a la ausencia de otras mutaciones en este individuo y a que las predicciones determinan a esta variante como patogénica, nos permiten proponer a

la variante p.Cys1250Trp como posible mutación causante del fenotipo de su portador. Sin embargo, no es posible afirmar con seguridad la veracidad de su carácter patogénico, puesto que para ello sería necesario el desarrollo de experimentos de validación funcional, junto a una segregación familiar positiva.

Por otro lado, dos pacientes eran heterocigotos para p.Pro2178Ser (c.6532C>T en exón 33), la cual es una variante no descrita anteriormente (www.ensembl.org) pero que fue clasificada con un efecto patogénico desconocido por el Polyphen-2. Puesto que la totalidad de las mutaciones descritas en CADASIL son mutaciones que implican un residuo de cisteína y se encuentran concentradas entre los exones 2-24, los cuales codifican los dominios EGFR, es difícil asignarle a esta variante un efecto en el desarrollo de la enfermedad. Podría tratarse de un polimorfismo de tipo SNV con una muy baja frecuencia poblacional.

En referencia al gen *HTRA1*, se encontraron 20 variantes tipo SNV (Tabla suplementaria 4). De todas ellas, únicamente dos eran cambios no descritos de tipo missense (p.Ser139Ala, c.415T>G y p.Arg670Gln, c.1109G>A) (Figura 11). Ambas fueron validadas por secuenciación Sanger para determinar el portador, y se encontró que el portador de la mutación p.Arg670Gln (exón 23), presenta además una mutación patogénica (p.Arg558Cys) en el exón 11 del gen *NOCTH3*.

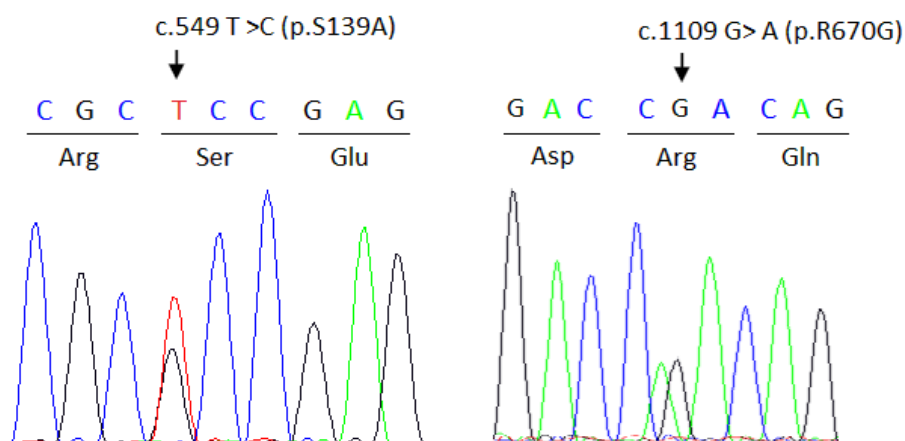


Figura 11. Electroferograma de las variantes no descritas, p.Ser139Ala (exón 1) y p.Arg670Gln (exón 6) encontradas en el gen *HTRA1*.

Una paciente mujer de 45 años era heterocigota para la variante p.Ser139Ala, clasificada como neutral en un análisis bioinformático (Polyphen-2). Este cambio de nucleótido está localizado en el exón 1 de *HTRA1*, que codifica para el dominio de unión del factor de crecimiento tipo insulina, donde no ha sido descrita ninguna mutación anteriormente. Estos

hechos, junto con la ausencia de una segunda mutación en el gen relacionada con la forma recesiva de la enfermedad sugieren que la variante p.Ser139Ala es una variante rara no patogénica.

De igual manera, se identificó en un paciente otra variante p.Arg370Gln, que se localiza en el exón 6, y codifica para el dominio serín proteasa tipo tripsina (Figura 11). Este dominio es el encargado de determinar la actividad proteolítica de la proteína y es dónde se han visto la mayor parte de las mutaciones asociadas a la enfermedad de CARASIL. Si además se tiene en cuenta que el software Polyphen-2 predice el posible carácter patogénico de esta variante, se podría pensar que se trata de una mutación, implicada en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la presencia de una mutación patogénica (p.Arg558Cys) en el exón 11 del gen *NOTCH3* de tal paciente hace cuestionar su efecto en la patogenia de la enfermedad, por lo que sería necesario realizar el genotipado de amplias poblaciones de pacientes con fenotipo sugerente de CADASIL-CARASIL para determinar su frecuencia poblacional y su implicación en la enfermedad. Sin embargo, debido al carácter recesivo de la enfermedad, la probabilidad de encontrar algún otro caso con esta variante es muy reducida, aunque se dispusiese de una cohorte de pacientes amplia, por lo que serían necesarios estudios funcionales que permitiesen establecer una relación causal entre el fenotipo y la mutación. Por último, la identificación de la totalidad de las variantes control de los pacientes por medio de este procedimiento nos permite establecer una sensibilidad del 100%. En cuanto a la especificidad, la validación de todas las mutaciones encontradas por medio de la secuenciación Sanger indica una también elevada especificidad.

Tabla 4. Variantes missense de los genes HTRA1 (cromosoma 10) y NOTCH3 (cromosoma 19). Para los polimorfismos de nucleótido (SNPs) el número rs y la frecuencia del alelo menor (MAF) para los caucásicos están indicados.

