

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Caroline Barbosa Peres do Nascimento

Papel da trombospondina-1 no contexto endotelial dos cavernomas cerebrais: estudos fenotípicos e funcionais

Rio de Janeiro 2023 Caroline Barbosa Peres do Nascimento

Papel da trombospondina-1 no contexto endotelial dos cavernomas cerebrais: estudos

fenotípicos e funcionais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Verônica Maria Morandi da Silva

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N244 Nascimento, Caroline Barbosa Peres do Papel da trombospondina-1 no contexto endotelial dos cavernomas cerebrais: estudos fenotípicos e funcionais / Caroline Barbosa Peres do Nascimento. - 2023. 86 f.
Orientadora: Prof.ª Dra. Verônica Maria Morandi da Silva Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.
1. Malformações vasculares do sistema nervoso central – Patologia.
2. Cérebro – Anormalidades – Teses. 3. Transdução de sinais – Genética.
4. Proteínas – Química – Teses. I. Silva, Verônica Maria Morandi da. II.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.831

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Caroline Barbosa Peres do Nascimento

Papel da trombospondina-1 no contexto endotelial dos cavernomas cerebrais: estudos fenotípicos e funcionais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de abril de 2023.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Verônica Maria Morandi da Silva (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio Universidade Federal do Rio de Janeiro

> Rio de Janeiro 2023

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Edicarla e Claudio, à minha querida irmã Karine, ao meu marido Jean e a todos que de alguma forma me ajudaram nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre renovar minhas esperanças.

À minha mãe Edicarla, por sempre se dedicar e com todo o seu amor me apoiar e incentivar minhas decisões. Agradeço meu pai Claudio,que apesar de não estar aqui, sei que de onde estiver, está me dando forças para ir em busca dos meus sonhos.

À minha irmã Karine, meu anjinho,que me faz rir o tempo todo, me ajudando sempre.

Às minhas avós Edileia e Reinalta e avôs Carlos e Edson, por todo carinho e dedicação.

Ao meu marido Jean, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e me incentivou a continuar nessa caminhada.

À minha orientadora Profa. Verônica, por todos os ensinamentos permitindo que eu pudesse hoje estar concluindo este trabalho.

Aos amigos do LabAngio, Antônio, Chico, Marcos e Tia Mariléa por sempre me apoiarem e por tornar cada dia no laboratório especial e gratificante. E por terem paciência comigo, nos momentos de aprendizagem. E um agradecimento especial à Laila, Marcella e Luisa, pessoas que me ajudaram muito nesse projeto e que me proporcionaram inúmeros conhecimentos nas técnicas laboratoriais utilizadas, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria finalizado.

Às amigas que a UERJ me deu, Anna, Carolina, Karina, Mariana e Thamires. Agradeço por todos os momentos de risadas, pelas trocas de ideias e ajuda mútua. Juntas conseguimos avançar e ultrapassar todos os obstáculos que a universidade proporciona.

Agradeço ao Professor Jorge Marcondes de Souza e à Aliança Cavernoma Brasil, por todo o suporte e apoio financeiro a esse projeto.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro.

RESUMO

NASCIMENTO, Caroline Barbosa Peres do . **Papel da trombospondina-1 no contexto endotelial dos cavernomas cerebrais: estudos fenotípicos e funcionais**. 2023. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Muitos estudos vêm utilizando o modelo in vitro para investigar mecanismos celulares de doenças, como a malformação cavernosa cerebral (CCM) ou cavernomas cerebrais. Cavernomas estão associados à superativação da via de sinalização RhoA/ROCK em células endoteliais, levando ao excesso de fibras de estresse que promovem a abertura das junções aderentes interendoteliais, alterações em proteínas de junções, como zona ocludina-1 (ZO-1) e caderina endotelial vascular (VE-caderina), com consequente extravasamento de líquidos do sangue e formação de estruturas bolhosas que são denominadas "cavernas". A doença decorre de mutações de perda de função de um dos genes CCM1(KRIT-1), CCM2 e CCM3/PDCD10, que regulam negativamente a via de RhoA/ROCK, além de também estar associada à uma expressão reduzida de TSP-1. A trombospondina-1 (TSP-1) é uma proteína matricelular que tem como característica a habilidade tanto de inibir quanto de estimular a angiogênese através de interações com seus múltiplos domínios funcionais, sendo envolvida em numerosas atividades biológicas. A fim de compreender o complexo papel das proteínas CCM e da TSP-1 neste contexto patológico, modelos experimentais de células miméticas do fenótipo cavernomatoso têm sido desenvolvidos, através do silenciamento de uma das isoformas de proteína CCM. Neste trabalho, optamos por padronizar o silenciamento da expressão da proteína CCM3. Células endoteliais microvasculares humana (HMEC-1) imortalizadas e células endoteliais primárias da veia umbilical humana (HUVECs) foram utilizadas nos ensaios. A expressão de CCM3 nessas células endoteliais foi confirmada por marcação imunofluorescente. As duas células endoteliais apresentaram diferentes susceptibilidades ao procedimento de eletroporação, que pôde ser optimizado para cada tipo celular. HUVECs e HMEC-1 apresentaram picos de silenciamento no tempo de 48 horas pós-transfecção e com concentração de siRNA (específico e "non-targeting") de 300 nM. Com o objetivo de verificar se o silenciamento produziu os efeitos compatíveis com a aquisição do fenótipo cavernomatoso, ensaios funcionais foram realizados em células selvagens e silenciadas: análise da organização do citoesqueleto de actina; avaliação da proliferação das células endoteliais; análise do estado de fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) e análise da diferenciação tubulogênica. Nossos resultados mostraram que o silenciamento de CCM3 resultou em células que reproduzem algumas importantes características de células endoteliais cavernomatosas, como o aumento das fibras de estresse longitudinais, aumento da fosforilação de MLC. Além disso, foi observada uma redução da VE-caderina no pico de silenciamento (48 h), provavelmente relacionada ao aumento da reciclagem deste receptor de junções aderentes (AJs). Observamos uma redução da expressão de TSP-1, com concomitante aumento de fragmentos N-terminais, de natureza pró-angiogênica. Nossos resultados sugerem que a geração de fragmentos proteolíticos angiogênicos a partir da TSP-1, em oposição à forma intacta desta proteína, podem ser parte do mecanismo que leva à desestabilização de AJs em células endoteliais cavernomatosas.

Palavras-chave: células endoteliais; angiogênese; trombospondina-1; cavernomas cerebrais.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Caroline Barbosa Peres do Nascimento. *Role of thrombospondin-1 in the endothelial context of cerebral cavernomas: phenotypic and functional studies.* 2023. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Many studies have used *in vitro* models to investigate cellular mechanisms of diseases, such as cerebral cavernous malformation (CCM) or cerebral cavernomas. Cavernomas are associated with overactivation of the RhoA/ROCK signaling pathway in endothelial cells, leading to excess stress fibers that promote the opening of interendothelial adherent junctions, changes in junctional proteins such as zona occludin-1 (ZO-1) and cadherin vascular endothelium (VE-cadherin), with consequent extravasation of blood fluids and formation of bullous structures that are called "caves". The disease results from loss-of-function mutations in one of the genes CCM1(KRIT-1), CCM2 and CCM3/PDCD10, which negatively regulate the RhoA/ROCK pathway, in addition to being associated with a reduced expression of thrombospondin-1 (TSP-1). TSP-1 is a matricellular protein that can both inhibit and stimulate angiogenesis through interactions with its multiple functional domains, being involved in numerous biological activities. To understand the complex role of CCM proteins and TSP-1 in this pathological context, experimental models of mimetic cells of the cavernomatous phenotype have been developed, through the silencing of CCM proteins expression. In the present work, we chose to perform he silencing the expression of the CCM3 isoform. Immortalized human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and human umbilical vein primary endothelial cells (HUVECs) were used in the assays. CCM3 expression in these endothelial cells was confirmed by immunofluorescent staining. The two endothelial cell types showed different susceptibilities to the electroporation procedure, which could be optimized for each cell type. HUVECs and HMEC-1 showed silencing peaks at 48 hours post-transfection and with siRNA concentration (specific and "non-targeting") of 300 nM. Cells were analyzed for the acquisition of the cavernomatous phenotype, through functional assays carried out in both wild-type and silenced cells: analysis of the organization of the actin cytoskeleton; assessment of endothelial cell proliferation; analysis of myosin light chain (MLC) phosphorylation status and analysis of tubulogenic differentiation. Our results showed that CCM3 silencing resulted in cells that reproduce some important features of cavernomatous endothelial cells, such as increased longitudinal stress fibers and increased MLC phosphorylation. Furthermore, a reduction in VE-cadherin was observed at the silencing peak (48 hours), probably related to the increased recycling of this adherent junction receptor (AJs). We observed a reduction in TSP-1 expression, with a concomitant increase in N-terminal fragments, of a pro-angiogenic nature. Our results suggest that the generation of angiogenic proteolytic fragments from TSP-1, as opposed to the intact form of this protein, may be part of the mechanism that leads to the destabilization of AJs in cavernomatous endothelial cells.

Keywords: endothelial cells; angiogenesis; thrombospondin-1; cerebral cavernomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Vias de sinalização do VEGF 12
Figura 2 –	Angiogênese 14
Figura 3 –	Vias de sinalização da VE-caderina17
Figura 4 –	Malfornação Cavernosa Cerebral (CCM) 21
Figura 5 –	Malfornação Cavernosa Cerebral familiar e esporádica 24
Figura 6 –	Estrutura das proteínas CCM 27
Figura 7 –	Estrutura da trompospondina 1 (TSP-1)
Figura 8 –	Sinalização de TSP-1
Figura 9 –	Eficiência da técnica de transfecção endotelial por eletroporação 48
Figura 10–	Expressão da proteína CCM3 em células endoteliais
Figura 11–	Padronização do silenciamento de CCM3 em HUVECs 51
Figura 12–	Silenciamento de CCM3 em células HMEC-1 53
Figura 13-	Cinética de proliferação em células HMEC-1 silenciadas para a expressão de CCM3
Figura 14-	Análise de proteínas juncionais nas células HMEC-1 silenciadas para a expressão de CCM3
Figura 15-	Distribuição celular da proteína juncional VE-caderina em células silenciadas para a expressão deCCM3
Figura 16-	Detecção da trombospondina-1 (TSP-1) e seu fragmento N-terminal pró- angiogênico em amostras de células HMEC-1 silenciadas para CCM3
Figura 17-	Ensaio de tubulogênese endotelial de células endoteliais primárias (HUVECs) silenciadas para a expressão de CCM3

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS	Desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina 4
AJS-	Junções aderentes
BBB	Barreira hematoencefálica
BMP6	Proteína morfogenética óssea 6
CCM-	Malformação cavernosa cerebral
CE	Célula endotelial
DNA-	Ácido desoxirribonucléico
dsRNA-	Dupla-fita de RNA
FAK	Quinase de adesão focal
FAT-H-	Homologia focal de adesão C-terminal
fCCM	Malformação cavernosa cerebral familiar
GFP	Proteína verde fluorescente
GJs	Junções comunicantes
GNB	Bactérias gram negativas
HHD-	Domínio da harmonina-homologia
HMEC-1-	Célula endotelial microvascular humana
iBRB	Barreira hematorretiniana interna
JAM	Molécula de adesão de junção
KLF	Fator semelhante a kruppel
LPS	Lipossácarídeos
МАРК	Proteína quinase ativada por mitogeno
MLC-	Cadeia leve de miosina
mRNA-	RNA mensageiro

MEC-	Matriz extracelular
NP-1	Neuropilina-1
NP-2	Neuropilina-2
pMLC-	Cadeia leve de miosina fosforilada
pmaxGFP-	Plasmídeo de fluorescência verde
RNA-	Ácido ribonucléico
RNAi-	RNA de interferência
SFKs	Quinases da família Src
siRNA-	Pequenos RNAs interferentes
SFB-	Soro fetal bovino
TJs	Junções oclusivas
TLR4	receptor toll-like 4
TSP-1	Trombospondina-1
VEGF	Vascular fator de crescimento endotelial
VPF	fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	METODOLOGIA	39
1.1	Cultura de Células Endoteliais Microvasculares Humanas (HMEC-1)	39
1.2	Cultura de Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC)	39
1.3	Sequências das construções para silenciamento (pools de siRNAs)	40
1.4	Silenciamento da expressão de CCM3/PDCD10	41
1.5	Eletroforese de proteínas	42
1.6	Western Blotting	43
1.7	Análise morfológica por microscopia de fluorescência	44
1.8	Ensaio de proliferação Click-iT EdU	45
1.9	Ensaio de tubulogênese com Matrigel	45
1.10	Análise estatística	46
2	RESULTADOS	47
2.1	Determinação da eficácia de transfecção de células endoteliais com um	
	plasmídeo fluorescente	47
2.2	Avaliação da expressão de proteína CCM3 em células endoteliais por	
	imunofluorescência	48
2.3	Silenciamento da expressão do gene CCM3/PDCD10: caracterização	
	morfológica e funcional de células HUVEC (primária) e HMEC-1	
	(imortalizada)	49
2.4	Análise de proteínas juncionais nas células HMEC-1 silenciadas para a	
	expressão de CCM3	55
2.5	Detecção da trombospondina-1 (TSP-1) e seu fragmento N-terminal pró-	
	angiogênico em amostras de células HMEC-1 silenciadas para	
	ССМ3	59
3	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

INTRODUÇÃO

Morfogênese endotelial

O endotélio é um tecido constituído por uma monocamada de células (células endoteliais) que reveste a camada interna dos vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e do sistema linfático. As células endoteliais mantêm, portanto, contato direto com os componentes sanguíneos/linfáticos e com as células circulantes. Inicialmente, o endotélio foi considerado como uma simples barreira de difusão que apenas impede o acesso das células circulantes à matriz vascular. Porém, a partir da década de 70 do século passado, foi reconhecida sua participação no controle do tônus vascular, na agregação plaquetária e seu importante papel na regulação de processos imunológicos, na inflamação e angiogênese (Félétou, 2011).

Como a maioria dos processos biológicos, a formação da vasculatura é regulada temporal e espacialmente por um equilíbrio dos sinais representados por estimuladores e inibidores. As mudanças temporais nos níveis desses fatores no microambiente determinam o comportamento das células endoteliais. No tecido adulto normal, o endotélio está em um estado quiescente, mas pode responder rapidamente para formar novos capilares por meio de um processo denominado angiogênese (Morandi *et al.*, 2023).