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>Exón</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Proteína</i>	<i>MAF</i>	<i>dbSNP</i>
<i>HTRA1</i>	chr10:124221583	1	c.415T>G	p.Ser139Ala	-	-
<i>HTRA1</i>	chr10:124268275	6	c.1109G>A	p.Arg370Gln	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15303260	3	c.268C>T	p.Arg90Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15303315	3	c.213G>T	p.Trp71Cys ^a	-	rs28937321
<i>NOTCH3</i>	chr19:15303005	4	c.445G>T	p.Gly149Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302831	4	c.619C>T	p.Arg207Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302962	4	c.488G>A	p.Arg163Gln ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302993	4	c.457C>T	p.Arg153Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302999	4	c.451C>G	p.Gln151Glu ^a	-	rs371491165
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302439	6	c.832T>C	p.Cys278Arg ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15302277	6	c.994C>T	p.Arg332Cys ^a	-	rs137852641
<i>NOTCH3</i>	chr19:15299896	8	c.1282T>A	p.Cys428Ser ^a	-	rs267606915
<i>NOTCH3</i>	chr19:15299048	9	c.1490C>T	p.Ser497Leu	0.006	rs114207045
<i>NOTCH3</i>	chr19:15298084	11	c.1672C>T	p.Arg558Cys ^a	-	rs75068032
<i>NOTCH3</i>	chr19:15297937	11	c.1819C>T	p.Arg607Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15295261	16	c.2411G>A	p.Gly804Asp	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15291825	18	c.2941C>T	p.His981Tyr	-	rs143695196
<i>NOTCH3</i>	chr19:15291576	19	c.3058G>C	p.Ala1020Pro	0.084	rs35769976
<i>NOTCH3</i>	chr19:15291543	19	c.3091C>T	p.Arg1031Cys ^a	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15290236	21	c.3399C>A	p.His1133Gln	0.006	rs112197217
<i>NOTCH3</i>	chr19:15290007	22	c.3547G>A	p.Val1183Met	0.067	rs10408676
<i>NOTCH3</i>	chr19:15289721	23	c.3750C>G	p.Cys1250Trp	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273335	32	c.5854G>A	p.Val1952Met	0.008	rs115582213
<i>NOTCH3</i>	chr19:15271771	33	c.6668C>T	p.Ala2223Val	0.368	rs1044009
<i>NOTCH3</i>	chr19:15271907	33	c.6532C>T	p.Pro2178Ser	-	-

Tránscrios de Ensembl (www.ensembl.org) ENST00000368984 (HTRA1) y ENST00000263388 (NOTCH3).^amutaciones conocidas encontradas en los pacientes de CADASIL.

V. DISCUSIÓN

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación ha abierto nuevas puertas para los análisis a escala genómica. Se ha demostrado que NGS es una tecnología que permite la identificación de diversos genes a la vez en trastornos hereditarios con heterogeneidad genética con un bajo número de pacientes afectados y con costes cada vez más reducidos en el diagnóstico molecular de los pacientes (Metzker, 2010).

Entre todas las plataformas de secuenciación, Ion Torrent ofrece las potenciales ventajas de incluir instrumentos de bajo coste, reducir el precio de secuenciación por base y acelerar el proceso de producción de datos (333Mbp/h). Ion Torrent también ha sido descrito como una buena herramienta para la identificación de variantes (Quail et al., 2012), con una sensibilidad alta (Li et al., 2013) siempre y cuando la cobertura sea suficiente.

En la actualidad, el método diagnóstico preferido para la determinación de enfermos de CADASIL es la resonancia magnética. Las lesiones detectables con este sistema se encuentran concentradas alrededor de los ganglios basales y la sustancia blanca periventricular y se pueden observar también en individuos que sufren la mutación del gen *NOTCH3* sin presentar síntomas.

La enfermedad también se puede diagnosticar por medio de la identificación las mutaciones en el gen *NOTCH3*, las cuáles han sido descritas como causantes de la patología (Dichgans et al., 2001; Dichgans et al., 2000; Federico et al., 2005; Joutel et al., 2000; Joutel et al., 1997; Peters et al., 2005). De esta manera, es posible realizar un screening por secuenciación Sanger de los exones que presentan una mayor proporción de las mutaciones patogénicas en *NOTCH3*, como serían los exones 3, 4, 6 y 11 en la población caucásica (Amberla et al., 2004; Arboleda-Velasquez et al., 2011; Arboleda-Velasquez et al., 2005; Arima et al., 2003; Chabriat et al., 2009a; Chen et al., 2013). Este método es, sin embargo, costoso y laborioso y todavía no es utilizado en muchos laboratorios a pesar de que están descritas gran cantidad de mutaciones causantes de la misma.

En el caso de la forma recesiva de la enfermedad - CARASIL-, el diagnóstico genético no se considera un criterio de diagnóstico sino la resonancia magnética, puesto que se conocen muy pocas mutaciones asociadas a la enfermedad y de muchas de ellas se desconoce la patogenia.

Debido a la dificultad para distinguir ambas enfermedades por sus características clínicas y como consecuencia del elevado coste de los métodos de diagnóstico actuales tanto por resonancia magnética como por secuenciación de los dos genes implicados (*NOTCH3* y *HTRA1*) por los métodos de secuenciación clásicos, en el presente estudio se describe un método de screening de ambos genes en conjunto que permite, de igual modo, con una elevada sensibilidad y especificidad, reducir el tiempo y abaratar los costes del proceso de secuenciación. En este sentido, los protocolos de secuenciación por NGS descritos hasta la fecha para el diagnóstico de pacientes se basan en la amplificación de los productos de pacientes individualmente, seguido del marcado de los productos de PCR por medio de unos primers con barcode específico y de la secuenciación de los mismos. Sin embargo, en el trabajo aquí presentado se ha procedido a la secuenciación por pools de DNA de varios pacientes, con la consiguiente reducción del coste y el esfuerzo a la hora de secuenciar grandes grupos de pacientes, lo que podría representar un método de screening coste-efectivo en individuos sospechosos de una herencia familiar de estas patologías.

VI. CONCLUSIONES

Teniendo en consideración los antecedentes del estudio de estas dos patologías y según los resultados de este trabajo, se establecen las siguientes conclusiones:

- El screening mutacional de nuestra población de pacientes con fenotipo sugerente de CADASIL/CARASIL establece únicamente una mutación en el gen *NOTCH3* no descrita, de posible carácter patogénico y causante de la enfermedad en su portador. Estudios funcionales adicionales permitirían establecer el carácter patogénico y el fenotipo asociado a esta mutación.
- Ninguna de las variantes encontradas en el gen *HTRA1* por medio del espectro mutacional realizado cumple los requisitos necesarios para considerarse una mutación causante de la patología.
- El procedimiento NGS por medio de la estrategia de agrupación de pacientes con un fenotipo sugerente de CADASIL/CARASIL permitiría una reducción del tiempo y de los costes del diagnóstico de estos pacientes.

VII. REFERENCIAS

Amberla, K., Waljas, M., Tuominen, S., Almkvist, O., Poyhonen, M., Tuisku, S., Kalimo, H., and Viitanen, M. (2004). Insidious cognitive decline in CADASIL. *Stroke* 35, 1598-1602.

Arboleda-Velasquez, J.F., Manent, J., Lee, J.H., Tikka, S., Ospina, C., Vanderburg, C.R., Frosch, M.P., Rodriguez-Falcon, M., Villen, J., Gygi, S., *et al.* (2011). Hypomorphic Notch 3 alleles link Notch signaling to ischemic cerebral small-vessel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E128-135.

Arboleda-Velasquez, J.F., Rampal, R., Fung, E., Darland, D.C., Liu, M., Martinez, M.C., Donahue, C.P., Navarro-Gonzalez, M.F., Libby, P., D'Amore, P.A., *et al.* (2005). CADASIL mutations impair Notch3 glycosylation by Fringe. *Human molecular genetics* 14, 1631-1639.

Arima, K., Yanagawa, S., Ito, N., and Ikeda, S. (2003). Cerebral arterial pathology of CADASIL and CARASIL (Maeda syndrome). *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 23, 327-334.

Auer, D.P., Pütz, B., Gössl, C., Elbel, G.-K., Gasser, T., and Dichgans, M. (2001). Differential Lesion Patterns in CADASIL and Sporadic Subcortical Arteriosclerotic Encephalopathy: MR Imaging Study with Statistical Parametric Group Comparison 1. *Radiology* 218, 443-451.

Ballabio, E., Bersano, A., Bresolin, N., and Candelise, L. (2007). Monogenic vessel diseases related to ischemic stroke: a clinical approach. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27, 1649-1662.

Baudrimont, M., Dubas, F., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M. (1993). Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 24, 122-125.

Bianchi, S., Di Palma, C., Gallus, G.N., Taglia, I., Poggiani, A., Rosini, F., Rufa, A., Muresanu, D.F., Cerase, A., Dotti, M.T., *et al.* (2014). Two novel HTRA1 mutations in a European CARASIL patient. *Neurology* 82, 898-900.

Bousser, M., and Tournier-Lasserre, E. (1994). Summary of the proceedings of the First International Workshop on CADASIL. Paris, May 19-21, 1993. *Stroke* 25, 704-707.

Bousser, M., and Tournier-Lasserre, E. (2001). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: from stroke to vessel wall physiology. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 70, 285-287.

Bowler, J.V., and Hachinski, V. (1994). Progress in the genetics of cerebrovascular disease: inherited subcortical arteriopathies. *Stroke* 25, 1696-1698.

Bozkulak, E.C., and Weinmaster, G. (2009). Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Molecular and cellular biology* 29, 5679-5695.

Buffon, F., Porcher, R., Hernandez, K., Kurtz, A., Pointeau, S., Vahedi, K., Bousser, M., and Chabriat, H. (2006). Cognitive profile in CADASIL. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 77, 175-180.

Cognat, E., Baron-Menguy, C., Domenga-Denier, V., Cleophax, S., Fouillade, C., Monet-Lepretre, M., Dewerchin, M., and Joutel, A. (2014a). Archetypal Arg169Cys mutation in NOTCH3 does not drive the pathogenesis in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy via a loss-of-function mechanism. *Stroke* 45, 842-849.

Cognat, E., Cleophax, S., Domenga-Denier, V., and Joutel, A. (2014b). Early white matter changes in CADASIL: evidence of segmental intramyelinic oedema in a pre-clinical mouse model. *Acta neuropathologica communications* 2, 49.

Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.-G. (2009a). Cadasil. *The Lancet Neurology* 8, 643-653.

Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.G. (2009b). Cadasil. *The Lancet Neurology* 8, 643-653.

Chabriat, H., Vahedi, K., Bousser, M., Iba-Zizen, M., Joutel, A., Nibbio, A., Nagy, T., Lasserre, E.T., Krebs, M., and Julien, J. (1995). Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. *The Lancet* 346, 934-939.

Chabriat, H., Vahedi, K., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M. (1997). CEREBRAL AUTOSOMAL DOMINANT ARTERIOPATHY WITH SUBCORTICAL INFARCTS AND LEUKOENCEPHALOPATHY (CADASIL). *The Neurologist* 3, 137-145.

Chen, Y., He, Z., Meng, S., Li, L., Yang, H., and Zhang, X. (2013). A novel mutation of the high-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1) gene in a Chinese family with cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CARASIL). *The Journal of international medical research* 41, 1445-1455.

Choi, J.C., Kang, S.-Y., Kang, J.-H., and Park, J.-K. (2006). Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology* 67, 2042-2044.

Desmond, D.W. (2004). Vascular dementia. *Clinical Neuroscience Research* 3, 437-448.

Dichgans, M., Herzog, J., and Gasser, T. (2001). NOTCH3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology* 57, 1714-1717.

Dichgans, M., Ludwig, H., Muller-Hocker, J., Messerschmidt, A., and Gasser, T. (2000). Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *European journal of human genetics : EJHG* 8, 280-285.

Dichgans, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T., and Gasser, T. (1998). The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Annals of neurology* 44, 731-739.

Dotti, M.T., De Stefano, N., Bianchi, S., Malandrini, A., Battisti, C., Cardaioli, E., and Federico, A. (2004). A novel NOTCH3 frameshift deletion and mitochondrial abnormalities in a patient with CADASIL. *Arch Neurol* 61, 942-945.