Durante o período embrionário, a formação de novos vasos ocorre pela diferenciação de células endoteliais de hemangioblastos (vasculogênese) (Yamazaki *et al.*, 2006; Ucuzian *et al.*, 2010). Mais tarde, depois nascimento, em certos processos fisiológicos (ciclo menstrual, gravidez, cicatrização e reparo de feridas, etc.), novas redes são formadas por angiogênese, com base em vasos pré-existentes (neoangiogênese) (Risau *et al.*, 1997; Olsson *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2009).

A angiogênese ocorre pela formação de novos vasos a partir do brotamento de células endoteliais de vasos pré-existentes. Esse processo permite o aumento do plexo vascular durante o desenvolvimento e o seu remodelamento ao longo da vida, regulando processos fisiológicos vitais como oxigenação, distribuição de nutrientes, pressão sanguínea, entre outros (Patel-Hett & D'Amore, 2011).

A angiogênese é um processo extremamente complexo influenciado por múltiplos fatores, alguns deles atuando como agentes pró-angiogênicos, outros como inibidores de angiogênese (Rosen *et al.*, 2002). Um fator pró-angiogênico extremamente potente é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e numerosos estudos demonstraram sua implicação na angiogênese (Figura 1). Este fator existe em isoformas de diferentes pesos moleculares, resultando em moléculas com variadas capacidades de interação com receptores e com componentes da matriz (Mamer et al, 2020)

Figura 1: A via de sinalização do VEGF



Nota explicativa: A via de sinalização do VEGF é um processo complexo no qual o VEGF estimula a formação de novos vasos sanguíneos. O VEGF, é uma glicoproteína dimérica que se liga ao receptor VEGF (VEGFR) na superfície das células, ativando a tirosina quinase intracelular e iniciando uma série de eventos de cascata de sinalização envolvidos na vasculogênese e angiogênese. Fonte: (adaptado de Cross et al., 2003)

O VEGF liga-se aos seus receptores tirosina-quinase, que apresentam três domínios: um domínio extracelular para ligação de VEGF, um domínio transmembranar e um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase (Neufeld *et al.*, 1999;

Shibuya *et* al., 2006; Shibuya *et al.*, 2011). A ligação do VEGF ao domínio extracelular do receptor promove a ativação da enzima tirosina-quinase no domínio citoplasmático do receptor, em uma etapa que envolve a autofosforilação e dimerização do receptor, ativando assim várias sinalizações intracelulares (**Figura 1**). Existem três tipos de receptores de VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (Neufeld *et al.*, 1999 ; Melincovici *et al.*, 2018). O VEGFR-2 é responsável pela maior parte das ações angiogênicas dos VEGFs. O receptor VEGFR-1 desempenha um papel supressor da sinalização de VEGFR-2, ao ligar o fator de crescimento com afinidade muito mais elevada, mas ter pouca capacidade de transduzir sinais (Simons *et al.*, 2016). Os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos predominantemente em células endoteliais vasculares (Shibuya *et al.*, 2006), mas também podem ser encontrados em células não endoteliais (Neufeld *et al.*, 1999; Duffy *et al.*, 2013), enquanto o VEGFR-3 é expresso especialmente no endotélio de células linfáticas (Hamrah *et al.*, 2004 ; Melincovici *et al.*, 2018).

Observações sugerem ainda que o VEGF desempenha um papel importante na angiogênese patológica, induzindo o desenvolvimento e a progressão de certas patologias no período pós-natal, tais como: crescimento tumoral e metástase, degeneração macular, retinopatia diabética, processos inflamatórios (por exemplo, artrite reumatóide), processos isquêmicos (isquemia miocárdica), pré-eclâmpsia etc. (Folkman *et al.*, 1995; Ferrara *et al.*, 2004; Maharaj *et al.*, 2006 ; Melincovici *et al.*, 2018).

Membros da família VEGF também pode interagir com outras proteínas, como neuropilinas, integrinas (Neufeld *et al.*, 1999 ; Cébe-Suarez *et al.*, 2006 ; Koch *et al.*, 2012) , caderinas ou proteoglicanos de sulfato de heparano (Cébe-Suarez *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2010). Os correceptores neuropilina-1 (NP-1) e neuropilina-2 (NP-2) são receptores não tirosina quinase e interagem seletivamente com certos subtipos ou isoformas de VEGF (como VEGF-A165) (Olsson *et al.*, 2006). As neuropilinas potencializam a função do VEGFR-2 e do VEGFR-3, orientando o endotélio na migração celular e na angiogênese.

A descrição das células endoteliais líderes (ou *tip cells*) na morfogênese de vasos sanguíneos – incluindo a angiogênese de adultos - mostrou que diversos fenótipos endoteliais coexistem em um vaso nascente, fato já sugerido por diversos

estudos seminais sobre a anatomia vascular (Gerhardt *et al*, 2003). As células-líderes são responsivas a fatores de crescimento como o VEGF, que se encontram aumentados em áreas onde a formação de novos vasos é requerida. Esses estímulos dão início à formação de brotamentos (*sprouts*). As células endoteliais secretam proteases que levam à degradação da lâmina basal. Em seguida, os pericitos se dissociam do vaso facilitando a migração das células-líderes em direção ao estímulo angiogênico. O estabelecimento do lúmen vascular ocorre à medida em que há a proliferação e o alinhamento das células endoteliais da haste (ou células *stalk*). A associação dos pericitos e a deposição de lâmina basal medeiam a estabilização do novo vaso formado (Ucuzian *et al*, 2010). (**Figura 2**)



Figura 2: Angiogênese

Nota explicativa: Durante a angiogênese, altos níveis de fatores pró-angiogênicos exógenos, como VEGF-A, e de sinalização do receptor 2 de VEGF (VEGFR2) selecionam *tip cells* (células líderes) para germinação. O comportamento de brotamento das *tip cells* é facilitado pelo afrouxamento mediado por caderina vascular das junções célula-célula endotelial, degradação mediada por metaloproteinase da matriz extracelular (MEC) e desprendimento de pericitos. O brotamento invasivo de *tip cells* é guiado por gradientes de fatores de crescimento pró-angiogênicos e várias pistas de orientação ambiental. Durante o alongamento do broto, as células líderes são seguidas por células *stalk* endoteliais (células de haste), que mantêm a conectividade com os vasos parentais e iniciam a morfogênese do lúmen vascular. Fonte: (Adaptado de PAUTY *et al.*, 2018).

Regulação da Permeabilidade endotelial

A permeabilidade endotelial é regulada e coordenada pela ligação entre células endoteliais através de junções. Acredita-se que o aumento da permeabilidade microvascular às proteínas plasmáticas sob condições inflamatórias ou fisiopatológicas agudas ocorra devido em grande parte à abertura da via paracelular (Majno & Palade, 1961). Essa rota também serve como via de migração para patógenos, leucócitos e até células tumorais metastáticas (Shen *et al.*, 2009). As proteínas juncionais interendoteliais são muito especializadas e responsáveis pela adesão célula-célula e "aperto da barreira", conferindo o controle da permeabilidade paracelular.

As junções aderentes (AJs) são críticas para a adesão célula-célula e são fortemente reguladas por vias moleculares complexas. A caderina endotelial vascular (VE) - ou VE-caderina - é a principal molécula de adesão celular encontrada em AJs endoteliais, desempenhando um papel importante na manutenção da função de barreira endotelial (Wallez et al., 2008). O bloqueio da VE-caderina pelo uso de anticorpos tem um efeito negativo na sobrevivência endotelial e aumenta a permeabilidade vascular (Corada et al., 2001). Além disso, camundongos com deficiência de VE-caderina sofrem de defeitos vasculares graves. incluindo brotamento vascular prejudicado. desorganização da camada endotelial em grandes vasos maduros e defeitos da regressão de vasos, resultando em morte no meio da gestação (Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999; Chrifi et al., 2019).

As AJs são estruturas dinâmicas, nas quais as moléculas de VE-caderina interagem de forma homofílica com células vizinhas. Essas junções podem ser reguladas ativamente, modulando assim a força adesiva juncional. Uma redução da expressão de VE-caderinas na membrana plasmática resultará em desestabilização microvascular e perda da função de barreira. A diminuição na força adesiva é necessária para a ruptura de AJs, a fim de permitir a migração de célula endotelial(CE) e adaptação morfológica em células líderes e haste durante o brotamento vascular (Chrifi I. *et al.*, 2019).

A integridade da barreira é mantida pelo balanço entre as forças contráteis de actinomiosina, da adesão célula-célula e pela força de ancoragem da célula à matriz extracelular (Dudek e Garvia, 2001 ; Kása *et al.*, 2015). A rede cortical do citoesqueleto é essencial na regulação da barreira da célula endotelial e o seu rompimento leva à formação de fendas entre as células e consequente aumento da permeabilidade vascular (Shasby, 1982; Verin, 2001; Kása *et al.*, 2015).

As alterações na função da barreira endotelial desempenham um papel importante na patogênese de muitos processos, incluindo inflamação, cicatrização de feridas, edema, lesão pulmonar aguda, acidente vascular cerebral e câncer (Wójciak-Stothard e Ridley, 2002). A manutenção e resposta da barreira quiescente a agentes vasoativos produzidos localmente, como a histamina, prostaglandinas, trombina e o VEGF, é medida principalmente pelas mudanças dinâmicas em junções aderentes e aumento da tensão centrípeta criado pela contratilidade da actinomiosina (Feng *et al.*, 1999; Dejana, 2004).

A VE-caderina é composta por módulos extracelulares típicos de caderinas (domínios de ligação ao cálcio, uma assinatura da superfamília das caderinas), um domínio transmembranar e um domínio intracelular que medeia interações com β -catenina, p120-catenina e γ -catenina, também conhecida como placoglobina. A β -catenina e a γ -catenina, por sua vez, se conectam à α -catenina de ligação à actina e a outras proteínas. O domínio extracelular da VE-caderina expressa em uma célula forma uma ligação homotípica com o domínio extracelular de outra molécula de VE-caderina expressa na membrana de uma célula endotelial adjacente. O complexo intracelular de VE-caderina e cateninas é essencial para a estabilidade juncional. Vasos de camundongos geneticamente modificados com complexos VE-caderina/ α -catenina estabilizados são resistentes a vazamentos (Schulte *et al.*, 2011; Claesson-Welsh *et al.*, 2021).

Os contatos célula-célula e as adesões célula-matriz atuam cooperativamente para manter a estabilidade das junções endoteliais. A estabilidade juncional é determinada por interações próximas entre integrinas nas adesões focais e caderinas nas junções endoteliais (Pulous *et al.,* 2019). A comunicação entre esses compartimentos pode envolver interações diretas da tirosina quinase citoplasmática FAK (quinase de adesão focal) e VE-caderina. A FAK participa da ancoragem do citoesqueleto de actina aos sítios de adesão focal. Embora a ativação de FAK mediada por integrina em adesões focais seja o indutor mais potente da atividade de FAK, FAK também pode ser ativada por quinases da família Src (SFKs) em junções celulares (Kleinschmid .*et al.*, 2017). Substratos para FAK, por sua vez, incluem paxilina, p130CAS, c-Src, cortactina, β -catenina e a própria VE-caderina (Sulzmaier *et al.*, 2014; Claesson-Welsh *et al.*, 2021).

Em resposta aos moduladores da permeabilidade vascular e ao fluxo sanguíneo, a VE-caderina sofre fosforilação da tirosina através da ação das quinases da família Src (SFKs) (Lampugnani *et al.*, 1997). Ambos os resíduos Y658 e Y685 são fosforilados (Conway *et al.*, 2017). O fluxo sanguíneo, seja laminar ou oscilatório, exerce forças nas adesões célula-matriz mediadas por integrinas, levando à ativação de FAK e SFK (Schwartz, 2010). A ativação de FAK/SFK, por sua vez, leva à fosforilação de proteínas associadas à actina e ao rearranjo do citoesqueleto. Um dos indutores de permeabilidade vascular nesse processo é o próprio VEGF-A, que promove a realocação de FAK do citosol para junções aderentes, a associação de FAK e VEcaderina, fosforilação de VE-caderina em Y658 e aumento da permeabilidade endotelial (Claesson-Welsh *et al.*, 2021) (**Figura 3**)



Figura 3: Vias de sinalização da VE-caderina

Nota explicativa: Vias de sinalização envolvidas na regulação da fosforilação e desfosforilação da VEcaderina em diferentes resíduos de tirosina ou serina. A ativação do VEGFR2 resulta na fosforilação da VEcaderina em seus sítios Tyr658, Ser665 ou Tyr685, principalmente pela atividade de c-Src. A ativação do VEGFR2 em seu sítio Tyr949 é regulada por Robo4 e Unc5B. A fosforilação de Tyr658 mediada por c-Src é induzida por tensão de cisalhamento. Fonte :(Adaptado de Azzi *et al.*, 2013).

Em regiões onde as interações homofílicas entre caderinas se rompem e lacunas se formam, a VE-caderina sofre internalização, seguida de reciclagem ou degradação por ubiquitinação (Orsenigo *et al.*, 2012). Múltiplas linhas de evidência sugerem que a resposta de hiperpermeabilidade a mediadores pró-inflamatórios pode ser mitigada se a integridade da internalização da VE-caderina for preservada. Várias estratégias foram desenvolvidas para estabilizar a adesão VE-caderina. Eles incluem superexpressão de p120-catenina, que bloqueia a internalização de VE-caderina mediada por clatrina (Xiao *et al.*, 2005 ; Alcaide *et al.*, 2012) expressão de uma quimera VE-caderina-α-catenina, que liga diretamente a adesão ao citoesqueleto de actina; e ponte artificial de moléculas opostas de VE-caderina em AJs com um peptídeo cíclico. Esta evidência sugere que é possível manipular a integridade da adesão VE-caderina, o principal *gatekeeper* da barreira endotelial. (Mariner *et al.*, 2001; Claesson-Welsh *et al.*, 2021).

Os complexos juncionais endoteliais envolvem ainda as junções oclusivas (*tight junctions* ou TJs). As proteínas TJ incluem claudinas, ocludinas e molécula de adesão de junção (JAM), e estas se conectam ao citoesqueleto de actina através da zona ocludina-1 (ZO-1). As proteínas TJ também estão presentes na microvasculatura periférica, mas acredita-se que sejam mais proeminentemente expressas no endotélio microvascular da barreira hemato-encefálica e nas barreiras hemato-retinianas (Hawkins & Davis, 2005). A claudina 5 é expressa de forma ubíqua em todos os leitos vasculares, enquanto as claudinas 1, 3 e 12 são específicas da microvasculatura cerebral. Claudin-1, -2 e -5 são encontradas em TJs de vasos retinianos (Luo *et al.*, 2011). Claudinas e ocludinas, em associação com as proteínas citosólicas Zonula occludens (ZO)-1, 2 e 3, montam estruturas do tipo "zíper" ao longo da borda das células endoteliais (Komarova *et al.*, 2017).