Duering, M., Karpinska, A., Rosner, S., Hopfner, F., Zechmeister, M., Peters, N., Kremmer, E., Haffner, C., Giese, A., Dichgans, M., *et al.* (2011). Co-aggregate formation of CADASIL-mutant NOTCH3: a single-particle analysis. *Human molecular genetics* 20, 3256-3265.

Federico, A., Bianchi, S., and Dotti, M.T. (2005). The spectrum of mutations for CADASIL diagnosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 26, 117-124.

Fleming, R.J., Hori, K., Sen, A., Filloramo, G.V., Langer, J.M., Obar, R.A., Artavanis-Tsakonas, S., and Maharaj-Best, A.C. (2013). An extracellular region of Serrate is essential for ligand-induced cis-inhibition of Notch signaling. *Development (Cambridge, England)* 140, 2039-2049.

Fouillade, C., Baron-Menguy, C., Domenga-Denier, V., Thibault, C., Takamiya, K., Haganir, R., and Joutel, A. (2013). Transcriptome analysis for Notch3 target genes identifies Grip2 as a novel regulator of myogenic response in the cerebrovasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 76-86.

Fouillade, C., Monet-Lepretre, M., Baron-Menguy, C., and Joutel, A. (2012). Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease. *Cardiovascular research* 95, 138-146.

Fukutake, T. (2011). Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 20, 85-93.

Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., Kawata, H., Koyama, A., Arima, K., and Takahashi, T. (2009a). Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *New England Journal of Medicine* 360, 1729-1739.

Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., Kawata, H., Koyama, A., Arima, K., Takahashi, T., *et al.* (2009b). Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *The New England journal of medicine* 360, 1729-1739.

Haritoglou, C., Rudolph, G., Hoops, J., Opherk, C., Kampik, A., and Dichgans, M. (2004). Retinal vascular abnormalities in CADASIL. *Neurology* 62, 1202-1205.

Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserre, E. (2000). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *The Journal of clinical investigation* 105, 597-605.

Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillon, M., Marechal, E., *et al.* (1997). Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 826, 213-217.

Joutel, A., Monet-Lepretre, M., Gosele, C., Baron-Menguy, C., Hammes, A., Schmidt, S., Lemaire-Carrette, B., Domenga, V., Schedl, A., Lacombe, P., *et al.* (2010). Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *The Journal of clinical investigation* 120, 433-445.

Joutel, A., Monet, M., Domenga, V., Riant, F., and Tournier-Lasserre, E. (2004). Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *American journal of human genetics* 74, 338-347.

Kumar, S.L., and Mahr, G. (1997). CADASIL presenting as bipolar disorder. *Psychosomatics* 38, 397-398.

Li, X., Buckton, A.J., Wilkinson, S.L., John, S., Walsh, R., Novotny, T., Valaskova, I., Gupta, M., Game, L., Barton, P.J.R., *et al.* (2013). Towards Clinical Molecular Diagnosis of Inherited Cardiac Conditions: A Comparison of Bench-Top Genome DNA Sequencers. *PloS one* 8, e67744.

Liem, M.K., Lesnik Oberstein, S.A., Vollebregt, M.J., Middelkoop, H.A., van der Grond, J., and Helderma-van den Enden, A.T. (2008). Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65-year-old CADASIL patient with mild symptoms: a family report. *J Neurol* 255, 1978-1980.

Markus, H., Martin, R., Simpson, M., Dong, Y., Ali, N., Crosby, A., and Powell, J. (2002). Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 59, 1134-1138.

Mendioroz, M., Fernandez-Cadenas, I., Del Rio-Espinola, A., Rovira, A., Sole, E., Fernandez-Figueras, M.T., Garcia-Patos, V., Sastre-Garriga, J., Domingues-Montanari, S., Alvarez-Sabin, J., *et al.* (2010). A missense HTRA1 mutation expands CARASIL syndrome to the Caucasian population. *Neurology* 75, 2033-2035.

Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics* 11, 31-46.

Miao, Q., Paloneva, T., Tuisku, S., Roine, S., Poyhonen, M., Viitanen, M., and Kalimo, H. (2006). Arterioles of the lenticular nucleus in CADASIL. *Stroke* 37, 2242-2247.

Miao, Q., Paloneva, T., Tuominen, S., Poyhonen, M., Tuisku, S., Viitanen, M., and Kalimo, H. (2004). Fibrosis and stenosis of the long penetrating cerebral arteries: the cause of the white matter pathology in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14, 358-364.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.

Moccia, M., Mosca, L., Erro, R., Cervasio, M., Allocca, R., Vitale, C., Leonardi, A., Caranci, F., Del Basso-De Caro, M.L., Barone, P., *et al.* (2015). Hypomorphic NOTCH3 mutation in an Italian family with CADASIL features. *Neurobiology of aging* 36, 547.e545-511.

Monet-Lepretre, M., Bardot, B., Lemaire, B., Domenga, V., Godin, O., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., Cohen-Tannoudji, M., Chabriat, H., and Joutel, A. (2009). Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain* 132, 1601-1612.

Monet-Lepretre, M., Haddad, I., Baron-Menguy, C., Fouillot-Panchal, M., Riani, M., Domenga-Denier, V., Dussaule, C., Cognat, E., Vinh, J., and Joutel, A. (2013). Abnormal recruitment of extracellular matrix proteins by excess Notch3 ECD: a new pathomechanism in CADASIL. *Brain* 136, 1830-1845.

Monet, M., Domenga, V., Lemaire, B., Souilhol, C., Langa, F., Babinet, C., Gridley, T., Tournier-Lasserre, E., Cohen-Tannoudji, M., and Joutel, A. (2007). The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Human molecular genetics* 16, 982-992.

Mykkanen, K., Junna, M., Amberla, K., Bronge, L., Kaariainen, H., Poyhonen, M., Kalimo, H., and Viitanen, M. (2009). Different clinical phenotypes in monozygotic CADASIL twins with a novel NOTCH3 mutation. *Stroke* 40, 2215-2218.

Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *The Journal of cell biology* 176, 445-458.

Nozaki, H., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2014). Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 45, 3447-3453.

O'sullivan, M., Jarosz, J., Martin, R., Deasy, N., Powell, J., and Markus, H. (2001). MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology* 56, 628-634.

Okeda, R., Arima, K., and Kawai, M. (2002). Arterial changes in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) in relation to pathogenesis of diffuse myelin loss of cerebral white matter examination of cerebral medullary arteries by reconstruction of serial sections of an autopsy case. *Stroke* 33, 2565-2569.

Opherk, C., Peters, N., Herzog, J., Luedtke, R., and Dichgans, M. (2004). Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain* 127, 2533-2539.

Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology* 9, 689-701.

Peters, N., Herzog, J., Opherk, C., and Dichgans, M. (2004a). A Two-Year Clinical Follow-Up Study in 80 CADASIL Subjects Progression Patterns and Implications for Clinical Trials. *Stroke* 35, 1603-1608.

Peters, N., Holtmannspötter, M., Opherk, C., Gschwendtner, A., Herzog, J., Sämann, P., and Dichgans, M. (2006). Brain volume changes in CADASIL A serial MRI study in pure subcortical ischemic vascular disease. *Neurology* 66, 1517-1522.

Peters, N., Opherk, C., Danek, A., Ballard, C., Herzog, J., and Dichgans, M. (2005). The pattern of cognitive performance in CADASIL: a monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *The American journal of psychiatry* 162, 2078-2085.

Peters, N., Opherk, C., Zacherle, S., Capell, A., Gempel, P., and Dichgans, M. (2004b). CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Experimental cell research* 299, 454-464.

Prakash, N., Hansson, E., Betsholtz, C., Mitsiadis, T., and Lendahl, U. (2002). Mouse Notch 3 expression in the pre- and postnatal brain: relationship to the stroke and dementia syndrome CADASIL. *Experimental cell research* 278, 31-44.

Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., and Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13, 341-341.

Razvi, S.S., and Bone, I. (2006). Single gene disorders causing ischaemic stroke. *Journal of neurology* 253, 685-700.

Reyes, S., Viswanathan, A., Godin, O., Dufouil, C., Benisty, S., Hernandez, K., Kurtz, A., Jouvent, E., O'Sullivan, M., and Czernecki, V. (2009). Apathy A major symptom in CADASIL. *Neurology* 72, 905-910.

Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., *et al.* (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348-352.

Ruchoux, M.M., Domenga, V., Brulin, P., Maciazek, J., Limol, S., Tournier-Lasserre, E., and Joutel, A. (2003). Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *The American journal of pathology* 162, 329-342.

Shiga, A., Nozaki, H., Yokoseki, A., Nihonmatsu, M., Kawata, H., Kato, T., Koyama, A., Arima, K., Ikeda, M., Katada, S., *et al.* (2011). Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta1 via cleavage of proTGF-beta1. *Human molecular genetics* 20, 1800-1810.

Stenborg, A., Kalimo, H., Viitanen, M., Terent, A., and Lind, L. (2007). Impaired endothelial function of forearm resistance arteries in CADASIL patients. *Stroke* 38, 2692-2697.

Tikka, S., Baumann, M., Siitonen, M., Pasanen, P., Pöyhönen, M., Myllykangas, L., Viitanen, M., Fukutake, T., Cognat, E., and Joutel, A. (2014). CADASIL and CARASIL. *Brain Pathology* 24, 525-544.

Todorovic, V., and Rifkin, D.B. (2012). LTBP3, more than just an escort service. *Journal of cellular biochemistry* 113, 410-418.

Tournier-Lasserre, E., Iba-Zizen, M.-T.r., Romero, N., and Bousser, M.-G. (1991). Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. *Stroke* 22, 1297-1302.

Tournier-Lasserre, E., Joutel, A., Melki, J., Weissenbach, J., Lathrop, G.M., Chabriat, H., Mas, J.-L., Cabanis, E.-A., Baudrimont, M., and Maciazek, J. (1993). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature genetics* 3, 256-259.

Tuominen, S., Juvonen, V., Amberla, K., Jolma, T., Rinne, J.O., Tuisku, S., Kurki, T., Marttila, R., Poyhonen, M., Savontaus, M.L., *et al.* (2001). Phenotype of a homozygous CADASIL patient in comparison to 9 age-matched heterozygous patients with the same R133C Notch3 mutation. *Stroke* 32, 1767-1774.

Tuominen, S., Miao, Q., Kurki, T., Tuisku, S., Poyhonen, M., Kalimo, H., Viitanen, M., Sipila, H.T., Bergman, J., and Rinne, J.O. (2004). Positron emission tomography examination of cerebral blood flow and glucose metabolism in young CADASIL patients. *Stroke* 35, 1063-1067.

Vahedi, K., Chabriat, H., Levy, C., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.-G. (2004). Migraine with aura and brain magnetic resonance imaging abnormalities in patients with CADASIL. *Archives of neurology* *61*, 1237-1240.

Van Bogaert, L. (1955). Encéphalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) à évolution rapide chez deux soeurs. *Med Hellen* *24*, 961-972.

Van Gerpen, J., Ahlskog, J., and Petty, G. (2003). Progressive supranuclear palsy phenotype secondary to CADASIL. *Parkinsonism & related disorders* *9*, 367-369.

Viswanathan, A., Guichard, J.-P., Gschwendtner, A., Buffon, F., Cumurcuic, R., Boutron, C., Vicaut, E., Holtmannspötter, M., Pachai, C., and Bousser, M.-G. (2006). Blood pressure and haemoglobin A1c are associated with microhaemorrhage in CADASIL: a two-centre cohort study. *Brain* *129*, 2375-2383.

Wang, X.L., Li, C.F., Guo, H.W., and Cao, B.Z. (2012). A novel mutation in the HTRA1 gene identified in Chinese CARASIL pedigree. *CNS neuroscience & therapeutics* *18*, 867-869.

Watanabe-Hosomi, A., Watanabe, Y., Tanaka, M., Nakagawa, M., and Mizuno, T. (2012). Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Experimental neurology* *233*, 303-311.