As TJs estão localizadas na parte mais externa das junções interendoteliais, mas também podem ser misturadas com as AJs. Em contraste com a microcirculação periférica, leitos vasculares altamente especializados, como a barreira hematoencefálica (BBB) e a barreira hematorretiniana interna (iBRB), onde a troca de solutos entre os microvasos e o cérebro é restrita, as TJs são predominantes na formação de extensas redes no lado apical das junções interendoteliais. A interrupção das TJs está associada ao vazamento de BBB e iBRB, uma característica de várias doenças humanas, incluindo retinopatia diabética e induzida por oxigênio (Luo *et al.*, 2011) e distúrbios do sistema nervoso central, como acidente vascular cerebral. (Yang *et al.*, 2007; Komarova *et al.*, 2017).

As TJs estão ligadas ao citoesqueleto de actina por meio das proteínas Zonula Occludens ZO-1, ZO-2 e ZO-3 expressas em células endoteliais. ZO-1 desempenha um papel crucial na montagem de TJs e AJs funcionais, regulando a interação cruzada entre TJs e AJs por meio do controle da tensão intracelular e montagem do complexo mecanossensorial VE-caderina (Tornavaca *et al.*, 2015). Em um estudo foi observado que ZO-1 funciona como um importante organizador do citoesqueleto na célula endotelial, e não apenas determina a distribuição geral da F-actina, mas também o recrutamento de proteínas juncionais estimuladoras de força e ligadores do citoesqueleto transmissores de força para complexos VE-caderina e, portanto, a força de tração atuando nas junções aderentes. A expressão diminuída de ZO-1 está associada ao vazamento grave de plasma observado na esclerose múltipla e em ratos diabéticos (Hawkins *et al.*, 2007; Komarova *et al.*, 2017).

RhoGTPases também estão envolvidas na desestabilização de AJs em resposta a estímulos mecânicos e humorais. O efeito da rede das RhoGTPases na integridade da barreira depende da natureza dos estímulos extracelulares e da ativação de vias de sinalização convergentes que são capazes de religar a sinalização de RhoGTPase para locais intracelulares específicos e estabelecer suas interações com efetores downstream específicos (Komarova *et al.*, 2017).

A sinalização de RhoA contribui principalmente para desestabilizar AJs e aumentar a permeabilidade endotelial (Wojciak-stothard *et al.*, 2005). RhoA promove a formação de fibras de estresse de actina e contração de actinomiosina através da ativação de efetores a jusante, como ROCK (Rho quinase). A montagem simultânea do aparelho contrátil através da ativação da sinalização ROCK leva à geração de tensão intracelular nas junções que desmonta AJs (Van *et al.*, 2007 ; Komarova *et al.*, 2017). A ROCK, um dos principais efetores da RhoA ativada, fosforila vários substratos, como a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLC): a fosforilação dessa fosfatase inibe a sua

atividade catalítica e o consequente aumento da fosforilação da MLC aumenta a reticulação de miosina com actina, o que resulta no aumento da contratilidade da actinomiosina. Com isso, afeta a dinâmica global do citoesqueleto de actina, levando ao aumento da formação de fibras de estresse e desestabilização de proteínas juncionais (Stockton *et al.*, 2010 ; Choi *et al.*, 2020).

Malformações cavernosas cerebrais (CCM)

A malformação cavernosa cerebral (CCM) é uma doença que afeta predominantemente a neurovasculatura. Essas lesões ocorrem pela mutação de perda de função de um dos genes, CCM1 (KRIT-1), CCM2 ou CCM3 (PDCD10) nas células endoteliais (Mikati *et al.*, 2015). Essa patologia está associada a lesões que carecem de músculo liso, tecido elástico e todos os elementos necessários para os vasos sanguíneos maduros. Os capilares agrupados são revestidos por uma única camada de endotélio incluída em uma matriz de colágeno densa e, portanto, caracterizados por uma parede de vaso não homogênea devido à presença de junções célula-célula defeituosas. Essa condição resulta no comprometimento da barreira hematoencefálica que a predispõe a episódios de trombose e sangramento. Devido às hemorragias cerebrais, os pacientes podem apresentar um risco aumentado de acidente vascular cerebral, convulsões, déficits motores e sensoriais e dores de cabeça inespecíficas (Faurobert *et al.*, 2010 ; Scimone *et al.*, 2018 ; Riolo *et al.*, 2021). **(Figura 4)**

Figura 4: Malformação Cavernosa Cerebral



Nota explicativa: Devido a mutações de perda de função dos genes CCM1, CCM2 e CCM3, as malformações cavernosas cerebrais apresentam vasos sanguíneos dilatados e hiperpermeáveis, de aspecto "bolhoso". As lesões não possuem músculo liso e tecido elástico, de modo que as paredes dos vasos são finas, com vazamento e falta de suporte subendotelial e uma lâmina basal intacta Fonte: (adaptado de http://bioaxonebio.com e de www.cavernoma.org).

A penetrância foi calculada em 0,5% na população geral em todo o mundo (1 em 200–250 indivíduos), mas a prevalência clínica é muito mais baixa porque até 50% dos indivíduos com CCM são assintomáticos (Krisht *et al.*, 2010 ; Akers *et al.*, 2017). Os sinais e sintomas clínicos são amplamente determinados pela localização, número e tamanho (de alguns milímetros a vários centímetros) das lesões. Visto que tanto o tamanho quanto o número de malformações podem mudar com o tempo, novos sinais e sintomas podem surgir em todas as fases da vida de um paciente. O tratamento difere entre a administração de medicamentos antiepilépticos em pacientes com convulsões e a ressecção cirúrgica do CCM em pacientes sintomáticos, lembrando que as lesões nem sempre são de fácil acesso (Gunel *et al.*, 2002 ; Krisht *et al.*, 2010 ; Spiegler *et al.*, 2018).

A CCM é classificada como forma esporádica (80%) e familiar (20%). A forma familiar de CCM tem o desenvolvimento de múltiplas lesões vasculares que tendem a aumentar em número e tamanho com a idade, enquanto a forma esporádica é caracterizada por apenas uma lesão. A CCM familiar é mais agressiva que a doença

esporádica, com início mais precoce, maior risco de hemorragia e convulsão (Rigamonti *et al.*, 1988 ; Del Curling *et al.*, 1991 ; Hasegawa *et al.*, 2002 ; Malinverno, *et al.*, 2019).

A CCM familiar tem se mostrado significativamente mais agressiva em indivíduos com mutação no gene *PDCD10* (Riant *et al.*, 2013 ; Fauth *et al.*, 2015).Embora as mutações heterozigóticas de perda de função (LOF) da linhagem germinativa em KRIT1, CCM2 ou PDCD10 causem CCM familiar como uma entidade clínica, elas não explicam por que as CCMs se apresentam como lesões focais em vez de um defeito vascular sistêmico, como seria de se esperar se as CCMs fossem o resultado de haploinsuficiência (Snellings *et al.*, 2021). Essa observação levou à hipótese de que um evento local secundário é necessário para iniciar a formação da lesão; especificamente, uma mutação somática em um gene CCM resultando em LOF bialélico. Mutações somáticas resultando em LOF bialélico de KRIT1, CCM2 ou PDCD10 foram relatadas em CCM familiares (Gault *et al.*, 2005 ; Gault *et al.*, 2009 ; Ren *et al.*, 2021) e esporádicas (McDonald *et al.*, 2014 ; Ren *et al.*, 2021) CCMs.

As manifestações clínicas da CCM familiar são altamente heterogêneas. Em muitas doenças genéticas, o principal determinante da progressão e gravidade é a mutação causal. No entanto, este não parece ser o caso da CCM (Snellings *et al.*, 2021). Embora diferentes mutações dentro de um gene não pareçam afetar a gravidade da doença, a identidade do gene mutado tem sido associada a várias características clínicas. Muitos grupos observaram uma associação entre indivíduos com mutações *KRIT1* e lesões vasculares cutâneas (Labauge *et al.*, 1999 ; Gianfrancesco *et al.*, 2007). Indivíduos com mutação em *CCM2* são mais propensos a serem assintomáticos e apresentam menor número de lesões em comparação com indivíduos com mutações no *KRIT1* ou *PDCD10* (Denier *et al.*, 2006).

Além disso, microdissecção por captura a laser e coloração imuno-histoquímica das proteínas CCM no endotélio da lesão estabeleceu que essas mutações ocorrem em células endoteliais (Akers *et al.*, 2009 ; Pagenstecher *et al.*, 2009 ; Rath *et al.*, 2020). Juntos, esses dados mostram que, embora a perda de um gene *CCM* seja dominante no nível de um indivíduo, ela é recessiva no nível celular, exigindo a perda do alelo normal por meio de mutação somática antes da formação da lesão (Snellings *et al.*, 2021).

O modelo *two-hit* da patogênese da CCM explica elegantemente por que as CCMs ocorrem como lesões focais e por que os indivíduos com CCM familiar apresentam numerosas lesões, enquanto os casos esporádicos quase sempre apresentam uma única lesão. O modelo *two-hit* também provou ser verdadeiro em modelos de CCM em camundongos, onde a perda bialélica de *Krit1, Ccm2* ou *Pdcd10* é necessária para a formação de lesões (Plummer *et al.*, 2004 ; McDonald *et al.*, 2011). Uma limitação desses modelos é que as lesões se formam apenas durante uma breve janela durante o desenvolvimento inicial. Esta observação é contraditória com o que encontramos na doença CCM humana, onde as lesões podem se formar ao longo da vida adulta (Detwiler *et al.*, 1997 ; Brunereau *et al.*, 2000).

Essa discrepância pode ser explicada pela recente descoberta de que muitos CCMs humanos abrigam mutações de ganho de função (GOF) no oncogene *PIK3CA*, além das mutações somáticas LOF observadas anteriormente nos genes *CCM*. Mutações GOF somáticas em *PIK3CA* estão presentes tanto em CCMs esporádicas (Hong *et al.*, 2021 ; Ren *et al.*, 2021 ; Weng *et al.*, 2021) quanto familiares de todos os três genótipos (Hong *et al.*, 2021 ; Ren *et al.*, 2021 ; Snellings *et al.*, 2021 ; Weng *et al.*, 2021). **(Figura 5)**

Trabalhos recentes descobriram que muitos CCMs esporádicos abrigam um ganho específico de mutação de função em *MAP3K3* (p.I441M), o gene que codifica MEKK3 (Hong *et al.*, 2021). Além disso, descobriu-se que as mutações em *MAP3K3* co-ocorrem com mutações em *PIK3CA*. No entanto, os dados iniciais sugerem que as mutações em *CCM* e *MAP3K3* são mutuamente exclusivas (Weng *et al.*, 2021). Esta descoberta sugere que o ganho de função em *MAP3K3* e perda de função em genes *CCM* têm consequências funcionais semelhantes, de modo que são suficientes para iniciar a formação de CCM, diferentemente das mutações em *PIK3CA* que exacerbam o crescimento da lesão, mas não são necessárias para a formação da lesão. Os efeitos equivalentes das mutações em *CCM* e *MAP3K3* são suportados pelo papel direto do complexo CCM na inibição da atividade MEKK3, de modo que o aumento da atividade MEKK3 (Snellings *et al.*, 2021).



Figura 5: Malformação Cavernosa Cerebral familiar e esporádica

Nota explicativa: No CCM familiar, a formação da lesão é iniciada por uma mutação somática em um gene CCM, resultando em perda bialélica de função que pode ocorrer várias vezes, resultando na formação de múltiplos CCMs quiescentes. Um subconjunto desses CCMs adquire um ganho somático de mutação de função em PIK3CA que alimenta o crescimento da lesão. Já a formação esporádica de CCM requer que duas mutações somáticas de CCM ocorram na mesma célula resultando em perda bialélica de função ou um único ganho de mutação somática de função em MAP3K3. Um CCM neste estágio pode ou não adquirir um ganho somático de função em PIK3CA que alimentaria o crescimento da lesão. Fonte: (Adaptado de Snellings *et al.*, 2021)

Estudos da sinalização de MEKK3 em cultura de fibroblastos demonstraram que ela é necessária para a sinalização inflamatória imune inata em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e à interleucina 1^β (IL1^β) (Huang *et al.*, 2004). Uma primeira pista ligando a doença CCM a sinais inflamatórios em células endoteliais cerebrais veio de estudos genéticos humanos que associaram polimorfismos nos genes que codificam TLR4, um receptor de LPS e seu co-receptor CD14 com a forma de doença familiar mais grave da CCM (Choquet *et al.*, 2014). Essa conexão permaneceu misteriosa até que estudos em camundongos demonstraram que a carga de lesões de CCM variava de grave a quase imperceptível, dependendo da instalação de camundongos em que os animais estavam alojados. Camundongos em uma colônia resistente só geraram lesões de CCM quando desenvolveram abscessos bacterianos gram negativos, sugerindo que o LPS derivado de bactérias gram negativas (GNB) impulsiona a formação de lesões. Essa hipótese foi apoiada pela capacidade de

prevenir a formação de lesões de CCM em animais suscetíveis com deleção endotelialespecífica do receptor TLR4 (Tang *et al.*, 2017).

Ainda, a suscetibilidade à formação de lesões CCM em camundongos rastreados para o conteúdo GNB do microbioma intestinal e o tratamento de animais suscetíveis com antibióticos ou alojamento em condições livres de germes impediram a formação de CCM (Tang et al., 2017), indicando que o LPS de GNB que residem no microbioma intestinal é um condutor essencial da formação de CCM no cérebro. É importante ressaltar que esses estudos em camundongos são apoiados pela análise do microbioma intestinal em humanos com e sem doença sintomática da CCM. Os estudos em humanos confirmam a importância do LPS derivado de GNB e definem um microbioma permissivo, caracterizado por espécies de bacteroides mais abundantes, na doença CCM humana (Polster et al., 2020). Essas descobertas inesperadas estabeleceram um eixo de doença intestino-cérebro particularmente direto, no qual o GNB no microbioma intestinal fornece um ligante, LPS, necessário para ativar os receptores TLR4 e a sinalização MEKK3-KLF2/4 a jusante, nas células endoteliais cerebrais. Eles ainda identificam a sinalização inflamatória como o principal condutor da formação da CCM *in vivo* e sugerem que futuras estratégias diagnósticas e terapêuticas baseadas na manipulação do microbioma intestinal podem ser usadas para tratar os CCM (Snellings et al., 2021).

Voltando para os aspectos moleculares diretamente relacionados às proteínas CCM, os três genes *CCM* codificam proteínas adaptadoras capazes de formar um complexo proteico [CCM1-2-3] que interage adicionalmente com outras proteínas (Uhlik *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2017). A CCM1 (KRIT1), a maior das proteínas CCM, contém um domínio Nudix N-terminal seguido por um trecho de três motivos (Liu *et al.*, 2013), um domínio previsto de repetição de homologia a anquirinas e um domínio C-terminal FERM (Li *et al.*, 2012; Gingras *et al.*, 2013). Essa proteína é observada em muitos compartimentos celulares diferentes e é ativamente transportada entre o citoplasma e o núcleo (Zawistowski *et al.*,2005). KRIT1 também pode ser encontrada nos limites das células endoteliais ou nas junções célula-célula através de seu domínio FERM (Zawistowski *et al.*, 2005 ; Glading *et al.*, 2007).

A proteína CCM2, também conhecida como malcavernina, apresenta um padrão de expressão muito semelhante ao de CCM1/ KRIT1 (Petit *et al.*, 2006 ; Seker

et al., 2006), atuando como o centro do complexo CCM, ligando simultaneamente o KRIT1 e o PDCD10, além de várias outras proteínas de sinalização (Hilder *et al.*, 2007). Essa proteína apresenta um domínio PTB no seu domínio N-terminal e um domínio helicoidal na sua porção C-terminal, denominado domínio de homologia à harmonina (HHD) (Fisher *et al.*, 2013).

Já a proteína CCM3, que é o terceiro componente do complexo heterotrimérico KRIT1-CCM2-PDCD10 (Hilder *et al.*, 2007), contém um domínio de dimerização N-terminal e um domínio C-terminal FAT-H (*focal adhesion targeting (FAT)-homology*, ou de direcionamento à adesão focal). O gene CCM3, também conhecido como gene da morte celular programada 10 (PDCD10) foi originalmente identificado como um gene relacionado à apoptose, embora agora seja normalmente conhecido como o terceiro gene causador da malformação cavernosa cerebral (CCM). A proteína PDCD10/CCM3 tem múltiplas localizações subcelulares e interage com vários complexos multiproteicos e vias de sinalização. Assim, PDCD10/CCM3 governa muitas funções celulares, que incluem junções célula a célula e organização do citoesqueleto, proliferação celular, apoptose, exocitose e angiogênese. Dado seu papel central na manutenção da homeostase da célula, a desregulação de PDCD10/CCM3 pode resultar em uma ampla gama de funções celulares alteradas. Isso pode levar a doenças graves, incluindo CCM (Valentino *et al.*, 2020).

A função da proteína PDCD10/CCM3 reside em duas regiões principais: seu domínio de dimerização na região N-terminal e seu domínio de homologia de direcionamento à adesão focal (FAT-H), na extremidade C-terminal. O domínio de dimerização compreende quatro α-hélices e é necessário para a homodimerização PDCD10/CCM3. Além disso, foi levantada a hipótese de que essa região inclui um domínio de ligação e fosforilação da serina/treonina quinase que é responsável pela interação de PDCD10/CCM3 com as proteínas quinase do centro germinativo (GCK) III, que resulta na formação de heterodímeros. O domínio de homologia à FAT é similarmente composto por quatro α-hélices e é responsável pelas interações diretas entre PDCD10/CCM3 e o domínio de ligação de fosfotirosina de CCM2/malcavernina. Além disso, o domínio de homologia à FAT possui uma região de superfície conhecida como 'patch hidrofóbico 1', através da qual PDCD10/CCM3 interage com várias proteínas parceiras, incluindo o componente estriatina nos complexos de fosfatase e

quinase de interação com estriatina (STRIPAK), os fosfatidilinositídeos, e paxilina, através do reconhecimento de motivos ricos em leucina. Além disso, foi sugerido que, por meio de sua região C-terminal, PDCD10/CCM3 interage e estabiliza a sinalização do receptor 2 do fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF) (Li *et al.*, 2010 ; He *et al.*, 2010 ; Draheim *et al.*, 2015 ; Valentino *et al.*, 2020) (Figura 6).

Assim, as proteínas CCM cumprem papéis críticos em muitos eventos celulares, como polaridade celular, reorganização do citoesqueleto, proliferação celular, adesão celular e migração, impactando a angiogênese, integridade da junção célula-célula, permeabilidade vascular e apoptose (Gianfrancesco et al., 2008; Riolo et al., 2021). A natureza hereditária da CCM e a descoberta de genes relacionados à doença despertou o interesse em investigar seus papéis funcionais. A expressão ubíqua dos três genes CCM em várias células e tecidos fornece evidências de sua contribuição em várias condições fisiológicas e patológicas (Abou-Fadel et al., 2020). No entanto, o tipo celular mais fortemente associado às malformações cavernosas é a célula endotelial. O papel desempenhado pelos genes da CCM em outros modelos celulares estritamente associados à localização das lesões (ou seja, células neuronais, astrócitos, pericitos e células do músculo liso) é desconhecido, e não há evidências sobre as contribuições diretas destas células para a patologia da CCM (Su et al., 2020). Provavelmente existe uma estreita interação entre as células endoteliais e a glia no sistema nervoso central (SNC), o que pode explicar por que as mutações nos genes relacionados à CCM são seguidas pelo aparecimento de lesões predominantemente localizadas no cérebro e na medula espinhal (Orsenigo et al., 2020; Riolo et al., 2021). Figura 6: Estrutura das proteínas CCM



Nota explicativa: Estrutura das proteínas CCM: A proteína KRIT1 apresenta um domínio Nudix N-terminal seguido por um trecho de três motivos, um domínio previsto de repetição de anquinas e um domínio C-terminal FERM. A CCM2 um domínio PTB no seu domínio terminal N e um domínio helicoidal no seu terminal C denominado domínio da harmonina-homologia (HHD) e a CCM3 apresenta um domínio de dimerização N-terminal e um domínio de homologia focal de adesão C-terminal (FAT-H). Fonte: (Adaptado de Fisher, 2014).

Os CCMs são caracterizados por uma vasculatura com vazamento decorrente de junções célula-célula alterada. As proteínas CCM operam individualmente e afetam diferentes vias de sinalização, mas também estão envolvidas em cascatas de sinalização molecular convergentes, atuando como um complexo trimérico ou não. No endotélio, as adesões célula-célula e célula-ECM ocorrem principalmente por meio de VE-caderinas e integrinas, respectivamente. Conforme já descrito no ítem 1.2 desta Introdução, várias quinases e receptores estão envolvidos nesta rede, incluindo a família Rho de GTPases (RhoA, Cdc42 e Rac). As proteínas CCM, que regulam estritamente a manutenção da barreira endotelial, polaridade celular e contratilidade citoesquelética (Riolo *et al.*, 2021), modulam a sinalização dependente de RhoA, uma das cascatas de sinalização mais bem caracterizadas no controle da permeabilidade endotelial. A permeabilidade vascular e a formação de fibras de estresse são aumentadas em casos de silenciamento do gene CCM (Stockton *et al.*, 2010; Corr *et al.*, 2012; Shenkar *et al.*, 2015).

RhoA e seu efetor ROCK estão envolvidos na remodelação do citoesqueleto de actina e na integridade juncional, a fim de permitir que as células endoteliais migrem adequadamente quando estimuladas. As proteínas CCM são essenciais para inibir o acúmulo de RhoA e prevenir a hiperatividade da Rho quinase (ROCK) e a consequente disfunção da barreira endotelial, pois a expressão diminuída de qualquer uma das proteínas CCM, leva ao aumento da atividade RhoA e ROCK, que por sua vez aumenta a fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina (MLC), causando a contração da actinomiosina que afeta a migração celular e a integridade da junção intercelular (Wei *et al.*, 2020).

Além da sinalização no eixo RhoA-ROCK, processos celulares adicionais têm sido descritos como alvos para proteínas CCM, na regulação da barreira endotelial. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) não só promove o crescimento endotelial, mas também aumenta a permeabilidade endotelial (Lange *et al.*, 2016). Foi

demonstrado que a perda de KRIT1 e PDCD10, mas não de CCM2, aumenta a produção de VEGF nas células endoteliais, e o VEGF, por sua vez, atua no VEGFR2 para aumentar a permeabilidade endotelial (DiStefano *et al.*, 2014). No entanto, a evidência existente também sugere que o PDCD10 é necessário para a sinalização VEGFR2 adequada (He *et al.*, 2010), indicando que a relação entre as proteínas CCM e a sinalização induzida pelo VEGF pode ser complexa.

PDCD10/CCM3 pode ser definido como uma proteína multifuncional, porque regula uma variedade de funções celulares separadamente de CCM1 e CCM2. Seus papéis únicos podem ser a razão pela qual, uma vez mutado, o CCM3 dá origem a uma forma mais agressiva de CCM. Estudos recentes destacaram que PDCD10 desempenha papéis duplos em ambas as extremidades do eixo da doença CCM intestino-cérebro. Estudos da doença CCM familiar mostraram que a perda, na linhagem germinativa, de KRIT1 ou CCM2 resulta em um curso semelhante da doença, com a doença sintomática surgindo com mais frequência na meia-idade. Em contraste, descobriu-se que a doença CCM familiar, devido à perda germinativa de um alelo PDCD10, resulta em doença mais precoce e mais grave, muitas vezes apresentando-se como acidente vascular cerebral na infância (Shenkar *et al.*, 2015).

Uma vez que as três proteínas CCM contribuem igualmente para o complexo molecular CCM, a base para esta diferença na história natural da doença não é clara. A resposta para esse quebra-cabeça acaba sendo um papel duplo para PDCD10 na doença CCM. Estudos de deleção genética em camundongos demonstram que no endotélio cerebral o PDCD10 é necessário da mesma forma que KRIT1 ou CCM2, ou seja, como um componente necessário do complexo CCM (Tan *et al.*, 2019). No epitélio intestinal, no entanto, o PDCD10 é necessário para a secreção de muco pelas células caliciformes, uma parte crítica da barreira intestinal que separa os bilhões de bactérias da parede intestinal e da vasculatura. Essa função não é compartilhada com KRIT1 e CCM2, e provavelmente é mediada pela participação de PDCD10 no complexo STRIPAK, que não contém essas proteínas (Tang *et al.*, 2019). A perda germinal de um alelo PDCD10 reduz a barreira intestinal, permitindo assim a translocação de LPS derivado de GNB para o sangue e acelerando o crescimento de lesões CCM no cérebro que se formam após a perda de PDCD10 em células endoteliais cerebrais. Essas descobertas destacam a importância do eixo intestino-

cérebro para a doença CCM e a barreira intestinal na prevenção da formação de CCM ao longo da vida de um indivíduo (Snellings *et al.*, 2021).

Modelos experimentais para estudos do cavernoma cerebral

Os estudos sobre os cavernomas cerebrais têm sido conduzidos com modelos de células geneticamente modificadas, produzidos principalmente a partir de silenciamento por RNA de interferência ou geração de linhagens nocaute pela tecnologia de CRISP/Cas9. (Wang *et al.*, 2021), de maneira a obter células que mimetizem o fenótipo cavernomatoso. Células endoteliais silenciadas para a expressão das proteínas CCM são bastante utilizadas e têm permitido a elucidação de mecanismos importantes para a compreensão da patologia. Esse tipo de modelo possibilita o estudo das respostas geradas nas células pelo silenciamento, como alterações na migração, angiogênese, permeabilidade vascular e tubulogênese (Whitehead *et al.* 2009; Borikova *et al.*, 2010; Stockton *et al.*, 2010).

De forma geral, o desenvolvimento da estratégia de silenciamento por RNA de interferência constitui uma ferramenta poderosa bastante utilizada em estudos de identificação e função gênica (Hunter, 1999; Barbosa e Lin, 2004; Liu *et al.*, 2009). Pesquisas com doenças hereditárias de caráter dominante, principalmente com doenças neurodegenerativas (Pelletier *et al.*, 2006; Denovan-Wright e Davidson, 2006), apontavam a estratégia RNA de interferência (RNAi) como uma possibilidade de aplicação clínica direta, isto é, como um agente terapêutico. Além disso, estudos com RNAi também podem auxiliar na associação de doenças com agentes terapêuticos já existentes (Martin e Caplen, 2007; Paganin-Gioanni, 2019). A transfecção pelo método de eletroporação tem sido um dos procedimento mais utilizados para fazer as construções de silenciamento atravessarem as barreiras existentes para chegar ao interior da célula (Potter e Heller, 2017). Estudar as funções endógenas, através do uso de células silenciadas para a expressão de proteínas CCM por pequenos RNAs de

interferência (siRNA) revelou alguns processos celulares e vias de sinalização que contribuem para a patogênese da CCM (Stockton *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2021).

A identificação das proteínas CCM impulsionou o campo não apenas ao revelar processos celulares e vias de sinalização subjacentes à patogênese dos cavernomas cerebrais, mas também ao facilitar o desenvolvimento de modelos animais para estudar a função das proteínas CCM. Os modelos animais de CCM variam de vários modelos murinos a modelos de peixe-zebra, com cada modelo fornecendo informações únicas sobre o desenvolvimento e a progressão das lesões de CCM. Além disso, esses modelos animais servem como modelos pré-clínicos para estudar as opções terapêuticas para o tratamento da CCM (Phillips *et al.*, 2022).

Em modelos animais, o nocaute global das proteínas CCM resulta em letalidade embrionária devido à falha na angiogênese (Boulday *et al.*, 2009; Cunningham *et al.*, 2011 ; Chan *et al.*, 2011). Embora esses modelos não sejam viáveis para estudar a patogênese da CCM, eles se mostraram úteis para elucidar os papéis das proteínas CCM no desenvolvimento. Um outro tipo de modelo animal desenvolvido são os modelos CCM sensibilizados, que foram desenvolvidos devido ao padrão de herança autossômica dominante de malformação cavernosa cerebral familiar (fCCM). Camundongos heterozigotos para proteínas CCM desenvolvem lesões CCM, particularmente camundongos Ccm3^{+/-}; no entanto, a penetrância é baixa (Plummer *et al.*, 2006). Para aumentar a penetrância, modelos de CCM sensibilizados foram gerados através do cruzamento de camundongos heterozigotos para uma das proteínas CCM com uma linhagem de camundongos geneticamente instáveis, como camundongos Trp53^{-/-} ou Msh2^{-/-} (McDonald *et al.*, 2011). Seguindo o mecanismo proposto de *two-hit*, o aumento da instabilidade genética resulta na perda do alelo Ccm funcional restante (McDonald *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2022).