Tabla suplementaria 1. Pooles de primers diseñados para la amplificación múltiple.

Gen	Ion AmpliSeq Primer Forward	Ion AmpliSeq Primer Reverse	Tamaño del amplicón (pb)
<i>HTRA1</i>	GACCAGGCAGGGACATAGATTG	TTGGCAACCTTATGTTTGAAAAGACC	228
<i>HTRA1</i>	GGAAGTGGTGGAGCTGAGTTT	ATCTGAGCCAGTAGAAAAGGAACAG	272
<i>HTRA1</i>	CGTGTCCTTCTTGCTTTTCAGG	GCATTCCCCTTCACTTCTGGATC	274
<i>HTRA1</i>	CAACACCTACGCCAACCTG	AGTCCCGCAGAAGCAGGTC	172
<i>HTRA1</i>	TCCCTGCTTGGTTTTCCATGAT	CTGGATGTAGTCCATGTCTGAGTTG	263
<i>HTRA1</i>	GTAAGTGGAAAGTTTTGATGCATGCA	GGCATTGTGACGATCAGTCCAT	267
<i>HTRA1</i>	GAAGCCCCTTTCCCTTCAAAA	GCTTGGTCTAGTCCATCCCTT	248
<i>HTRA1</i>	CGACCTGGAGTATGTGCGATTC	GCTGTCACTTTCAAAGTGTTAATCCAAT	260
<i>HTRA1</i>	GACCTTCTGCTGCCCTTTGTT	GCACCTTCTGAAGTTCAGGTTTATTTAAAAT	151
<i>NOTCH3</i>	AGTCTGCAAAGATACGGGCAAA	GGGTTTGGGAATGGTGCATCTA	270
<i>NOTCH3</i>	CCAGCATCATCCCTGATAGGGTA	GGGAGTCCCTCAAGGCTATCTC	234
<i>NOTCH3</i>	CTCACATAGTGGCCCTGTGTAG	CCTAAACTCACCTGCTGCTGGT	274
<i>NOTCH3</i>	GTCAGAGGTCTGAGTCAGGTCA	GCTGTCTTGTGCTGGTCATT	248
<i>NOTCH3</i>	TGCAGTGGAAACCCATTCCAT	CGGCATCTGCTATGATGCAC	235
<i>NOTCH3</i>	TAAGGGTGTCTACTGGGAACC	GGAGGATGTGTACTCAGCCTG	271
<i>NOTCH3</i>	TTCGGAGCCAGGACTAGGCC	CTGCAACACGGAGGAGTGCG	237
<i>NOTCH3</i>	CCAAGCCACACACATGTAGGAA	CTGATCCTCCACCTTCTTCCAC	241
<i>NOTCH3</i>	GGTCTGTTCGCAGTGGAA	CCCAGTCAGACTGGGCTAATG	269
<i>NOTCH3</i>	CTCACCTGTCTATCCTGCATGT	GACAATTTCTGCCTCCCTGACAT	178
<i>NOTCH3</i>	CCACCAGGTCTAGGCATTTGC	TCCGAGGCCTCACTTGTG	263
<i>NOTCH3</i>	CAGTGGGTACGGGAAGTCC	GCAATTTTTGAGCCCTCTGGT	183
<i>NOTCH3</i>	CCATTCGGCTCACACTAGCA	CCCACAGTACTGACTCTGAGT	263
<i>NOTCH3</i>	TCAGAAATAACCTCTCACAGGTAGGA	GCACCAAAGGGTGAGATCTGAG	274
<i>NOTCH3</i>	CCCTTCCCAGACATGTCTTTTCG	GGAAGGGAAAGTACCTCCTTCTT	242
<i>NOTCH3</i>	ACCAAGAGTCAAAAAGCAAAAATC	GGATGAAGACAGCTCCCCTACT	273
<i>NOTCH3</i>	CCCACAGACACTCGTTGA	CACCCGATCGCACTCCAT	146
<i>NOTCH3</i>	ATGGATGAACAGACACCGGACA	CGCCTCTTCAACAACAGCC	273
<i>NOTCH3</i>	GCCGAGTATCCTCATTAATC	CACTGAAGTGTCTTCTGGCTA	256
<i>NOTCH3</i>	GGAGCATGTAGATCAGCCACAA	CGAGGCAGACATCAATGAGTGTC	184
<i>NOTCH3</i>	GCACTGGCAGTTATAGGTGTTGAC	CACTTACGACTGTGCCTGTCTT	224
<i>NOTCH3</i>	AGGCAGTGAACGAGTTTAC	CTAACAGCGGGACTCAGGAAGGA	133
<i>NOTCH3</i>	GATCTCACGGTTGGCAAAGTG	TGGAAGACTTTGCTACTGTTAGCTG	147
<i>NOTCH3</i>	AGAGAAGAGGATGAAAAGACTAAAAGGAAG	GGTCCGAATCCACGCCTAG	274
<i>NOTCH3</i>	TGCCCTACTAAAACCATCCA	GAGGACGTGGATGAGTGTC	271
<i>NOTCH3</i>	GAGGTCAAAGTGTGTGCCTAT	CAACTGAAGAGGATGAGGCAGAT	274
<i>NOTCH3</i>	CCAGAAGCACTAGCTCCATCT	CAGGCCATGGTCTTCCCTTAC	253
<i>NOTCH3</i>	ACCCAGCCATTAGGCACAAAAT	ACTTTGGCCCTGCTCAAAAATG	241
<i>NOTCH3</i>	CTGAGCAAGGGAGCTGGGAAC	GGACATGGCGAGGAGTACC	260
<i>NOTCH3</i>	CCCTCTGACTCTCTGAGTAGG	AGCGACGTGGATGAGTGC	242

Tabla suplementaria 2. Sumario de las secuencias amplificadas de *NOTCH3*.