Cada modelo experimental fornece seu próprio conjunto de ressalvas. Uma tecnologia bastante utilizada também é a de recombinase Cre induzível por tamoxifeno (CreERT2), que foi aproveitada para gerar camundongos nocaute CCM induzíveis (Phillips CM. *et al.*, 2022). O uso deste modelo particular de CCM para estudar a patogênese dos cavernomas resultou em uma compreensão abrangente das vias de sinalização celular, como MEKK3/KLF2/4 e PI3K/Akt/mTOR, que contribuem para a formação de lesões de CCM (Zhou *et al.*, 2016 ; Ren *et al.*, 2021). Além disso, o uso

de um único modelo murino CCM em laboratórios aumentou a reprodutibilidade dos resultados. Um estudo feito pelo grupo de Mark Ginsberg em 2017 (Lopez-Ramirez *et al.*, 2017) utilizou um modelo de camundongos geneticamente modificados, os camundongos Krit1 nulos condicionais específicos para o endotélio, que foram gerados pela criação de camundongos transgênicos que expressam a recombinase Cre regulada por tamoxifeno. Nesse estudo, foi possível observar que a inativação aguda de Krit1 causa mudanças rápidas na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento cardiovascular. O mais notável foi a supressão também é observada na CCM humana e segue o aumento na expressão dos fatores de transcrição KLF2 e KLF4 (Lopez-Ramirez *et al.*, 2017).

Em resumo, esses modelos, especialmente aqueles que retratam a progressão da lesão *in vivo*, são úteis para desenvolver e testar terapêuticas para a estabilização das lesões cavernomatosas. Através da exploração dos pontos fortes de cada modelo experimental, deverá ser alcançada uma compreensão mais completa dos mecanismos moleculares que conduzem à formação e progressão dos cavernomas, permitindo o desenvolvimento de terapias mais eficazes (Phillips *et al.*, 2022).

Trombospondina-1

As trombospondinas (TSPs) são glicoproteínas matricelulares ligantes de cálcio que formam uma família de 5 membros, composta de glicoproteínas com múltiplos domínios. As TSPs são sintetizadas, secretadas e incorporadas na matriz extracelular de uma variedade de células normais e transformadas de ambas as origens, epiteliais e mesenquimais (Adams e Lawler., 2011). Devido às suas interações com os receptores da superfície celular, fatores de crescimento, citocinas ou componentes de trombospondinas da MEC podem influenciar muitos processos complexos específicos de tecidos. A característica que a TSP-1 tem como proteína matricelular-ícone é a sua habilidade tanto de inibir quanto de estimular a angiogênese através de interações com seus múltiplos domínios funcionais, sendo envolvida em numerosas atividades

biológicas tais como adesão, migração, proliferação e angiogênese (Lawler e Lawler, 2012). Evolutivamente, as trombospondinas são proteínas conservadas com mais de 95% de homologia entre proteínas murinas e humanas (Masli *et al.*, 2014). A TSP-1 foi primeiro membro identificado, como um produto de secreção dos grânulos-α de plaquetas ativadas pela trombina (Baezinger., 1971). Esta glicoproteína é um homotrímero de 450kDa, formada por uma cadeia de 150kDa, contendo os seguintes domínios estruturais: (i) um domínio globular N-terminal, que contém motivos-consenso básicos de ligação à heparina (Heparin-Binding Domain, ou HBD); (ii) uma sequência de motivos repetidos de três tipos diferentes, as de tipo 1 (TSRs ou 3TSRs) com homologia a properdina, tipo 2 ou de homologia ao EGF (EGF-like) e tipo 3 ou domínios de ligação ao Ca²⁺, muito conservado em todas as TSPs; e (iii) um domínio globular C-terminal (domínio de "assinatura" da família, o mais conservado entre as espécies) **(Figura 7).**

A trombospondina-1 (TSP-1) se liga a ligantes da matriz extracelular, incluindo fibrinogênio, fibronectina, alguns colágenos, TGFβ1 latente e ativo (fator de crescimento beta-1 transformador), TNFAIP6 (TSG6), heparina, plasmina, CTSG (catepsina G), ELANE (elastase de neutrófilos), alguns MMPs, inibidor da via do fator tecidual e proteoglicanos de sulfato de heparano (Resovi et al., 2014).



Figura 7: Estrutura da trompospondina 1 (TSP-1)

Nota explicativa: Estrutura da trompospondina 1 (TSP-1). A TSP-1 é uma glicoproteína homotrimérica de 450kDa, formada por uma cadeia de 150kDa, contendo os seguintes domínios estruturais: um domínio globular N-terminal, uma sequência de motivos repetidos de três tipos diferentes, as de tipo 1 (3TSRs) e um domínio globular C-terminal (domínio de "assinatura" da família).

As TSPs são proteínas de elevado peso molecular e portadora de múltiplos domínios estruturais/funcionais, que interagem com uma ampla gama de outras

proteínas. Como tal, suas funções são dinâmicas e pleiotrópicas. Sua capacidade de participar de uma extensa gama de processos fisiológicos e patológicos, incluindo sinaptogênese, angiogênese, apoptose, agregação plaquetária, resposta inflamatória e reparo de feridas, foi evidenciada pelas pesquisas das últimas três décadas (Wu *et al.*, 2017).

TSP-1 foi considerada o primeiro inibidor natural da angiogênese, em experimentos empregando um modelo de angiogênese da córnea em ratos (Good et al, 1990). A partir desses achados iniciais, a modulação da expressão da TSP-1 vem sendo considerada como uma importante estratégia anti-tumoral. Esta proteína inibe o crescimento de novos vasos sanguíneos por variados mecanismos solidamente comprovados: (a) a TSP-1 inibe a proliferação e migração de células endoteliais vasculares in vitro e inibe a neovascularização in vivo (Tolsma et al., 1993; Jimenez et al., 2000); (b) a indução da apoptose endotelial também foi caracterizada, principalmente relacionada à interação dos domínios TSR com o receptor CD36 na superfície das células endoteliais (Dawson et al, 1997); (c) os motivos TSR (via CD36, em cooperação com integrinas e tetraspaninas) levam também à desfosforilação de VEGFR2, por meio do recrutamento da fosfatase SHP1 (Primo et al, 2005; Zhang et al, 2009); (d) a TSP-1 também foi implicada no bloqueio do eixo de sinalização do óxido nítrico (NO)-cGMP (ativado por VEGF), através de uma cooperação do receptor CD36 com o CD47, porém envolvendo a região C-terminal da TSP-1(Gao et al., 1996). A interação do TSP-1 com o CD47 também inibe a angiogênese independentemente do NO, por interação direta deste receptor com o VEGFR2 (Kaur et al, 2010; Roberts et al, 2012); (e) a TSP-1 modula a presença e ativação de fatores angiogênicos na matriz extracelular. A proteína se liga diretamente aos fatores angiogênicos VEGF e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto), seja impedindo sua associação com os receptores tirosina-quinase, seja estimulando a internalização/degradação dos fatores presentes na matriz (Greenaway et al., 2007; Gupta et al., 1999; Margosio et al, 2008); (f) por fim, a TSP-1 controla a liberação de VEGF da matriz extracelular, ao inibir a atividade das metaloproteinases da matriz (Bein et al., 2000 ; Rodriguez-Manzaneque et al., 2001). (Figura 8).

Figura 8: Sinalização de TSP-1



Nota explicativa: TSP-1 liga-se a CD36 para ativar proteases semelhantes a caspase-3 e proteínas cinases ativadas por mitógeno p38, resultando em apoptose de células endoteliais vasculares. O TSP-1 liga o CD47 para inibir a migração e a proliferação das células endoteliais vasculares, por meio da supressão das respostas das células vasculares estimuladas pelo óxido nítrico. TSP-1 se liga e sequestra o fator de crescimento de fibroblasto molecular pró-angiogênico 2 (FGF2). Ao suprimir a ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), a TSP-1 inibe a liberação do fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: (Adaptado de Foulsham *et al.*, 2019).

No entanto, no contexto da angiogênese tumoral, estudos de diferentes tumores mostraram que uma elevada expressão de TSP-1 nem sempre é eficaz para frear a progressão do câncer, através de sua potente capacidade de inibir a angiogênese. Uma revisão sistemática apontou consistentemente que elevados níveis de TSP-1 nos cânceres de mama estão correlacionados com aumento da invasão e malignidade e a uma maior ocorrência de metástases (Zhao *et al.*, 2018). Tuszynski e colaboradores (1987) foram os primeiros a descrever a importância da TSP-1 em carcinoma de mama: a injeção i.v. de TSP-1 em camundongos, previamente à inoculação de células tumorais, aumentou o número de metástases pulmonares. Este resultado foi relacionado à habilidade da TSP-1 promover a adesão de células tumorais à parede dos vasos, observação corroborada pelo estudo de Incardona e colegas (1995), no qual observamos que a TSP-1 promove a interação célula-célula entre células tumorais de mama organizadas em esferóides, bem como estimula a interação desses agregados com o endotélio, sugerindo que esta molécula possa estar envolvida nos efeitos pró-metastáticos apontados para a TSP-1 *in vivo*. Yee e colegas (2009)

demonstraram que tumores gerados espontaneamente na mama de camundongos KO para TSP-1, apesar de menos vascularizados, são mais metastáticos. Ainda, em amostras clínicas, a expressão de TSP-1 no estroma de carcinomas ductais se correlacionou positivamente com uma maior invasão e maior densidade microvascular (Bertin *et al.*, 1997).

O cenário se tornou ainda mais complexo pelo fato da TSP-1 também ser capaz de estimular a angiogênese, por ação de seu domínio N-terminal, quando separado da molécula intacta. As propriedades pró-angiogênicas do domínio de ligação à heparina N-terminal da TSP-1 (NTSP-1), foram descritas independentemente por diferentes grupos (Taraboletti et al, 2000; Chandrasekaran et al, 2000; Ferrari-do-Outeiro et al, 2002), com a identificação de diferentes mecanismos de ação em cada caso. Verificouse que um NTSP-1 de 25 kDa induz a angiogênese estimulando a invasão endotelial, através do aumento da atividade de MMP2 e MMP9 (Taraboletti et al, 2000). Juntamente com dois outros membros da subfamília da integrina $\beta 1$ ($\alpha 4\beta 1$ em células venosas e $\alpha 6\beta 1$ em células microvasculares), a integrina $\alpha 3\beta 1$ foi implicada no reconhecimento de NTSP-1, ou de motivos peptídicos derivados deste região (Calzada & Roberts, 2005). Essas interações promoveram respostas pró-angiogênicas em células endoteliais, tanto in vitro quanto in vivo (Chandrasekaran et al, 2000). Nosso grupo demonstrou que este domínio compete com a fibronectina pela ligação ao proteoglicano de heparan-sulfato sindecan-4, expresso na membrana plasmática, levando ao relaxamento da adesão celular e ao aumento da tubulogênese (Ferrari do Outeiro et al., 2002; Nunes et al. 2008; Dias et al, 2012).

Embora no contexto da molécula intacta a atividade pró-angiogênica da TSP-1 seja eclipsada pela atividade dos domínios anti-angiogênicos, é possível que a clivagem proteolítica de TSP-1 possa gerar este domínio nos tecidos (Iruela-Arispe., 2008). Deve ser ressaltado que diversas proteases cruciais para o processo angiogênico tumoral e inflamatório - plasmina, trombina e catepsinas, dentre as mais importantes – geram rapidamente fragmentos N-terminais da TSP-1 biologicamente ativos (Carminati *et al.*, 2023), tornando factível a hipótese de que tais fragmentos N-terminais se acumulem no microambiente tumoral e em outros sítios inflamatórios patológicos, possivelmente exercendo ali efeitos clinicamente relevantes.

O grupo de Iruela-Arispe (2006) demostrou a presença de fragmentos do domínio NTSP-1 clivados por protease *in vivo*, analisando cortes histológicos de camundongos submetidos ao ensaio de cicatrização (Lee *et al*, 2006). Esse resultado foi associado à presença da protease ADAMTS1, visto que camundongos deficientes desta proteína (ADAMTS1-/-) não apresentaram marcação positiva para os fragmentos. A TSP-1 também é clivada por catepsinas, elastase leucocitária e plasmina (Iruela-Arispe *et al.*, 2008). Enquanto a clivagem do TSP-1 pela elastase e plasmina resulta na degradação da proteína, a exposição à catepsina G resulta em um único corte localizado na região aminoterminal e liberando um fragmento de aproximadamente 28kDa que inclui o domínio de ligação à heparina e um fragmento maior (165kDa) da região carboxi-terminal (Chen *et al.*, 2018).

Recentemente, foi observado que células endoteliais cavernomatosas vinculadas a mutações em CCM1 apresentam expressão reduzida de TSP-1 (Lopez-Ramirez *et al.*, 2017). O fenótipo cavernomatoso *in vitro* foi atenuado pela exposição das células à TSP-1 (molécula íntegra) ou a formas sintéticas das repetições tipo I (TSRs) anti-angiogênicos, adicionados de maneira exógena. As mutações CCM1 também causaram hiperativação da sinalização dependente de VEGF (característica dos cavernomas), que também foi inibida por TSP-1 ou por TSRs.

O domínio NTSP-1 exerce atividades antagônicas aos motivos TSRs antiangiogênicos e, conforme citado, pode ser gerado por proteases prevalentes em ambientes inflamatórios, como das lesões de cavernoma (Goitre *et al.*, 2010). Assim, considerando que o domínio 3TSR (ou seja, com três repetições, como na molécula intacta) corrige o fenótipo cavernomatoso, levantamos a hipótese de que a liberação por proteólise do domínio NTSP-1 (pró-angiogênico), em decorrência da possível ação de proteases, possa contribuir de forma antagônica aos 3TSR, para o estabelecimento do fenótipo endotelial cavernomatoso.

Objetivo Geral

Investigar o possível papel da TSP-1 e de seu domínio N-terminal próangiogênico (ou de peptídeos dele derivados) no fenótipo endotelial cavernomatoso baseado no silenciamento da proteína CCM3.

Objetivos específicos

- a) Padronizar e caracterizar funcionalmente o modelo endotelial silenciado para expressão da proteína CCM3 quanto à expressão de proteínas adesivas, proliferação celular e diferenciação endotelial;
- b) Estudar a expressão de TSP-1 nas células endoteliais silenciadas
- c) Investigar a proteólise da TSP-1 em células CCM3(-), com ênfase na prospecção de fragmentos N-terminais, ao longo do período de silenciamento genético (24 a 96 horas pós-transfecção).

O domínio NTSP-1 exerce atividades antagônicas aos motivos TSRs antiangiogênicos e, conforme citado, pode ser gerado por proteases prevalentes em ambientes inflamatórios, como das lesões de cavernoma (Goitre *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS

- ABOU-FADEL J, QU Y, GONZALEZ EM, SMITH M, ZHANG J. Emerging roles of CCM genes during tumorigenesis with potential application as novel biomarkers across major types of cancers. **Oncol Rep**. 2020, 43:1945-1963.
- ADAMS JC, LAWLER J. The thrombospondins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011, 3a009712.

ADES EW, CANDAL FJ, SWERLICK RA, GEORGE VG, SUMMERS S, BOSSE DC, LAWLEY TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. **J Invest Dermatol**. 1992, 99:683-690

- AKERS A, AL-SHAHI SALMAN R, A AWAD I, DAHLEM K, FLEMMING K, HART B, KIM H, JUSUE-TORRES I, KONDZIOLKA D, LEE C, MORRISON L, RIGAMONTI D, REBEIZ T, TOURNIER-LASSERVE E, WAGGONER D, WHITEHEAD K. Synopsis of Guidelines for the Clinical Management of Cerebral Cavernous Malformations: Consensus Recommendations Based on Systematic Literature Review by the Angioma Alliance Scientific Advisory Board Clinical Experts Panel. Neurosurgery. 2017, 80665-80680.
- AKERS AL, JOHNSON E, STEINBERG GK, ZABRAMSKI JM, MARCHUK DA. Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCMs): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. **Hum Mol Genet**. 2009, 18:919-930
- ALCAIDE P, MARTINELLI R, NEWTON G, WILLIAMS MR, ADAM A, VINCENT PA, LUSCINSKAS FW. p120-Catenin prevents neutrophil transmigration independently of RhoA inhibition by impairing Src dependent VE-cadherin phosphorylation. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2012, 303:C385-95
- AZZI S, HEBDA JK, GAVARD J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. **Front Oncol.** 2013, 3:211
- BEIN K, SIMONS M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. **J Biol Chem**. 2000, 275:32167-32173
- BORIKOVA AL, DIBBLE CF, SCIAKY N, WELCH CM, ABELL AN, BENCHARIT S, JOHNSON GL. Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. **J Biol Chem**. 2010, 285:11760-11764.
- BOULDAY G, BLÉCON A, PETIT N, CHAREYRE F, GARCIA LA, NIWA-KAWAKITA M, GIOVANNINI M, TOURNIER-LASSERVE E. Tissue-specific conditional CCM2 knockout mice establish the essential role of endothelial CCM2 in angiogenesis: implications for human cerebral cavernous malformations. **Dis Model Mech**. 2009, 2:168-177.
- BRUNEREAU L, LEVY C, LABERGE S, HOUTTEVILLE J, LABAUGE P. De novo lesions in familial form of cerebral cavernous malformations: clinical and MR features in 29 non-Hispanic families. **Surg Neurol**. 2000, 53:475-482
- CARMELIET P, LAMPUGNANI MG, MOONS L, BREVIARIO F, COMPERNOLLE V, BONO F, BALCONI G, SPAGNUOLO R, OOSTHUYSE B, DEWERCHIN M, ZANETTI A, ANGELLILO A, MATTOT V, NUYENS D, LUTGENS E, CLOTMAN F, DE RUITER MC, GITTENBERGER-DE GROOT A, POELMANN R, LUPU F, HERBERT JM, COLLEN D, DEJANA E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. **Cell**, 1999 98:147-157

- CARMINATI L, CARLESSI E, LONGHI E, TARABOLETTI G. Controlled extracellular proteolysis of thrombospondins. **Matrix Biol**. 2023, 30:S0945-053X00048-3
- CÉBE-SUAREZ S, ZEHNDER-FJÄLLMAN A, BALLMER-HOFER K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell Mol Life Sci**. 2006, 63:601-615
- CHAN AC, DRAKOS SG, RUIZ OE, SMITH AC, GIBSON CC, LING J, PASSI SF, STRATMAN AN, SACHARIDOU A, REVELO MP, GROSSMANN AH, DIAKOS NA, DAVIS GE, METZSTEIN MM, WHITEHEAD KJ, LI DY. Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice. J Clin Invest. 2011, 121:1871-1881.
- CHANDRASEKARAN L, HE CZ, AL-BARAZI H, KRUTZSCH HC, IRUELA-ARISPE ML, ROBERTS DD. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. **Mol Biol Cell**. 2000, 11:2885-2900.
- CHEN C, MELO E, JAKOB P, FRIEDLEIN A, ELSÄSSER B, GOETTIG P, KUEPPERS V, DELOBEL F, STUCKI C, DUNKLEY T, FAUSER S, SCHILLING O, IACONE R. N-Terminomics identifies HtrA1 cleavage of thrombospondin-1 with generation of a proangiogenic fragment in the polarized retinal pigment epithelial cell model of age-related macular degeneration. **Matrix Biol.** 2018, 70:84-101.
- CHOI EK, KIM JG, KIM HJ, CHO JY, JEONG H, PARK Y, ISLAM R, CAP CK, PARK JB. Regulation of RhoA GTPase and novel target proteins for ROCK. **Small GTPases**. 2020 11:95-102
- CHOQUET H, PAWLIKOWSKA L, NELSON J, MCCULLOCH CE, AKERS A, BACA B, KHAN Y, HART B, MORRISON L, KIM H; Brain Vascular Malformation Consortium (BVMC) Study. Polymorphisms in inflammatory and immune response genes associated with cerebral cavernous malformation type 1 severity. **Cerebrovasc Dis**. 2014, 38:433-440
- CHRIFI I, LOUZAO-MARTINEZ L, BRANDT MM, VAN DIJK CGM, BÜRGISSER PE, ZHU C, KROS JM, VERHAAR MC, DUNCKER DJ, CHENG C. CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions. **Angiogenesis.** 2019, 22:75-93
- CHRZANOWSKA-WODNICKA M., KRAUS A.E., GALE D., WHITE G.C., VANSLUYS J. Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice. **Blood**. 2008, 111:2647-2656
- CLAESSON-WELSH L, DEJANA E, MCDONALD DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. **Trends Mol Med.** 2021, 27:314-331
- CONWAY DE, COON BG, BUDATHA M, ARSENOVIC PT, ORSENIGO F, WESSEL F, ZHANG J, ZHUANG Z, DEJANA E, VESTWEBER D, SCHWARTZ MA. VE-Cadherin Phosphorylation Regulates Endothelial Fluid Shear Stress Responses through the Polarity Protein LGN. **Curr Biol**. 2017, 27:2727.
- CORADA M, LIAO F, LINDGREN M, LAMPUGNANI MG, BREVIARIO F, FRANK R, MULLER WA, HICKLIN DJ, BOHLEN P, DEJANA E. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. **Blood** 2001, 97:1679-84.
- CROSS MJ, DIXELIUS J, MATSUMOTO T, CLAESSON-WELSH L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem Sci**. 2003, 28:488-94
- CUNNINGHAM K, UCHIDA Y, O'DONNELL E, CLAUDIO E, LI W, SONEJI K, WANG H, MUKOUYAMA YS, SIEBENLIST U. Conditional deletion of Ccm2 causes

hemorrhage in the adult brain: a mouse model of human cerebral cavernous malformations. **Hum Mol Genet**. 2011, 20:3198-206.

- CUTTANO R., RUDINI N., BRAVI L., CORADA M., GIAMPIETRO C., PAPA E., MORINI M.F., Maddaluno L., Baeyens N., Adams R.H., et al. KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. **EMBO Mol. Med.** 2016, 8:6-24
- DAWSON DW, VOLPERT OV, PEARCE SF, SCHNEIDER AJ, SILVERSTEIN RL, HENKIN J, BOUCK NP. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. **Mol Pharmacol**. 1999, 55:332-8.
- DEL CURLING O JR, KELLY DL JR, ELSTER AD, CRAVEN TE. An analysis of the natural history of cavernous angiomas. **J Neurosurg.** 1991 ;75:702-8
- DENIER C, LABAUGE P, BERGAMETTI F, MARCHELLI F, RIANT F, ARNOULT M, MACIAZEK J, VICAUT E, BRUNEREAU L, TOURNIER-LASSERVE E. Genotypephenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. **Ann Neurol**. 2006, 60:550-556.
- DENOVAN-WRIGHT EM, DAVIDSON BL. RNAi: a potential therapy for the dominantly inherited nucleotide repeat diseases. **Gene Ther**. 2006, 13:525-31
- DETWILER PW, PORTER RW, ZABRAMSKI JM, SPETZLER RF. De novo formation of a central nervous system cavernous malformation: implications for predicting risk of hemorrhage. Case report and review of the literature. **J Neurosurg**. 1997, 87:629-32.
- DISTEFANO PV, KUEBEL JM, SARELIUS IH, GLADING AJ. KRIT1 protein depletion modifies endothelial cell behavior via increased vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. **J Biol Chem**. 2014, 289:33054-65
- DRAHEIM KM, LI X, ZHANG R, FISHER OS, VILLARI G, BOGGON TJ, CALDERWOOD DA. CCM2-CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation. **J Cell Biol**. 2015, 208:987-1001
- DUDEK SM, GARCIA JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. **J Appl Physiol** 2001, 91:1487-500
- DUFFY AM, BOUCHIER-HAYES DJ, HARMEY JH. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. In: Madame Curie Bioscience Database (formerly, Eurekah Bioscience Database).
 Angiogenesis, Austin (TX): Landes Bioscience; 2000–2013 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/].
- FAUROBERT E, ALBIGES-RIZO C. Recent insights into cerebral cavernous malformations: a complex jigsaw puzzle under construction. **FEBS J.** 2010, 277:1084-96.
- Fauth C, Rostasy K, Rath M, Gizewski E, Lederer AG, Sure U, Zschocke J, Felbor U. Highly variable intrafamilial manifestations of a CCM3 mutation ranging from acute childhood cerebral haemorrhage to late-onset meningiomas. Clin Neurol Neurosurg. 2015, 128:41-43
- FÉLÉTOU M. The Endothelium Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells— Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology From Molecule to Function**, 2011, 3:1-306.
- FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004, 25:581-611.
- FERRARI DO OUTEIRO-BERNSTEIN MA, NUNES SS, ANDRADE AC, ALVES TR, LEGRAND C, MORANDI V. A recombinant NH(2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial

tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. **Matrix Biol**. 2002, 21:311-324

- FISHER OS, DENG H, LIU D, ZHANG Y, WEI R, DENG Y, ZHANG F, LOUVI A, TURK BE, BOGGON TJ, SU B. Structure and vascular function of MEKK3-cerebral cavernous malformations 2 complex. **Nat Commun**. 2015, 6:7937
- FISHER OS, ZHANG R, LI X, MURPHY JW, DEMELER B, BOGGON TJ. Structural studies of cerebral cavernous malformations 2 (CCM2) reveal a folded helical domain at its C-terminus. **FEBS Lett**. 2013, 587:272-277
- FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**. 1995, 1:27-31.
- Foulsham W, Dohlman TH, Mittal SK, Taketani Y, Singh RB, Masli S, Dana R. Thrombospondin-1 in ocular surface health and disease. **Ocul Surf**. 2019, 17:374-383
- FUJIMURA M, WATANABE M, SHIMIZU H, TOMINAGA T. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. Acta Neurochir (Wien). 2007, 149:179-83
- GAULT J, AWAD IA, RECKSIEK P, SHENKAR R, BREEZE R, HANDLER M, KLEINSCHMIDT-DEMASTERS BK. Cerebral cavernous malformations: somatic mutations in vascular endothelial cells. **Neurosurgery**. 2009, 65:138-44
- GAULT J, SHENKAR R, RECKSIEK P, AWAD IA. Biallelic somatic and germ line CCM1 truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. **Stroke**. 2005, 36:872-4.
- GIANFRANCESCO F, CANNELLA M, MARTINO T, MAGLIONE V, ESPOSITO T, INNOCENZI G, VITALE E, LIQUORI CL, MARCHUK DA, SQUITIERI F. Highly variable penetrance in subjects affected with cavernous cerebral angiomas (CCM) carrying novel CCM1 and CCM2 mutations. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007, 144B:691-5.
- GIANFRANCESCO F, ESPOSITO T, PENCO S, MAGLIONE V, LIQUORI CL, PATROSSO MC, ZUFFARDI O, CICCODICOLA A, MARCHUK DA, SQUITIERI F. ZPLD1 gene is disrupted in a patient with balanced translocation that exhibits cerebral cavernous malformations. **Neuroscience**. 2008, 155:345-9.
- GINGRAS AR, PUZON-MCLAUGHLIN W, GINSBERG MH. The structure of the ternary complex of Krev interaction trapped 1 (KRIT1) bound to both the Rap1 GTPase and the heart of glass (HEG1) cytoplasmic tail. **J Biol Chem**. 2013, 288:23639-49.
- GIRARD R, ZEINEDDINE HA, FAM MD, MAYAMPURATH A, CAO Y, SHI C, SHENKAR R, POLSTER SP, JESSELSON M, DUGGAN R, MIKATI AG, CHRISTOFORIDIS G, ANDRADE J, WHITEHEAD KJ, LI DY, AWAD IA. Plasma Biomarkers of Inflammation Reflect Seizures and Hemorrhagic Activity of Cerebral Cavernous Malformations. **Transl Stroke Res**. 2018, 9:34-43.
- GLADING A, HAN J, STOCKTON RA, GINSBERG MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. **J Cell Biol.** 2007, 179:247-54.
- GLOBISCH MA, ONYEOGAZIRI FC, SMITH RO, ARCE M, MAGNUSSON PU. Dysregulated Hemostasis and Immunothrombosis in Cerebral Cavernous Malformations. **Int J Mol Sci.** 2022, 23:12575
- GOITRE L, BALZAC F, DEGANI S, DEGAN P, MARCHI S, PINTON P, RETTA SF. KRIT1 regulates the homeostasis of intracellular reactive oxygen species. **PLoS One**. 2010, 5:e11786.