	Inicio	Final	Cobertura (%)	Amplicones
<i>NOTCH3</i>	15271467	15272530	69,61	5
<i>NOTCH3</i>	15273270	15273378	100	2
<i>NOTCH3</i>	15276173	15276331	100	1
<i>NOTCH3</i>	15276592	15276907	100	2
<i>NOTCH3</i>	15278054	15278227	100	1
<i>NOTCH3</i>	15280891	15280986	100	1
<i>NOTCH3</i>	15281136	15281369	98,28	2
<i>NOTCH3</i>	15281476	15281641	89,09	2
<i>NOTCH3</i>	15284873	15285216	100	3
<i>NOTCH3</i>	15288330	15288906	15,1	1
<i>NOTCH3</i>	15289628	15289757	100	1
<i>NOTCH3</i>	15289830	15290098	93,66	3
<i>NOTCH3</i>	15290169	15290312	100	2
<i>NOTCH3</i>	15290877	15291072	100	2
<i>NOTCH3</i>	15291486	15291644	100	1
<i>NOTCH3</i>	15291766	15291978	100	2
<i>NOTCH3</i>	15292381	15292617	100	2
<i>NOTCH3</i>	15295100	15295266	100	1
<i>NOTCH3</i>	15295711	15295835	100	1
<i>NOTCH3</i>	15296062	15296224	100	2
<i>NOTCH3</i>	15296292	15296495	100	2
<i>NOTCH3</i>	15297683	15297804	100	2
<i>NOTCH3</i>	15297910	15298154	100	2
<i>NOTCH3</i>	15298686	15298810	100	1
<i>NOTCH3</i>	15299040	15299164	100	1
<i>NOTCH3</i>	15299794	15299990	100	2
<i>NOTCH3</i>	15300078	15300244	100	1
<i>NOTCH3</i>	15302229	15302473	100	2
<i>NOTCH3</i>	15302550	15302683	100	2
<i>NOTCH3</i>	15302765	15303114	100	3
<i>NOTCH3</i>	15303182	15303335	100	1
<i>NOTCH3</i>	15308305	15308394	100	1

Tabla suplementaria 3. Sumario de las secuencias amplificadas de *HTRA1*.

	Inicio	Fin	Cobertura (%)	Amplicones
<i>HTRA1</i>	124273701	124273880	100	1
<i>HTRA1</i>	124271480	124271586	100	1
<i>HTRA1</i>	124248932	124249147	100	2
<i>HTRA1</i>	124266880	124266923	100	1
<i>HTRA1</i>	124221163	124221645	38,67	2
<i>HTRA1</i>	124268166	124268291	100	2
<i>HTRA1</i>	124266201	124266406	100	2
<i>HTRA1</i>	124269606	124269674	100	1
<i>HTRA1</i>	124248412	124248522	100	1

Tabla suplementaria 4. Sumario de todas las mutaciones encontradas por NGS en los 8 pools.

Gen	Locus	Localización	Alelos	Proteína	MAF	dbSNP
<i>HTRA1</i>	chr10:124221583	exónico	T/G	p.Ser139Ala	-	-
<i>HTRA1</i>	chr10:124248380	intrónico	A/G	-	0.012	rs115959727
<i>HTRA1</i>	chr10:124249118	exónico	C/T	p.(=)	0.028	rs17624021
<i>HTRA1</i>	chr10:124249185	intrónico	C/T	-	0.008	rs145573878
<i>HTRA1</i>	chr10:124266186	intrónico	C/T	-	-	rs376128401
<i>HTRA1</i>	chr10:124266187	intrónico	G/A	-	0.031	rs74159166
<i>HTRA1</i>	chr10:124266308	exónico	C/T	p.(=)	-	rs149294320
<i>HTRA1</i>	chr10:124266500	intrónico	C/T	-	0.324	rs2672582
<i>HTRA1</i>	chr10:124268102	intrónico	A/G	-	0.002	rs141384850
<i>HTRA1</i>	chr10:124268401	intrónico	C/G	-	0.335	rs2672585
<i>HTRA1</i>	chr10:124271528	exónico	C/T	p.(=)	0.008	rs11538140
<i>HTRA1</i>	chr10:124271589	intrónico	A/A	-	0.001	rs2672586
<i>HTRA1</i>	chr10:124271595	intrónico	G/A	-	0.395	rs2272599
<i>HTRA1</i>	chr10:124273671	intrónico	C/T	-	0.259	rs2293871
<i>HTRA1</i>	chr10:124266500	intrónico	C/T	-	0.324	rs2672582
<i>HTRA1</i>	chr10:124268275	exónico	G/A	p.Arg370Gln	-	-
<i>HTRA1</i>	chr10:124268401	intrónico	C/G	-	0.335	rs2672585
<i>HTRA1</i>	chr10:124271589	intrónico	A/A	-	0.001	rs2672586
<i>HTRA1</i>	chr10:124271595	intrónico	G/A	-	0.395	rs2272599
<i>HTRA1</i>	chr10:124273671	intrónico	C/T	-	0.259	rs2293871
<i>NOTCH3</i>	chr19:15271686	exónico	G/A	p.(=)	0.017	rs61731975
<i>NOTCH3</i>	chr19:15271771	exónico	G/A	p.Ala2223Val	0.368	rs1044009
<i>NOTCH3</i>	chr19:15271907	exónico	G/A	p.Pro2178Ser	-	-
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273221	intrónico	T/C	-	0.162	rs757472
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273231	intrónico	A/G	-	0.134	rs4809028
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273248	intrónico	A/C	-	0.133	rs4809029
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273335	exónico	C/T	p.Val1952Met	0.008	rs115582213
<i>NOTCH3</i>	chr19:15273381	intrónico	A/G	-	0.134	rs4809030
<i>NOTCH3</i>	chr19:15276739	exónico	A/G	p.(=)	0.091	rs16980398
<i>NOTCH3</i>	chr19:15276919	intrónico	G/A	-	0.134	rs2074619
<i>NOTCH3</i>	chr19:15276923	intrónico	C/T	-	0.134	rs10416777
<i>NOTCH3</i>	chr19:15278057	intrónico	A/G	-	0.133	rs1548555
<i>NOTCH3</i>	chr19:15281386	intrónico	C/A	-	0.437	rs2074620