- GOOD DJ, POLVERINI PJ, RASTINEJAD F, LE BEAU MM, LEMONS RS, FRAZIER WA, BOUCK NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990, 87:6624-8.
- GORY-FAURÉ S, PRANDINI MH, POINTU H, ROULLOT V, PIGNOT-PAINTRAND I, VERNET M, HUBER P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. **Development**. 1999, 126:2093-102
- GREENAWAY J, LAWLER J, MOOREHEAD R, BORNSTEIN P, LAMARRE J, PETRIK J. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). J Cell Physiol. 2007, 210:807-18
- GUNEL M, LAURANS MS, SHIN D, DILUNA ML, VOORHEES J, CHOATE K, NELSON-WILLIAMS C, LIFTON RP. KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99:10677-82
- GUPTA K, GUPTA P, WILD R, RAMAKRISHNAN S, HEBBEL RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Angiogenesis**. 1999, 3:147-58.
- HAMRAH P, CHEN L, CURSIEFEN C, ZHANG Q, JOYCE NC, DANA MR. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) on monocytic bone marrow-derived cells in the conjunctiva. **Exp Eye Res**. 2004, 79:553-61.
- HASEGAWA T, MCINERNEY J, KONDZIOLKA D, LEE JY, FLICKINGER JC, LUNSFORD LD. Long-term results after stereotactic radiosurgery for patients with cavernous malformations. **Neurosurgery**. 2002, 50:1190-7
- HATANAKA K, SIMONS M, MURAKAMI M. Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2011, 300:H162-72.
- HAWKINS BT, OCHELTREE SM, NORWOOD KM, EGLETON RD. Decreased bloodbrain barrier permeability to fluorescein in streptozotocin-treated rats. **Neurosci Lett.** 200, 411:1-5.
- HE Y., ZHANG H., YU L., GUNEL M., BOGGON T.J., CHEN H., MIN W. Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. **Sci. Signal.** 2010 6, 3:ra26.
- HILDER TL, MALONE MH, BENCHARIT S, COLICELLI J, HAYSTEAD TA, JOHNSON GL, WU CC. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. J Proteome Res. 2007, 6:4343-55.
- HONG T, XIAO X, REN J, CUI B, ZONG Y, ZOU J, KOU Z, JIANG N, MENG G, ZENG G, SHAN Y, WU H, CHEN Z, LIANG J, XIAO X, TANG J, WEI Y, YE M, SUN L, LI G, HU P, HUI R, ZHANG H, WANG Y. Somatic MAP3K3 and PIK3CA mutations in sporadic cerebral and spinal cord cavernous malformations. **Brain**. 2021, 144:2648-2658
- HUANG Q, YANG J, LIN Y, WALKER C, CHENG J, LIU ZG, SU B. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. **Nat Immunol**. 2004, 5:98-103
- IRUELA-ARISPE ML. Regulation of thrombospondin1 by extracellular proteases. **Curr Drug Targets**. 2008, 9:863-868
- JACKSON AL, LINSLEY PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. **Nat Rev Drug Discov**. 201, 9:57-67

- JEAN C, CHEN XL, NAM JO, TANCIONI I, URYU S, LAWSON C, WARD KK, WALSH CT, MILLER NL, GHASSEMIAN M, TUROWSKI P, DEJANA E, WEIS S, CHERESH DA, SCHLAEPFER DD. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. **J Cell Biol**. 2014, 204:247-263
- JIN, Y., DING, Y., RICHARDS, M. Tyrosine-protein kinase Yes controls endothelial junctional plasticity and barrier integrity by regulating VE-cadherin phosphorylation and endocytosis. Nat Cardiovasc Res 2022, 1156–1173
- JORDAN ET, COLLINS M, TEREFE J, UGOZZOLI L, RUBIO T. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. **J Biomol Tech.** 2008, 19:328-334.
- KAUR S, ROBERTS DD. CD47 applies the brakes to angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-2. **Cell Cycle**. 2011, 10:10-12
- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem**. 2010, 397:3173-3178
- KOCH S, CLAESSON-WELSH L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2012 ;2:a006502.
- KOMAROVA YA, KRUSE K, MEHTA D, MALIK AB. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Circ Res**. 2017 120:179-206.
- KRISHT KM, WHITEHEAD KJ, NIAZI T, COULDWELL WT. The pathogenetic features of cerebral cavernous malformations: a comprehensive review with therapeutic implications. **Neurosurg Focus**. 2010, 29:E2
- KRYCZKA J, PRZYGODZKA P, BOGUSZ H, BONCELA J. HMEC-1 adopt the mixed amoeboid-mesenchymal migration type during EndMT. **Eur J Cell Biol**. 2017, 96:289-300.
- LABAUGE P, ENJOLRAS O, BONERANDI JJ, LABERGE S, DANDURAND M, JOUJOUX JM, TOURNIER-LASSERVE E. An association between autosomal dominant cerebral cavernomas and a distinctive hyperkeratotic cutaneous vascular malformation in 4 families. **Ann Neurol**. 1999, 45:250-254
- LAI CC, NELSEN B, FRIAS-ANAYA E, GALLEGO-GUTIERREZ H, ORECCHIONI M, HERRERA V, ORTIZ E, SUN H, MESARWI OA, LEY K, GONGOL B, LOPEZ-RAMIREZ MA. Neuroinflammation Plays a Critical Role in Cerebral Cavernous Malformation Disease. **Circ Res**. 2022, 131:909-925.
- LAMPUGNANI MG, CORADA M, ANDRIOPOULOU P, ESSER S, RISAU W, DEJANA E. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. **J Cell Sci**. 1997, 110:2065-2077.
- LAMPUGNANI MG, DEJANA E, GIAMPIETRO C. Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2018, 10:a029322.
- LANGE C, STORKEBAUM E, DE ALMODÓVAR CR, DEWERCHIN M, CARMELIET P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. **Nat Rev Neurol**. 2016, 12:439-454.
- LAWLER J. Counter regulation of tumor angiogenesis by vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. **Semin Cancer Biol**. 2022, 86:126-135.
- LAWLER PR, LAWLER J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2012, 2:a006627
- LEE NV, SATO M, ANNIS DS, LOO JA, WU L, MOSHER DF, IRUELA-ARISPE ML. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. EMBO J. 2006, 25:5270-5283

- LI X, ZHANG R, DRAHEIM KM, LIU W, CALDERWOOD DA, BOGGON TJ. Structural basis for small G protein effector interaction of Ras-related protein 1 (Rap1) and adaptor protein Krev interaction trapped 1 (KRIT1). **J Biol Chem**. 2012, 287:22317-22327
- LI X, ZHANG R, ZHANG H, HE Y, JI W, MIN W, BOGGON TJ. Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. J Biol Chem. 2010, 285:24099-240107.
- LIDINGTON EA, MOYES DL, MCCORMACK AM, ROSE ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. **Transpl Immunol**. 1999, 7:239-246.
- LIU L, ISHIHARA K, ICHIMURA T, FUJITA N, HINO S, TOMITA S, WATANABE S, SAITOH N, ITO T, NAKAO M. MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. **J Biol Chem**. 2009 ;284:5165-5174.
- LIU W, DRAHEIM KM, ZHANG R, CALDERWOOD DA, BOGGON TJ. Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. **Mol Cell**. 2013, 49:719-729
- LOPEZ-RAMIREZ MA, FONSECA G, ZEINEDDINE HA, GIRARD R, MOORE T, PHAM A, CAO Y, SHENKAR R, DE KREUK BJ, LAGARRIGUE F, LAWLER J, GLASS CK, AWAD IA, GINSBERG MH. Thrombospondin1 (TSP1) replacement prevents cerebral cavernous malformations. **J Exp Med**. 2017, 214:3331-3346
- LUO Y, XIAO W, ZHU X, MAO Y, LIU X, CHEN X, HUANG J, TANG S, RIZZOLO LJ. Differential expression of claudins in retinas during normal development and the angiogenesis of oxygen-induced retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2011, 52:7556-7564
- MADDALUNO L, RUDINI N, CUTTANO R, BRAVI L, GIAMPIETRO C, CORADA M, FERRARINI L, ORSENIGO F, PAPA E, BOULDAY G. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. **Nature**. 2013, 498:492–496
- MAHARAJ AS, SAINT-GENIEZ M, MALDONADO AE, D'AMORE PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. **Am J Pathol**. 2006, 168:639-648.
- MAJEWSKA A, WILKUS K, BRODACZEWSKA K, KIEDA C. Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies. **Int J Mol Sci**. 2021, 22:520
- MALINVERNO M, MADERNA C, ABU TAHA A, CORADA M, ORSENIGO F, VALENTINO M, PISATI F, FUSCO C, GRAZIANO P, GIANNOTTA M, YU QC, ZENG YA, LAMPUGNANI MG, MAGNUSSON PU, DEJANA E. Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. **Nat Commun.** 2019, 10:2761.
- MALIYEKKEL A, DAVIS BM, RONINSON IB. Cell cycle arrest drastically extends the duration of gene silencing after transient expression of short hairpin RNA. **Cell Cycle.** 2006, 5:2390-5
- MARINER DJ, ANASTASIADIS P, KEILHACK H, BÖHMER FD, WANG J, REYNOLDS AB. Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. **J Biol Chem**. 2001, 276:28006-28013.
- MARTIN SE, CAPLEN NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. Annu Rev Genomics **Hum Genet.** 2007, 8:81-108.

- MASLI S, SHEIBANI N, CURSIEFEN C, ZIESKE J. Matricellular protein thrombospondins: influence on ocular angiogenesis, wound healing and immuneregulation. **Curr Eye Res**. 2014, 39:759-774.
- McDONALD DA, SHENKAR R, SHI C, STOCKTON RA, AKERS AL, KUCHERLAPATI MH, KUCHERLAPATI R, BRAINER J, GINSBERG MH, AWAD IA, MARCHUK DA. A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease. **Hum Mol Genet**. 2011, 20:211-222
- McDONALD DA, SHI C, SHENKAR R, GALLIONE CJ, AKERS AL, LI S, DE CASTRO N, BERG MJ, CORCORAN DL, AWAD IA, MARCHUK DA. Lesions from patients with sporadic cerebral cavernous malformations harbor somatic mutations in the CCM genes: evidence for a common biochemical pathway for CCM pathogenesis. **Hum Mol Genet**. 2014, 23:4357-4370.
- MELINCOVICI CS, BOŞCA AB, ŞUŞMAN S, MĂRGINEAN M, MIHU C, ISTRATE M, MOLDOVAN IM, ROMAN AL, MIHU CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2018, 59:455-467.
- MIKATI AG, KHANNA O, ZHANG L, GIRARD R, SHENKAR R, GUO X, SHAH A, LARSSON HB, TAN H, LI L, WISHNOFF MS, SHI C, CHRISTOFORIDIS GA, AWAD IA. Vascular permeability in cerebral cavernous malformations. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2015, 35:1632-1639.
- MORANDI V. The N-terminal domain of thrombospondin-1: a key for the dual effect of TSP-1 in angiogenesis and cancer progression? **ScientificWorldJournal**. 2009 15, 9:133-136.
- MORANDI V, PETRIK J, LAWLER J. Endothelial Cell Behavior Is Determined by Receptor Clustering Induced by Thrombospondin-1. **Front Cell Dev Biol.** 2021, 9:664696.
- MORANDI, V., FERNANDES, LR, SILVA DE BARROS, AO. Functional Interplay Between Fibronectin and Matricellular Proteins in the Control of Endothelial Tubulogenesis. In: Papadimitriou, E., Mikelis, C.M. (eds) Matrix Pathobiology and Angiogenesis. Biology of Extracellular Matrix, vol 12. Springer Nature, Cham. 2023.
- NANOBASHVILI, J., JOZKOWICZ, A., NEUMAYER, C. Comparison of Angiogenic Potential of Human Microvascular Endothelial Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Eur Surg** 2003, 214–219
- NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J**. 1999 ;13:9-22
- OLSSON AK, DIMBERG A, KREUGER J, CLAESSON-WELSH L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2006, 7:359-371.
- ORSENIGO F, CONZE LL, JAUHIAINEN S, CORADA M, LAZZARONI F, MALINVERNO M, SUNDELL V, CUNHA SI, BRÄNNSTRÖM J, GLOBISCH MA, MADERNA C, LAMPUGNANI MG, MAGNUSSON PU, DEJANA E. Mapping endothelial-cell diversity in cerebral cavernous malformations at single-cell resolution. **Elife**. 2020, 9:e61413
- ORSENIGO F, GIAMPIETRO C, FERRARI A, CORADA M, GALAUP A, SIGISMUND S, RISTAGNO G, MADDALUNO L, KOH GY, FRANCO D, KURTCUOGLU V, POULIKAKOS D, BALUK P, MCDONALD D, GRAZIA LAMPUGNANI M, DEJANA E. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and

contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. **Nat Commun**. 2012, 3:1208.

- ORSENIGO F, GIAMPIETRO C, FERRARI A, CORADA M, GALAUP A, SIGISMUND S, RISTAGNO G, MADDALUNO L, KOH GY, FRANCO D, KURTCUOGLU V, POULIKAKOS D, BALUK P, MCDONALD D, GRAZIA LAMPUGNANI M, DEJANA E. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. **Nat Commun**. 2012, 3:1208.
- PAGANIN-GIOANNI A, ROLS MP, TEISSIÉ J, GOLZIO M. Cyclin B1 knockdown mediated by clinically approved pulsed electric fields siRNA delivery induces tumor regression in murine melanoma. **Int J Pharm**. 2020, 573:118732
- PAGENSTECHER A, STAHL S, SURE U, FELBOR U. A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in affected endothelial cells. **Hum Mol Genet**. 2009, 18:911-918.
- PATEL-HETT S, D'AMORE PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. **Int J Dev Biol**. 2011, 55:353-363.
- PAUTY J, USUBA R, CHENG IG, HESPEL L, TAKAHASHI H, KATO K, KOBAYASHI M, NAKAJIMA H, LEE E, YGER F, SONCIN F, MATSUNAGA YT. A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. EBioMedicine. 2018, 27:225-236.
- PELLETIER R, CARON SO, PUYMIRAT J. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. **Curr Gene Ther**. 2006, 6:131-146.
- PERRELLI A, RETTA SF. Polymorphisms in genes related to oxidative stress and inflammation: Emerging links with the pathogenesis and severity of Cerebral Cavernous Malformation disease. **Free Radic Biol Med.** 2021, 172:403-417
- PETIT N, BLÉCON A, DENIER C, TOURNIER-LASSERVE E. Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. **Gene Expr Patterns**. 2006, 6:495-503
- PHILLIPS CM, STAMATOVIC SM, KEEP RF, ANDJELKOVIC AV. Cerebral Cavernous Malformation Pathogenesis: Investigating Lesion Formation and Progression with Animal Models. **Int J Mol Sci**. 2022, 23:5000.
- PLUMMER NW, GALLIONE CJ, SRINIVASAN S, ZAWISTOWSKI JS, LOUIS DN, MARCHUK DA. Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in Ccm1 (KRIT1) to development of cerebral vascular malformations. **Am J Pathol.** 2004, 165:1509-1518.
- PLUMMER NW, SQUIRE TL, SRINIVASAN S, HUANG E, ZAWISTOWSKI JS, MATSUNAMI H, HALE LP, MARCHUK DA. Neuronal expression of the Ccm2 gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. **Mamm Genome.** 2006, 17:119-128.
- POLSTER SP, SHARMA A, TANES C, TANG AT, MERICKO P, CAO Y, CARRIÓN-PENAGOS J, GIRARD R, KOSKIMÄKI J, ZHANG D, STADNIK A, ROMANOS SG, LYNE SB, SHENKAR R, YAN K, LEE C, AKERS A, MORRISON L, ROBINSON M, ZAFAR A, BITTINGER K, KIM H, GILBERT JA, KAHN ML, SHEN L, AWAD IA. Permissive microbiome characterizes human subjects with a neurovascular disease cavernous angioma. **Nat Commun**. 2020, 11:2659
- PULOUS FE, GRIMSLEY-MYERS CM, KANSAL S, KOWALCZYK AP, PETRICH BG. Talin-Dependent Integrin Activation Regulates VE-Cadherin Localization and Endothelial Cell Barrier Function. **Circ Res**. 2019 ;124:891-903.

- QIU Y, HOAREAU-AVEILLA C, OLTEAN S, HARPER SJ, BATES DO. The antiangiogenic isoforms of VEGF in health and disease. **Biochem Soc Trans**. 2009, 37:1207-1213.
- RATH M, PAGENSTECHER A, HOISCHEN A, FELBOR U. Postzygotic mosaicism in cerebral cavernous malformation. **J Med Genet**. 2020, 57:212-216
- RENZ M, OTTEN C, FAUROBERT E, RUDOLPH F, ZHU Y, BOULDAY G, DUCHENE J, MICKOLEIT M, DIETRICH AC, RAMSPACHER C, STEED E, MANET-DUPÉ S, BENZ A, HASSEL D, VERMOT J, HUISKEN J, TOURNIER-LASSERVE E, FELBOR U, SURE U, ALBIGES-RIZO C, ABDELILAH-SEYFRIED S. Regulation of β1 integrin-Klf2-mediated angiogenesis by CCM proteins. **Dev Cell**. 2015, 32:181-190
- RESOVI A, PINESSI D, CHIORINO G, TARABOLETTI G. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. **Matrix Biol**. 2014, 37:83-91.
- RIANT F, BERGAMETTI F, FOURNIER HD, CHAPON F, MICHALAK-PROVOST S, CECILLON M, LEJEUNE P, HOSSEINI H, CHOE C, ORTH M, BERNREUTHER C, BOULDAY G, DENIER C, LABAUGE P, TOURNIER-LASSERVE E. CCM3 Mutations Are Associated with Early-Onset Cerebral Hemorrhage and Multiple Meningiomas. **Mol Syndromol**. 2013, 4:165-172.
- RIGAMONTI D, HADLEY MN, DRAYER BP, JOHNSON PC, HOENIG-RIGAMONTI K, KNIGHT JT, SPETZLER RF. Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. **N Engl J Med**. 1988, 319:343-347.
- RIOLO G, RICCI C, BATTISTINI S. Molecular Genetic Features of Cerebral Cavernous Malformations (CCM) Patients: An Overall View from Genes to Endothelial Cells. **Cells**. 2021,10:704
- RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997, 386:671-674
- RODRIGUEZ-MANZANEQUE JC, LANE TF, ORTEGA MA, HYNES RO, LAWLER J, IRUELA-ARISPE ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001, 98:12485-12490.
- ROLFE BE, WORTH NF, WORLD CJ, CAMPBELL JH, CAMPBELL GR. Rho and vascular disease. **Atherosclerosis**. 2005, 183:1-16.
- ROSEN LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. **Cancer Control**. 2002, 9:36-44.
- SCHULTE D, KÜPPERS V, DARTSCH N, BROERMANN A, LI H, ZARBOCK A, KAMENYEVA O, KIEFER F, KHANDOGA A, MASSBERG S, VESTWEBER D. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. **EMBO J**. 2011, 30:4157-4170
- SCHWARTZ MA. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2010, 2:a005066.
- SCIMONE C, DONATO L, KATSAROU Z, BOSTANTJOPOULOU S, D'ANGELO R, SIDOTI A. Two Novel KRIT1 and CCM2 Mutations in Patients Affected by Cerebral Cavernous Malformations: New Information on CCM2 Penetrance. Front Neurol. 2018, 9:953.
- SEKER A, PRICOLA KL, GUCLU B, OZTURK AK, LOUVI A, GUNEL M. CCM2 expression parallels that of CCM1. **Stroke**. 2006, 37:518-523.
- SHENKAR R, SHI C, REBEIZ T, STOCKTON RA, MCDONALD DA, MIKATI AG, ZHANG L, AUSTIN C, AKERS AL, GALLIONE CJ, RORRER A, GUNEL M, MIN W, DE SOUZA JM, LEE C, MARCHUK DA, AWAD IA. Exceptional aggressiveness

of cerebral cavernous malformation disease associated with PDCD10 mutations. **Genet Med**. 2015, 17:188-196.

- SHIBUYA M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**. 2006, 39:469-478
- SHIBUYA M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes Cancer**. 2011, 2:1097-1105
- SNELLINGS DA, HONG CC, REN AA, LOPEZ-RAMIREZ MA, GIRARD R, SRINATH A, MARCHUK DA, GINSBERG MH, AWAD IA, KAHN ML. Cerebral Cavernous Malformation: From Mechanism to Therapy. **Circ Res**. 2021,129:195-215
- SPIEGLER S, RATH M, PAPERLEIN C, FELBOR U. Cerebral Cavernous Malformations: An Update on Prevalence, Molecular Genetic Analyses, and Genetic Counselling. **Mol Syndromol.** 2018, 9:60-69
- STAMATOVIC SM, SLADOJEVIC N, KEEP RF, ANDJELKOVIC AV. PDCD10 (CCM3) regulates brain endothelial barrier integrity in cerebral cavernous malformation type 3: role of CCM3-ERK1/2-cortactin cross-talk. Acta Neuropathol. 2015, 130:731-750
- STOCKTON RA, SHENKAR R, AWAD IA, GINSBERG MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. **J Exp Med**. 2010, 207:881-896.
- SU VL, CALDERWOOD DA. Signalling through cerebral cavernous malformation protein networks. **Open Biol**. 2020,10:200263.
- SU VL, CALDERWOOD DA. Signalling through cerebral cavernous malformation protein networks. **Open Biol**. 2020, 10:200263.
- SULZMAIER FJ, JEAN C, SCHLAEPFER DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. **Nat Rev Cancer**. 2014,14:598-610.
- SUN H, BRESLIN JW, ZHU J, YUAN SY, WU MH. Rho and ROCK signaling in VEGFinduced microvascular endothelial hyperpermeability. **Microcirculation**. 2006, 13:237-247.
- TANG AT, CHOI JP, KOTZIN JJ, YANG Y, HONG CC, HOBSON N, GIRARD R, ZEINEDDINE HA, LIGHTLE R, MOORE T, CAO Y, SHENKAR R, CHEN M, MERICKO P, YANG J, LI L, TANES C, KOBULEY D, VÕSA U, WHITEHEAD KJ, LI DY, FRANKE L, HART B, SCHWANINGER M, HENAO-MEJIA J, MORRISON L, KIM H, AWAD IA, ZHENG X, KAHN ML. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. **Nature**. 2017, 545:305-310
- TANG AT, SULLIVAN KR, HONG CC, GODDARD LM, MAHADEVAN A, REN A, PARDO H, PEIPER A, GRIFFIN E, TANES C, MATTEI LM, YANG J, LI L, MERICKO-ISHIZUKA P, SHEN L, HOBSON N, GIRARD R, LIGHTLE R, MOORE T, SHENKAR R, POLSTER SP, ROEDEL CJ, LI N, ZHU Q, WHITEHEAD KJ, ZHENG X, AKERS A, MORRISON L, KIM H, BITTINGER K, LENGNER CJ, SCHWANINGER M, VELCICH A, AUGENLICHT L, ABDELILAH-SEYFRIED S, MIN W, MARCHUK DA, AWAD IA, KAHN ML. Distinct cellular roles for PDCD10 define a gut-brain axis in cerebral cavernous malformation. Sci Transl Med. 2019, 11:eaaw3521.
- TARABOLETTI G, MORBIDELLI L, DONNINI S, PARENTI A, GRANGER HJ, GIAVAZZI R, ZICHE M. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. **FASEB J**. 2000, 14:1674-1676.
- TORNAVACA O, CHIA M, DUFTON N, ALMAGRO LO, CONWAY DE, RANDI AM, SCHWARTZ MA, MATTER K, BALDA MS. ZO-1 controls endothelial adherens

junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. **J Cell Biol**. 2015, 208:821-838

- UCUZIAN AA, GASSMAN AA, EAST AT, GREISLER HP. Molecular mediators of angiogenesis. J Burn Care Res. 2010, 31:158-175
- UHLIK MT, ABELL AN, JOHNSON NL, SUN W, CUEVAS BD, LOBEL-RICE KE, HORNE EA, DELL'ACQUA ML, JOHNSON GL. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. **Nat Cell Biol**. 2003, 5:1104-1110.
- VALENTINO M, DEJANA E, MALINVERNO M. The multifaceted *PDCD10/CCM3* gene. **Genes Dis**. 2020 ;8:798-813.
- VAN HINSBERGH VW, VAN NIEUW AMERONGEN GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. **J Anat**. 2002, 200:549-560.
- VAN NIEUW AMERONGEN GP, BECKERS CM, ACHEKAR ID, ZEEMAN S, MUSTERS RJ, VAN HINSBERGH VW. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2007, 27:2332-2339.
- VIEIRA JM, RUHRBERG C, SCHWARZ Q. VEGF receptor signaling in vertebrate development. **Organogenesis**. 2010, 6:97-106
- WALLEZ Y, HUBER P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. **Biochim Biophys Acta**. 2008,1778:794-809.
- WANG S, ENGLUND E, KJELLMAN P, LI Z, AHNLIDE JK, RODRIGUEZ-CUPELLO C, SAGGIORO M, KANZAKI R, PIETRAS K, LINDGREN D, AXELSON H, PRINZ CN, SWAMINATHAN V, MADSEN CD. CCM3 is a gatekeeper in focal adhesions regulating mechanotransduction and YAP/TAZ signalling. Nat Cell Biol. 2021, 23:758-770.
- WEI S, LI Y, POLSTER SP, WEBER CR, AWAD IA, SHEN L. Cerebral Cavernous Malformation Proteins in Barrier Maintenance and Regulation. **Int J Mol Sci**. 2020, 21:675.
- WENG J, YANG Y, SONG D, HUO R, LI H, CHEN Y, NAM Y, ZHOU Q, JIAO Y, FU W, YAN Z, WANG J, XU H, DI L, LI J, WANG S, ZHAO J, WANG J, CAO Y. Somatic MAP3K3 mutation defines a subclass of cerebral cavernous malformation. Am J Hum Genet. 2021,108:942-950.
- WHITEHEAD KA, LANGER R, ANDERSON DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat Rev Drug Discov**. 2009, 8:129-38.
- WHITEHEAD KJ, CHAN AC, NAVANKASATTUSAS S, KOH W, LONDON NR, LING J, MAYO AH, DRAKOS SG, JONES CA, ZHU W, MARCHUK DA, DAVIS GE, LI DY. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. **Nat Med**. 2009,15:177-84.
- WOJCIAK-STOTHARD B, TSANG LY, HAWORTH SG. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2005, 288:L749-60
- WU X, LUO X, ZHU Q, ZHANG J, LIU Y, LUO H, CHENG Y, XIE Z. The Roles of Thrombospondins in Hemorrhagic Stroke. **Biomed Res Int**. 2017, 2017:8403184.
- XIAO K, ALLISON DF, BUCKLEY KM, KOTTKE MD, VINCENT PA, FAUNDEZ V, KOWALCZYK AP. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. J Cell Biol. 2003, 163:535-545

- XIAO K, GARNER J, BUCKLEY KM, VINCENT PA, CHIASSON CM, DEJANA E, FAUNDEZ V, KOWALCZYK AP. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. Mol Biol Cell. 2005, 16:5141-51.
- YAMAMOTO H, EHLING M, KATO K, KANAI K, VAN LESSEN M, FRYE M, ZEUSCHNER D, NAKAYAMA M, VESTWEBER D, ADAMS RH. Integrin β1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. **Nat Commun**. 2015, 6:6429.
- YAMAZAKI Y, MORITA T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Mol Divers**. 2006,10:515-527
- YANG J, BOERM M, MCCARTY M, BUCANA C, FIDLER IJ, ZHUANG Y, SU B. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. **Nat Genet**. 2000, 24:309-313
- YANG Y, ESTRADA EY, THOMPSON JF, LIU W, ROSENBERG GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab. 2007, 27:697-709
- ZAWISTOWSKI JS, STALHEIM L, UHLIK MT, ABELL AN, ANCRILE BB, JOHNSON GL, MARCHUK DA. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. Hum Mol Genet. 2005, 14:2521-2531
- ZHANG J, DUBEY P, PADARTI A, ZHANG A, PATEL R, PATEL V, CISTOLA D, BADR A. Novel functions of CCM1 delimit the relationship of PTB/PH domains. **Biochim Biophys Acta Proteins Proteom**. 2017, 1865:1274-1286
- ZHANG X, KAZEROUNIAN S, DUQUETTE M, PERRUZZI C, NAGY JA, DVORAK HF, PARANGI S, LAWLER J. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. **FASEB J**. 2009, 23:3368-3376.
- ZHOU Z, TANG AT, WONG WY, BAMEZAI S, GODDARD LM, SHENKAR R, ZHOU S, YANG J, WRIGHT AC, FOLEY M, ARTHUR JS, WHITEHEAD KJ, AWAD IA, LI DY, ZHENG X, KAHN ML. Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling. Nature. 2016, 532:122-126.