NOTCH3	chr19:15281458	intrónico	C/CG	-	-	rs369401225
NOTCH3	chr19:15281459	intrónico	C/G	-	0.056	rs56277836
NOTCH3	chr19:15285052	exónico	T/C	p.(=)	0.133	rs1044006
NOTCH3	chr19:15285272	intrónico	T/C	-	0.145	rs10422818
NOTCH3	chr19:15289613	intrónico	A/T	-	0.464	rs11670823
NOTCH3	chr19:15290007	exónico	C/T	p.Val1183Met	0.067	rs10408676
NOTCH3	chr19:15290125	intrónico	G/A	-	0.464	rs56061231
NOTCH3	chr19:15290236	exónico	G/T	p.His1133Gln	0.006	rs112197217
NOTCH3	chr19:15291096	intrónico	G/A	-	0.02	rs137943075
NOTCH3	chr19:15291576	exónico	C/G	p.Ala1020Pro	0.084	rs35769976
NOTCH3	chr19:15292271	intrónico	C/T	-	0.456	rs11669950
NOTCH3	chr19:15292366	intrónico	C/T	-	0.233	rs11669982
NOTCH3	chr19:15292437	exónico	T/C	p.(=)	0.233	rs1043997
NOTCH3	chr19:15295082	intrónico	C/A	-	0.009	rs151276393
NOTCH3	chr19:15295134	exónico	G/A	p.(=)	0.462	rs1043996
NOTCH3	chr19:15296162	exónico	G/A	p.(=)	0.002	rs140040122
NOTCH3	chr19:15297974	exónico	G/A	p.(=)	0.014	rs35793356
NOTCH3	chr19:15299029	intrónico	T/C	-	-	-
NOTCH3	chr19:15299048	exónico	G/A	p.Ser497Leu	0.006	rs114207045
NOTCH3	chr19:15300069	intrónico	T/C	-	0.144	rs10423702
NOTCH3	chr19:15300136	exónico	A/G	p.(=)	0.014	rs61749020
NOTCH3	chr19:15302844	exónico	T/C	p.(=)	0.144	rs1043994
NOTCH3	chr19:15302859	exónico	G/A	p.(=)	-	rs367943979
NOTCH3	chr19:15303225	exónico	G/A	p.(=)	0.238	rs3815188
NOTCH3	chr19:15308287	intrónico	G/C	-	0.006	rs188132716
NOTCH3	chr19:15271771	exónico	G/A	p.Ala2223Val	0.368	rs1044009
NOTCH3	chr19:15271907	exónico	G/A	p.Pro2178Ser	-	-
NOTCH3	chr19:15273221	intrónico	T/C	-	0.162	rs757472
NOTCH3	chr19:15273231	intrónico	A/G	-	0.134	rs4809028
NOTCH3	chr19:15273248	intrónico	A/C	-	0.133	rs4809029
NOTCH3	chr19:15273381	intrónico	A/G	-	0.134	rs4809030
NOTCH3	chr19:15276919	intrónico	G/A	-	0.134	rs2074619
NOTCH3	chr19:15276923	intrónico	C/T	-	0.134	rs10416777
NOTCH3	chr19:15278057	intrónico	A/G	-	0.133	rs1548555
NOTCH3	chr19:15281079	intrónico	A/G	-	-	-
NOTCH3	chr19:15281386	intrónico	C/A	-	0.437	rs2074620

NOTCH3	chr19:15281387	intrónico	G/A	-	-	-
NOTCH3	chr19:15281458	intrónico	C/CG	-	-	rs369401225
NOTCH3	chr19:15281459	intrónico	C/G	-	0.056	rs56277836
NOTCH3	chr19:15284890	exónico	G/T	p.(=)	-	rs374042078
NOTCH3	chr19:15285052	exónico	T/C	p.(=)	0.133	rs1044006
NOTCH3	chr19:15285272	intrónico	T/C		0.145	rs10422818
NOTCH3	chr19:15291543	exónico	G/A	p.Arg1031Cys	-	-
NOTCH3	chr19:15291825	exónico	G/A	p.His981Tyr	-	rs143695196
NOTCH3	chr19:15292271	intrónico	C/T	-	0.456	rs11669950
NOTCH3	chr19:15292366	intrónico	C/T	-	0.233	rs11669982
NOTCH3	chr19:15292437	exónico	T/C	p.(=)	0.233	rs1043997
NOTCH3	chr19:15295134	exónico	G/A	p.(=)	0.462	rs1043996
NOTCH3	chr19:15295261	exónico	C/T	p.Gly804Asp		-
NOTCH3	chr19:15295265	intrónico	G/C		0.001	rs190177286
NOTCH3	chr19:15297937	exónico	G/A	p.Arg607Cys	-	-
NOTCH3	chr19:15298084	exónico	G/A	p.Arg558Cys		rs75068032
NOTCH3	chr19:15299896	exónico	A/T	p.Cys428Ser	-	rs267606915
NOTCH3	chr19:15300069	intrónico	T/C	-	0.144	rs10423702
NOTCH3	chr19:15302831	exónico	G/A	p.Arg207Cys		-
NOTCH3	chr19:15302844	exónico	T/C	p.(=)	0.144	rs1043994
NOTCH3	chr19:15302962	exónico	C/T	p.Arg163Gln	-	-
NOTCH3	chr19:15302993	exónico	G/A	p.Arg153Cys	-	-
NOTCH3	chr19:15302999	exónico	G/C	p.Gln151Glu	-	rs371491165
NOTCH3	chr19:15303005	exónico	C/A	p.Gly149Cys	-	-
NOTCH3	chr19:15303225	exónico	G/A	p.(=)	0.238	rs3815188
NOTCH3	chr19:15303260	exónico	G/A	p.Arg90Cys	-	-
NOTCH3	chr19:15303315	exónico	C/A	p.Trp71Cys	-	rs28937321